

ARTIFIZIELLE DNA - BINDENDE PROTEINE

Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten Proteinen zur gezielten
Anwendung in der direkten Detektion oder Anreicherung von Nukleinsäuren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig



eingereicht von:

Andreas Naumann, *M.sc.*

geb. am 28.11.1977 in Zossen

Leipzig, 2012

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der
Abteilung Diagnostik und neue Technologien
des Fraunhofer Instituts für Zelltherapie und Immunologie
in Leipzig angefertigt

Die Arbeit wurde betreut durch:
Dr. Dirk Kuhlmeier, Fraunhofer IZI
und
Prof. Dr. Gerd Birkenmeier, Universität Leipzig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades
vom 24.09.2013

BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG

Autor:

NAUMANN, ANDREAS

Titel:

ARTIFIZIELLE DNA - BINDENDE PROTEINE

Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten Proteinen zur gezielten Anwendung in der direkten Detektion oder Anreicherung von Nukleinsäuren

Universität Leipzig

Dissertation 120 Seiten; 238 Literaturstellen; 35 Abbildungen; 3 Tabellen; 9 Anlagen

Referat

Etablierte Methoden der molekularen Diagnostik für die Detektion oder Anreicherung von Nukleinsäuren basieren für gewöhnlich auf der Hybridisierung von komplementären Einzelsträngen. Dennoch ist eine Denaturierung des Doppelstrangs nicht zwingend erforderlich, um die Sequenzinformation in einem definierten Abschnitt zu lesen. DNA - bindende - oder modulierende Proteine, wie Transkriptionsfaktoren bzw. Topoisomerasen, interagieren spezifisch mit den Basen des Doppelstranges über exponierte Aminosäureseitenketten, welche naturgemäß durch charakteristische Sekundärstrukturen repräsentiert werden.

Die vorliegende Arbeit bietet zunächst einen Einblick in die strukturellen Grundlagen von DNA - Protein - Interaktionen, welche anhand von Cys₂His₂ - Zinkfinger (ZF) der Sp - Familie und der DNA - bindenden Domäne der *E. coli* DNA - Gyrase als konkrete Beispiele vertieft werden. Im Anschluss werden die Möglichkeiten der direkten Detektion von DNA für den Einsatz in der molekularen Diagnostik vorgestellt. Ein weiterer Schwerpunkt der Einführung thematisiert gängige Immobilisierungsstrategien für Proteine im Kontext der Generierung von biohybriden Systemen, welche in der modernen Nukleinsäureanalytik und Diagnostik immer mehr an Bedeutung gewinnen.

Aufgrund der noch sehr übersichtlichen proteinbasierten, nicht enzymatischen Detektionsmöglichkeiten für Nukleinsäuren wurden im Rahmen dieser Arbeit künstliche Proteine entworfen, kloniert und in gebräuchlichen Expressionssystemen hergestellt. Im Anschluss an die Aufreinigung sollten Funktionalität nachgewiesen werden sowie einfache Detektionsassays entwickelt werden.

Der methodische Teil gibt Aufschluss über die experimentelle Vorgehensweise zur Gewinnung und Charakterisierung von künstlichen Proteinen, sowie die verwendeten Materialien oder Chemikalien, die zu den im Anschluss vorgestellten Ergebnissen führten.

Der Ergebnisteil beginnt mit der Vorstellung der entwickelten Klonierungsstrategien gefolgt von den Expressionsdaten der künstlichen DNA - bindenden Proteine im eukaryotischen System HEK293, sowie dem prokaryotischen Expressionssystem *E. coli* BL21(DE3). Der überraschende destabilisierende Effekt der Sp3 - ZFD in HEK293 wird dann proteinbiochemisch und zellbiologisch näher untersucht. Die Ergebnisse der Analysen deuten auf eine posttranslationale Degradierung durch das 26S - Proteasom des Fusionsproteins hin. Im weiteren Verlauf werden die Aufreinigungsergebnisse der MBP - Fusionsproteine über Affinitätschromatographie aus *E. coli* dargelegt. Mit diesen Proteinen wurden dann Immobilisierungsexperimente zur Generierung von Proteinarrays zur Detektion von dsDNA durchgeführt. Die Immobilisierung erfolgte auf Glas, Polyesterol sowie auf magnetischen Nanopartikeln. Mit den generierten Arrays wurden kurze (50 bp) lange Oligonukleotide und PCR - Produkte detektiert. Im letzten Teil der Ergebnisse wird über die Entwicklungsschritte eines neuartigen Systems zur präanalytischen Probenaufbereitung mittels *gyrA* von prokaryotischen Nukleinsäuren berichtet. Durch eine gerichtete Immobilisierungsstrategie von MBP - *gyrA* konnte erstmals aus einem Gemisch bakterielle von humaner DNA magnetisch separiert werden.

Der Diskussionsteil reflektiert kurz die gewonnenen Ergebnisse zu den einzelnen Arbeitspaketen und diskutiert die zellbiologische Signifikanz der proteasomalen Degradierung von EGFP - Sp3. Über dies hinaus werden Vor - und Nachteile der hier entwickelten ZFD - Fusionsproteine in Kombination mit MBP diskutiert. Auch werden in diesem Abschnitt sinnvolle Optimierungen an den bestehenden Systemen aufgezeigt und die Schlussfolgerungen aus dieser Arbeit zu künstlichen Proteinen in der direkten Detektion von Nukleinsäuren verdeutlicht.

BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG	III
I EINLEITUNG	1
1 Prinzipien der DNA - Erkennung	1
1.1 Die Struktur der DNA als Grundlage für Interaktionen mit Proteinen.....	1
1.2 Elementare Protein - Sekundärstrukturen und deren Interaktion mit DNA	4
1.2.1 α - Helix	4
1.2.2 β - Faltblätter	5
1.3 Strukturelle Faktoren zur Spezifität der DNA-Bindung.....	6
2 Nukleinsäure - basierte Diagnostik	9
3 Präanalytische Probenvorbereitung in der Nukleinsäure - Diagnostik	11
4 Jenseits der Hybridisierung: Direkte Detektion von dsDNA	12
4.1 Sequenzspezifisch DNA - bindende Domänen	12
4.1.1 Cys ₂ His ₂ - Zinkfinger	12
4.1.2 DNA - Gyrase aus <i>E. coli</i>	15
5 Biohybride Technologien - Immobilisierung von Proteinen	17
5.1 Immobilisierung von Proteinen im Bereich Biochips und Arrays.....	17
5.2 Die Anforderung an die Oberflächenchemie	18
5.3 Ungerichtete oder gerichtete Immobilisierung von Proteinen.....	19
6 Zielsetzung	21
II MATERIAL UND METHODEN	22
1 Materialien	22
1.1 Chemikalien	22
1.2 Antikörper	22
1.3 Enzyme	22
1.4 Puffer, Medien und Lösungen	22
1.5 Oligonukleotide.....	23
2 Bakterienstämme	24
3 Molekularbiologische Methoden	24
3.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	24
3.2 Generierung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	25
3.3 Präparative Plasmidaufreinigung.....	25
3.4 Extraktion von Nukleinsäure - Fragmenten aus Agarosegelen.....	26
3.5 Modifizierte Phenol/ Chloroform/ Isoamyl - Extraktion von Nukleinsäuren	26
3.6 Isolierung von gesamt - RNA aus eukaryotischen Zellen	27
3.7 Isolierung humaner genomischer DNA.....	27
3.8 Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	27
3.9 Enzymatische Nukleinsäuremanipulationen.....	28
3.9.1 Manipulation von Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen	28
3.9.2 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren	28
3.9.3 Ligation von Nukleinsäure - Fragmenten	28
3.9.4 Sicherung von PCR - Amplikons	28
3.9.5 Polymerase - Kettenreaktion.....	29
3.9.6 Reverse Transkription	29
3.10 Agarosegelelektrophorese	30
3.11 DNA - Sequenzierung	30
4 Klonierungsstrategien	30
4.1 pMAL - Sp1	30
4.2 pMAL - 9 \times Lys - Sp1	31
4.3 pMAL - gyrA.....	31
4.4 pEGFP - Sp3.....	32

5	Zellbiologische Methoden	32
5.1	Kultivierung der Zelllinie HEK293.....	32
5.2	Auftauen eukaryotischer Zellen.....	33
5.3	Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen	33
5.4	Transiente Transfektion der HEK293 - Zellen mit pEGFP - Sp3	33
5.5	Behandlung transient - transfizierter HEK293 mit MG - 132	34
5.6	Isolierung zytoplasmatischer Proteine aus HEK293.....	34
6	Biochemische Methoden	34
6.1	Expression und Löslichkeitstest von MBP - Fusionsproteinen	34
6.2	Aufreinigung von MBP - Fusionsproteinen.....	36
6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
6.4	SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE).....	37
6.5	Coomassie - Färbung von Proteingelen	37
6.6	Western Blot	37
6.7	Modifizierte Gelshift - Assays.....	38
7	Biohybride Methoden	39
7.1	Einführung von Aminofunktionen auf Glasoberflächen	39
7.2	Charakterisierung von Protein - Nukleinsäure Interaktion mittels SPR	39
7.3	Zinkfinger - 2D - Proteinarrays und Bindung von DNA.....	40
7.3.1	Adsorptive Immobilisierung.....	40
7.3.2	Kovalente Immobilisierung	41
7.3.3	Bindung von dsDNA auf modifizierten Glasoberflächen	41
7.3.4	Immunodetektion auf Glasoberflächen	42
7.3.5	Mikrotiterplatten - basierte Detektion von PCR - Produkten	43
7.3.6	Bestimmung der Proteinbeladung in Mikrotiterplatten	43
7.5	Kovalente Immobilisierung von Protein A auf Nanopartikeln	44
7.6	Gerichtete Immobilisierung von MBP - gyrA auf Protein A - Nanopartikeln	44
7.7	Separation und Anreicherung von bakterieller gDNA	45
8	Statistik und Bildbearbeitung	45
III	ERGEBNISSE	46
1	Entwurf und Klonierung von DNA - bindenden Proteinen	46
1.1	ZF - basiertes Protein für eukaryotische Expression	46
1.2	ZF - basierte Proteine für prokaryotische Expression	47
1.2.1	Klonierung von pMAL - Sp1	47
1.2.2	Klonierung von 9×Lys - MBP - Sp1	48
2	Expression von EGFP - Sp3 in HEK293	50
2.1	Expression von EGFP - Sp3 in HEK293 - Zellen.....	50
2.2	Analyse der Integrität des EGFP - Sp3 - ZFD - Transkripts	51
2.3	Translation von EGFP - Sp3 - ZFD und Degradierung	52
3	Expression von DNA - bindenden Proteinen in <i>E. coli</i>	54
3.1	Expression und Lokalisation MBP - Sp1 und 9×Lys - MBP - Sp1	54
3.2	Aufreinigung von nativen MBP und MBP - Fusionsproteinen	56
3.3	Expression und Lokalisation MBP - gyrA.....	57
3.4	Aufreinigung von MBP - gyrA.....	57
4	DNA - Bindeeigenschaften von MBP - Fusionsproteinen	58
4.1	DNA - Protein - Interaktion von Fusionsproteinen mit Sp1 - ZFD	58
4.2	Charakterisierung der Spezifität der Sp1 - ZFD zur GC - Box und Varianten	60
4.3	Kinetische Analysen der Interaktion von MBP - Sp1 zur GC - Box und Varianten	61
4.3.1	Optimierung des BIAcore - Assays für Interaktionsmessungen	61
4.3.2	Kinetische Analyse der MBP - Sp1 - DNA - Interaktion	62
4.4	Analyse der Interaktion von MBP - gyrA und dsDNA	63

5	2D - Protein - Arrays zur Detektion von Nukleinsäuren	65
5.1	Rekombinante ZFD - Proteine als Liganden in 2D - Arrays	65
5.1.1	Nachweis von dsDNA nach adsorptiver Immobilisierung auf Glassubstraten	65
5.1.2	Nachweis von dsDNA nach kovalenter Immobilisierung auf Glassubstraten	68
5.1.3	Mikrotiterplatten - basiertes ZFD - Array zur Detektion von dsDNA	69
5.1.4	Mikrotiterplatten - basiertes ZFD - Array zur Detektion von Pathogen - DNA	71
5.2	gyrA - vermittelte Anreicherung von Pathogen - DNA	73
5.2.1	Funktionalisierung von Magnetpartikeln mit MBP - gyrA	73
5.2.2	Spezifische Isolierung von Pathogen - DNA über funktionalisierte Magnetpartikel	74
IV	DISKUSSION	78
1	DNA - bindende Proteine als funktionelle Komponenten in der Diagnostik	78
2	Proteinchips mit rekombinanten MBP - ZFD	79
3	Detektion von PCR - Produkten mit MBP - Sp1 - ZFD - Arrays	82
4	Proteasomale Degradierung von EGFP - Sp3	83
5	MBP - gyrA - CTD in der präanalytischen Anreicherung bakterieller DNA	85
6	Schlussfolgerungen	87
V	LITERATUR	89
VI	ANHANG	104
A	Zusammenfassung	104
B	Abstract	105
C	Ergänzende Daten	106
C1	Proteinsequenzen	106
C2	Sensogramme der SPR - Assays zu MBP - Sp1	107
C3	Übersicht der Codon - Präferenz von <i>E. coli</i> K12 für Sp1 - ZFD	108
D	Abkürzungsverzeichnis	109
E	Symbole und Einheiten	110
F	Danksagung	111
G	Selbstständigkeitserklärung	112
H	Publikationen	113
I	Curriculum Vitae	114

I EINLEITUNG

1 Prinzipien der DNA - Erkennung

1.1 Die Struktur der DNA als Grundlage für Interaktionen mit Proteinen

Die Primärstruktur eines Nucleinsäurestranges repräsentiert ein organisches lineares Polymer, welches sich aus vier monomeren Einheiten, den Desoxyribonucleotiden zusammensetzt. Diese bestehen prinzipiell aus dem Zucker Desoxyribose, einer stickstoffhaltigen Base und einer Phosphatgruppe. Die Base ist immer am 1' - Kohlenstoff der Desoxyribose angeordnet. Die Phosphatgruppe ist am 5' - Kohlenstoff gebunden. Je nachdem welche Base an der Desoxyribose gebunden ist, liegt entweder Desoxyadenylat (A), Desoxyguanylat (G), Desoxycytidylat (C) oder Desoxythymidylat (T) vor. Für die Synthese der Desoxyribonucleotide werden vier heterocyclische Basen benötigt: Die Purine Adenin und Guanin, sowie die Pyrimidine Cytosin und Thymin. Das lineare Polymer Desoxyribonucleinsäure (DNA) besteht aus sich wiederholenden, über Phosphodiesterbindungen verbundene, Desoxyribonucleotide (Abb. I - 1). Ein Nucleinsäurestrang besitzt die chemische Orientierung von 5' nach 3', wobei die endständige Gruppe am 5' - Terminus in der Regel eine Phosphatgruppe und am 3' - Terminus eine Hydroxylgruppe ist. Polynucleotide nehmen für gewöhnlich eine räumliche Konformation an, die durch nicht kovalente Bindungen stabilisiert werden [LODISH 2003].

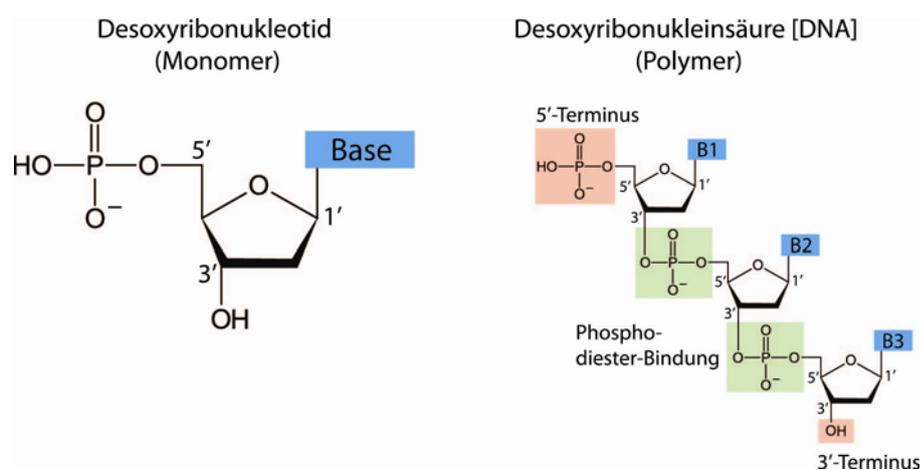


Abb. I - 1. Molekulare Struktur von Desoxyribonucleinsäuren (DNA). Durch Polymerisation der monomeren Desoxyribonucleotide wird das Polymer Desoxyribonucleinsäure gebildet. Die kovalente Verknüpfung der einzelnen Nucleotide erfolgt durch Phosphodiesterbindungen. Nucleinsäuren besitzen die chemische Orientierung 5' → 3'.

Die wegweisenden röntgenkristallographischen Analysen durch WATSON & CRICK zeigten, entgegengesetzt der damaligen Theorie der einzelsträngigen DNA, dass native DNA als Doppelstrang vorliegt und sich zudem zu einer Doppelhelix formiert [WATSON & CRICK 1953]. Die bedeutendste Eigenschaft nativer DNA ist die spezifische Basenpaarung, welche den Doppelstrang stabilisiert (Abb. I - 2 A). Die Interaktion zwischen den Basen wird durch Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt, wobei ein Basenpaar immer eine Assoziation aus Purinbase und Pyrimidinbase darstellt (Abb. I - 2 B). Doppelsträngige DNA (dsDNA) besitzt eine relativ einheitliche Struktur, mit einem negativ geladenen Zucker - Phosphat - Rückgrat und einem Kern aus zusammengefassten Basen, welche die große und kleine Furche bilden (Abb. I - 2 A). Jedes spezifische Basenpaar besitzt eine charakteristische Komposition von funktionellen Gruppen, was wiederum der dsDNA aufgrund ihrer Sequenz, eine chemische Signatur verleiht. Dieses Muster wird in den Furchen repräsentiert. Die chemische Oberfläche, zusammen mit sequenzabhängigen Variationen, Strukturen und Flexibilität nutzen diverse DNA - bindende Proteine zur spezifischen reversiblen Interaktion [GARVIE & WOLBERGER 2001]. Solche Proteine interagieren mit einem spezifischen DNA - Motiv über ihre funktionellen Domänen, die eine chemisch komplementäre Oberfläche zum spezifischen DNA - Abschnitt aufweisen. Vorwiegend werden dabei elektrostatische oder van - der - Waals - Wechselwirkungen zwischen den Basen, zusammen mit dem Zucker - Phosphat - Rückgrat der dsDNA und dem Protein ausgebildet.

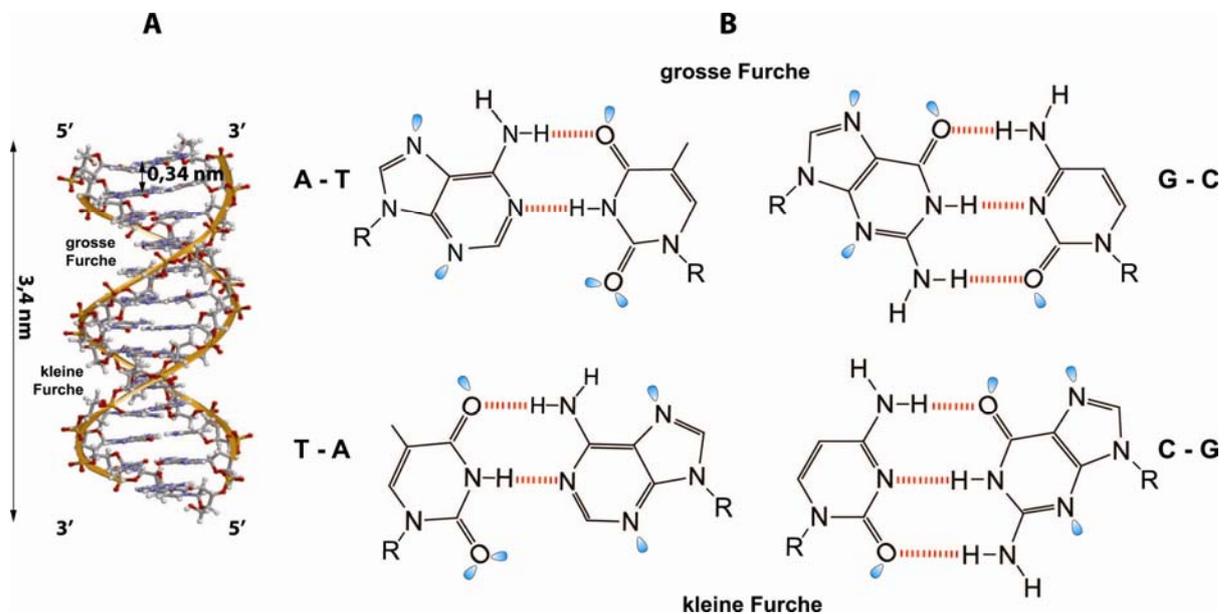


Abb. I - 2. Sekundärstruktur der dsDNA - die Doppelhelix. (A) Räumliches Modell der B - DNA. Zwei komplementäre Nukleinsäurestränge lagern sich zusammen und bilden die Doppelhelix. Diese generelle B - Form besitzt zwei asymmetrische Furchen, die sich lediglich in der räumlichen Ausdehnung unterscheiden. (B) Watson - Crick - Basenpaarung durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (---) zwischen gegenüberliegenden Basen. ● - Ungepaarte Elektronen, R - Zucker - Phosphat - Rückgrat

Generell formen zwei komplementäre Nukleinsäurestränge entweder eine rechts - gerichtete oder eine links - gerichtete Helix aus. Aufgrund der Geometrie des Zucker - Phosphat - Rückgrats bildet native DNA oft die rechts - gerichtete Helix aus. Der Abstand zwischen den Basen entlang eines Stranges beträgt 0,34 nm. Jede Windung setzt sich aus 10 Basenpaaren zusammen. Somit windet sich die Helix alle 3,4 nm komplett (Abb. I - 2 A). Diese Form der Helix bezeichnet man als B - DNA, welche aus energetischer Sicht eine günstige Konformation besitzt (Abb. I - 3 A). Eine wichtige strukturelle Eigenschaft der Helix sind die zwei asymmetrischen Furchen, die sich formal anhand in ihrer räumlichen Ausdehnung unterscheiden. Eine wichtige Konsequenz dieser strukturellen Eigenschaft ist, dass dadurch die innen liegenden Basen von außen her durch mehr oder minder große Moleküle kontaktiert werden können. Die Interaktion mit der dsDNA erfolgt über den Kontakt der verschiedenen exponierten chemischen Gruppen innerhalb der Furchen. Die große Furche beinhaltet, aufgrund ihrer räumlich erweiterten Struktur, vergleichsweise mehr Sequenzinformation als die kleinere Furche. Dadurch wird die Interaktion mit Proteindomänen begünstigt. Neben der B - Form der DNA existieren noch die A - Form und die Z - Form (Abb. I - 3). In einem Milieu mit niedrigem Wassergehalt (< 75 %) neigt die B - Form in die kompaktere A - Form überzugehen. Darüber hinaus liegen Ribonukleinsäuren (RNA) und RNA - DNA - Duplexe überwiegend in der A - Konformation vor. Nukleinsäurestränge mit alternierenden Purinen/ Pyrimidinen bilden die Z - Form, eine radikale Abweichung zur B - Form. Die bemerkenswerteste Eigenschaft ist die links - gerichtete Windung. Zudem ist die große Furche kaum ersichtlich und die kleine Furche nimmt eine enge und tiefe Konformation ein.

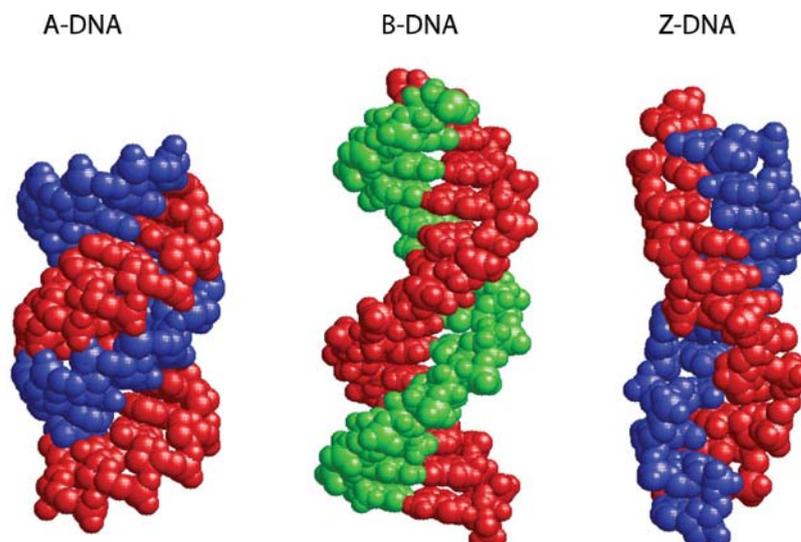


Abb. I - 3. Konformationen der DNA. Native DNA liegt *in vivo* in der energetisch günstigen B - Form vor. Die A - Form ist eine kompaktere Form der B - Form. A - und B - Form sind rechts - gerichtet. Die Z - Form wird durch negatives „*supercoiling*“ erzeugt und ist links - gerichtet.

Die mäßig gewundene Z - Form existiert in biologischen Systemen als ein dynamischer Zustand und wird durch einen energieabhängigen Prozess von der B - Form überführt. Stabilisiert wird die Z - Form durch negatives „*supercoiling*“ [JAWORSKI *et al.*, 1987]. Durch die Interaktion mit Topoisomerase wird die Z - Form destabilisiert und geht zurück in die energetisch günstigere B - Form [WITTIG *et al.*, 1991].

1.2 Elementare Protein - Sekundärstrukturen und deren Interaktion mit DNA

1.2.1 α - Helix

Wie bereits angedeutet, bieten die Furchen der dsDNA in der B - Form eine geeignete räumliche Geometrie für den Kontakt zwischen Basen und Makromolekülen. Proteine, welche spezifisch DNA - Sequenzen binden zeigen eine bemerkenswerte diverse Struktur. Die rechts gewundene α - Helix repräsentiert dabei das gebräuchlichste strukturelle Element, das Proteine für die Erkennung von DNA - Sequenzmotiven in der großen oder kleinen Furche nutzen. Strukturell gesehen ist die α - Helix die simpelste Konformation, welche eine Polypeptidkette aufgrund ihrer starren Peptidbindungen eingehen kann [PAULING *et al.*, 1951a]. Zur Ausbildung dieser Struktur windet sich das Polypeptid - Rückgrat longitudinal um eine zentral gelegene imaginäre Achse herum. Dadurch werden verschiedene Aminosäure (AS) - Seitenketten nach außen präsentiert (Abb. I-4 A). Die Struktur wird überwiegend durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, welche sich zwischen den NH - und CO - Gruppen der Peptidbindungen ausbilden, welche genau 4 Positionen in der Sequenz voneinander entfernt sind. Jede Peptidbindung, ausgenommen jene an den Enden der Peptidkette, partizipiert in der Ausbildung der Wasserstoffbrücken. Die Kombination aller Wasserstoffbrücken, unter der Voraussetzung einer optimalen AS - Komposition, verleiht der gesamten helicalen Struktur eine bemerkenswerte Stabilität [PAULING & COREY 1951b].

Die Proportionen der α - Helix erweisen sich in Modellanalysen als ideal für die Repräsentation von AS - Seitenketten zur Interaktion mit den Basen von undeformierter B - DNA. Die geometrische Form eines Zylinders für eine α - Helix ist dabei die korrekte Annäherung. Soll eine maximale Anzahl von exponierten AS der α - Helix einen Basenkontakt in der großen Furche herstellen, so muss die Achse der Helix parallel zum flankierenden DNA - Rückgrat ausgerichtet sein [SUZUKI & GERSTEIN 1995]. Diese optimale Orientierung wurde bei der Homeodomäne [GEHRING *et al.*, 1994] und den einfachen Leucin - Zipper [KÖNIG & RICHMOND 1993] gefunden. Die zylindrische Geometrie der α - Helix in Kombination mit der großen Furche bietet aber weitaus mehr Möglichkeiten an Interaktionsvariationen (Abb. I - 4 B). Für den Kontakt in der großen Furche wird sowohl beim Trp - Repressor [OTWINOWSKI *et al.*, 1988], als auch beispielsweise bei den Cys₂His₂ - Zinkfingern (ZF) der Sp - Familie [PAVLETICH & PABO 1991] nur der N - terminale Bereich der α - Helix für die

Sequenzerkennung verwendet [GAJIWALA *et al.*, 2000]. Die Interaktion der α - Helix mit der DNA dient bei den Mitgliedern der „winged“ Helix - Familie und beim *catabolite gene activator protein* (CAP) zur Bildung eines Übergangszustandes, der eine nachfolgende DNA - Interaktion benachbarter Motive, wie z.B. β - Faltblätter, erst ermöglicht [SCHULTZ *et al.*, 1991]. Neben der großen Furche sind α - Helices ebenso im Stande in der kleinen Furche der B - DNA zu interkalieren. Typische Vertreter für diese Art von Interaktion sind die Mitglieder der *lac* - Repressor - Familie [LEWIS *et al.*, 1996; SCHUMACHER *et al.*, 1994]. Typischerweise formieren sich bei diesen Proteinen die α - Helices in der „hinge“ - Region durch den Kontakt des *lac* - Repressors mit dem symmetrischen SymL(-1) - Operator [LEWIS 1996; SPRONK *et al.*, 1996]. Der Kontakt von „hinge“ - Helices mit Basen der kleinen Furche resultiert in der Krümmung der DNA um 45° in der zentralen Region des Operators.

1.2.2 β - Faltblätter

Der Kontakt von Proteinen mit dsDNA über die β - Faltblätter ist im Vergleich zur α - Helix vermittelten Interaktion eher untergeordnet. Die β - Faltblätter sind das zweite repetitive strukturelle Element und stellen eine erweiterte Konformation dar. Die Polypeptidkette erstreckt sich hier in gewissen Bereichen eher zickzackförmig als helical. Ein Arrangement das einer Abfolge von Falten ähnelt.. Die Struktur wird auch hier durch Wasserstoffbrücken zwischen den partizipierenden Segmenten der Polypeptidkette stabilisiert. Die individuellen Segmente, welche zur Bildung von β - Faltblättern beitragen, sind entweder eng benachbarte oder distanzierte Bereiche innerhalb einer Polypeptidkette. Die entsprechenden Segmente können aber auch von anderen Polypeptidketten zur Verfügung gestellt werden. Die benachbarten Segmente von β - Faltblättern können entweder parallel oder antiparallel zueinander ausgerichtet sein. Beide Anordnungen unterscheiden sich lediglich in den Mustern der Wasserstoffbrücken [PAULING & COREY 1951c].

Eine sehr typische Anordnung für β - Faltblätter in DNA - bindenden Domänen ist die Faltblatt - Helix - Helix - Struktur ($\beta\alpha\alpha$), wie sie bei prokaryotischen Repressoren MetJ [SOMERS & PHILLIPS 1992] und Arc [RAUMANN *et al.*, 1994] zu finden sind. Beide Vertreter gehen durch Dimerisierung in einen stabilen Zustand über, wobei die jeweiligen β - Faltblätter eine antiparallele Form einnehmen und an der Proteinoberfläche repräsentiert werden. Die Dimer - Faltblätter interkalieren in der großen Furche der dsDNA und kontaktieren die Basenpaare und die Stränge, welche parallel zum flankierenden Zucker - Phosphat - Rückgrat liegen (Abb. I - 4 B). Proteine der $\beta\alpha\alpha$ - Familie binden kooperativ zwei oder mehr benachbarte DNA - Motive.

Die Insertion einer 3 - strängigen, antiparallelen Faltblattstruktur in die große Furche der DNA wurde beim pflanzlichen GCC - Box bindenden Protein beobachtet [ALLEN *et al.*, 1998]. Aufgrund der

gestaffelten Anordnung der Faltblätter lagert sich das Protein in die große Furche ein ohne eine signifikante Verkrümmung der DNA hervorzurufen.

Eine Anordnung von zahlreichen, parallelen β -Faltblättern benutzt auch das TATA-Box bindende Protein (TBP) um die DNA-Sequenz innerhalb der kleinen Furche zu erkennen [NIKOLOV & BURLEY 1994]. Im Gegensatz zur Interaktion der β -Faltblätter in der großen Furche, was lediglich mit einer minimalen Beugung der DNA einhergeht, erfolgt durch die Insertion der konkaven Faltblattdomäne des TBP eine tiefgreifende Verformung der dsDNA. Die Kontakte in der kleinen Furche können erst durch ein intensives Aufwinden und Beugen der DNA hergestellt werden. Durch Interkalation einer Phenylalanin-Seitenkette, welche im β -Faltblatt lokalisiert ist, wird hierbei die massive Verformung der DNA vermittelt.

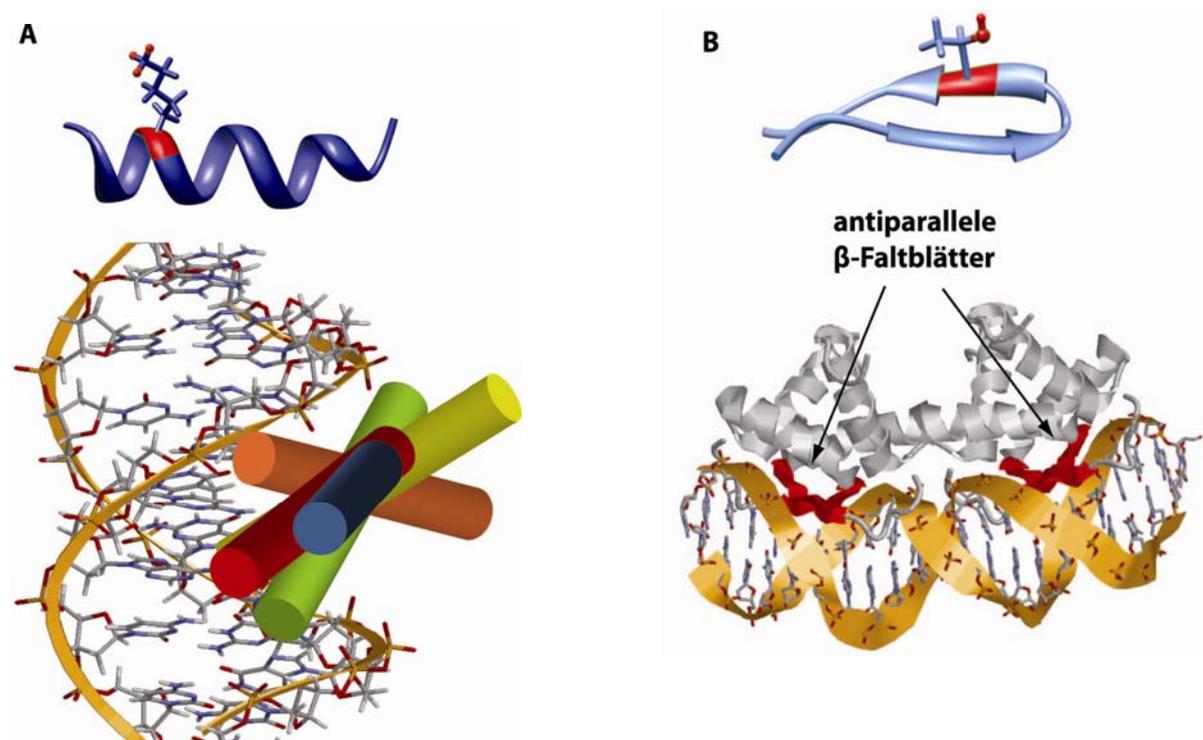


Abb. I - 4. Interaktion von Sekundärstrukturelementen mit dsDNA. (A) α -Helices interkalieren über exponierte AS in die große Furche der dsDNA. Die zylindrische Form der α -Helix ermöglicht unterschiedliche Orientierungen. Farbcode der angedeuteten Helices: *rot*, Sp1; *blau*, MAT α 2 Homeodomäne; *grün*, IRF; *orange*, trp-Repressor; *gelb*, Tox-Repressor. (PDB_ID B-DNA: 1LAI; PDB_ID α -Helix: 1DN3). (B) Antiparallele β -Faltblätter interkalieren ebenfalls in die große Furche der dsDNA und kontaktieren die Basen über exponierte AS. Das Arc-Repressor-Dimer aus *E. coli* nutzt antiparallele β -Faltblätter um mit Basen in der großen Furche zu interagieren. (PDB_ID Arc-Repressor: 1PAR)

1.3 Strukturelle Faktoren zur Spezifität der DNA-Bindung

Makromolekulare Interaktionen zwischen Protein und DNA sind naturgemäß von der dreidimensionalen Struktur der interagierenden Partner abhängig. Daraus ergeben sich verschiedene molekulare Mechanismen die Proteine zum Lesen der Sequenz der DNA anwenden. In der Ausbildung der

Schnittstelle zwischen DNA und Protein sind durchschnittlich 24 AS-Reste und 12 Basen involviert, was es sehr wahrscheinlich macht, dass sich jede Schnittstelle aus verschiedenen Interaktionsmechanismen aufbaut. Die Summe der Interaktionen führt zur bestimmten Bindeaffinität, wobei die Sequenzspezifität ein Resultat einzelner Interaktionen ist [JANIN *et al.*, 2007]. Generell wird die Spezifität von Protein zur DNA-Sequenz entweder durch das Lesen der chemischen Information über die Basen (*base readout*) oder durch das Erkennen der Form der DNA (*shape readout*) determiniert. Das Erkennen der chemischen Signatur von Basen oder Basenpaaren durch Proteine in der großen oder kleinen Furche wird generell durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken vermittelt. Die Wasserstoffbrückenbindungen mit Basen in der großen Furche bieten einen höheren Grad an Spezifität als in der kleinen Furche. Dies erklärt sich durch das einzigartige Muster an Donor- und Akzeptoratomen der vier Basenpaare in der großen Furche [HARRISON & AGGARWAL 1990; SEEMAN *et al.*, 1976]. Insbesondere Proteine der Sp-Familie mit ihren ZFD kontaktieren Basen in der großen Furche über Wasserstoffbrücken. Die abgeleitete Spezifität durch Wasserstoffbrücken in den Furchen ist einerseits abhängig von der Anzahl der Kontakte zwischen Basen und AS-Resten und andererseits abhängig von der einzigartigen Geometrie der Wasserstoffbrückenbindung. Insbesondere AS wie Arg, Lys, Gln und Asn bilden zwei Wasserstoffbrücken aus, wobei jeweils ein unterschiedliches Donor- und Akzeptoratom kontaktiert werden (*bidentate hydrogen bonds*, BHD). Dieser Interaktionstyp ist die Quelle von bemerkenswerter Selektivität, gefolgt von zwei Wasserstoffbrücken, welche sich ein Donoratom teilen (*bifurcate hydrogen bonds*). Einzelne Wasserstoffbrücken tragen in der Regel nicht zur Spezifität bei [COULOCHERI *et al.*, 2007]. Die selektiven BHD können mit einer Base, zwei Basen in einem Paar, benachbarten Basen eines Stranges oder zwei diagonal gegenüberliegenden Basen auf verschiedenen Strängen ausgebildet werden. Die Wasserstoffbrücken können durch α -Helices und β -Faltblätter gleichermaßen ausgebildet werden. Basenkontakte über hydrophobe Wechselwirkungen werden lediglich zum Lesen von Pyrimidinen verwendet, ganz im Gegensatz zu den hochspezifischen Wasserstoffbrücken. Die hydrophoben Interaktionen treten gleichermaßen in der großen und kleinen Furche auf. Darüber hinaus dienen hydrophobe Interaktionen ebenfalls zum Kontakt einzelsträngiger DNA sowie zu Stabilisierung des Protein/ DNA - Komplexes. Wie bereits oben angedeutet, herrschen deutliche Unterschiede im Muster von Donor- und Akzeptoratomen der kleinen Furche im Vergleich zur großen Furche (Abb. I - 5). Proteine wie Cys₂His₂- GATA binden einerseits mit ihrer ZFD über Wasserstoffbrücken in der großen Furche, können aber gleichzeitig auch Basenkontakte in der kleinen Furche ausbilden. Dies ist meist verbunden mit einer massiven Deformierung der DNA in einem bestimmten Bereich [OGUEY *et al.*, 2010]. Architektonische Proteine kontaktieren Basen ausschließlich in der kleinen Furche, was oftmals mit einer dramatischen Erweiterung und einer extensiven Ausbildung von hydrophoben Kontakten assoziiert ist [BEWLEY *et al.*, 1998]. Für eine Vielzahl an DNA-bindenden Proteinen reichen

Wasserstoffbrückenbindungen nicht aus um deren Spezifität zu erklären. Die DNA - Struktur und Deformierung kann ebenfalls zur Spezifität beitragen [ROHS *et al.*, 2009; TRAVERS 1989]. Diese Formen von Lesemechanismen sind alle abhängig von Abweichung der idealen B-DNA Form. Diese Verformungen treten entweder lokal begrenzt auf oder global, wobei die gesamte Bindestelle entlang des Strangs massiv deformiert ist. Das Lesen der chemischen Information in der kleinen Furche kann durch eine lokale Verformung der Bindestelle gewährleistet werden, wobei eine räumliche Erweiterung erfolgt. Basische AS-Seitenketten, z.B vom Arg, interagieren dann mit den Basen, wenn die komplementäre Information repräsentiert wird [ROHS *et al.*, 2009]. Es existieren Indizien, dass die Form der großen Furche, ebenso wie die Form der Kleinen, ebenso für das Lesen der Information verwendet wird. In der Tat korrelieren die Geometrien der kleinen und großen Furche miteinander [BOUTONNET *et al.*, 1993]. Die Erweiterung der kleinen Kurve resultiert in der Verkleinerung der großen Furche, was wiederum eine Verbesserung der Komplementarität zur Folge hat [GAJIWALA & BURLEY 2000; LANE & DARST 2006]. Abweichungen von der idealen Konformation der B-DNA ist gebogene DNA, A-DNA, Z-DNA und A/B-Intermediate. Insbesondere Cys₂His₂-ZF tendieren zur Interaktion mit A/B-Intermediaten [ELROD-ERICKSON *et al.*, 1998]. Interessanterweise kristallisiert die Bindesequenz von Cys₂His₂-ZF Zif268 in einer A-ähnlichen Konformation, gleichwohl proteinassoziiert und nicht [ELROD-ERICKSON *et al.*, 1996; LOCASALE *et al.*, 2009]. Diese Daten suggerieren das solche DNA-Sequenzen eine intrinsische Tendenz zur Einnahme der A-ähnlichen Form besitzt. Dadurch können hydrophobe Regionen, wie die Zucker des Rückgrats besser präsentiert werden, die generell z.B. von ZF zur Interaktion genutzt werden [CHOO & KLUG 1997].

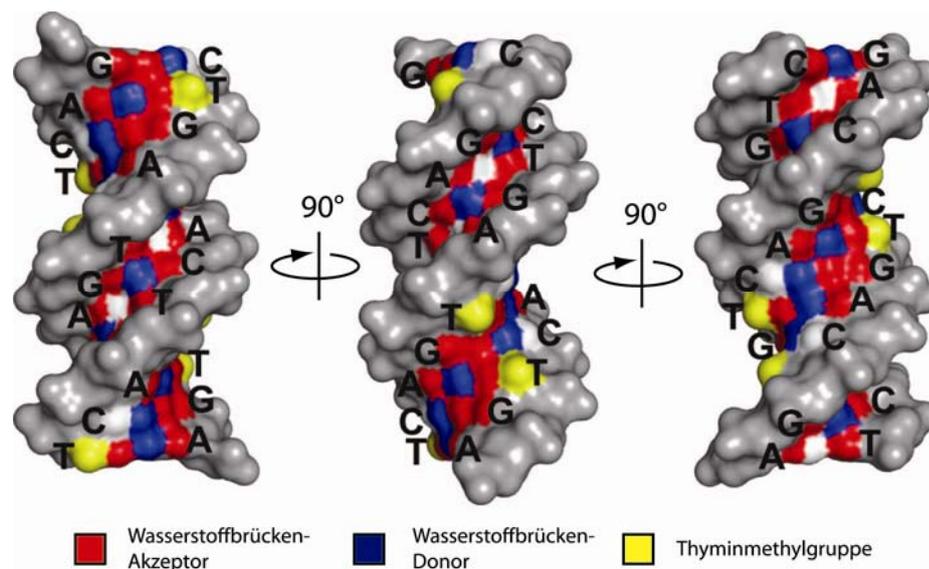


Abb. I - 5. Basenerkennung in der großen und kleine Furche der B-DNA. Sequenzspezifität in der großen Furche unterliegt der Fähigkeit der Proteine die Basenmuster über Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen zu kontaktieren. Im Vergleich sind A:T vs. T:A und G:C vs. C:G in der kleinen Furche nicht zu unterscheiden [adaptiert aus ROHS *et al.*, 2010].

2 Nukleinsäure - basierte Diagnostik

Molekulare Diagnostik basierend auf Sequenzinformationen gewinnt stetig an Bedeutung in Medizin und besitzt in der Forschung einen essentiellen Stellenwert. Analysen auf der Basis der Nukleinsäuresequenz sind sehr akkurat, weniger subjektiv und oftmals weniger zeitintensiv als vergleichsweise Kultur - basierte Methoden [ATKINS & CLARK 2004; LOPEZ *et al.*, 2003]. Zudem erlauben ständige Neuentwicklungen und Verbesserungen bereits etablierter Techniken, Zugang zu genomischen Informationen, welche bislang für klinische Anwendungen nicht zugänglich waren. Insbesondere für die personalisierte Medizin können Techniken zur Genotypisierung den Status von Nukleotidpolymorphismen offenbaren, wodurch individuelle Genome unterschieden werden können. Auch würden die Analysen auf genomischer Ebene eine effektive Medikamentierung unterstützen oder einen Einblick über die Prädisposition von bestimmten Krankheiten zulassen [SO *et al.*, 2011; YAO *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2011]. Solche diagnostischen Informationen werden üblicherweise durch Bestimmung von Präsenz, Abwesenheit oder Häufigkeit einer kurzen bekannten Sequenz ermittelt. Die Eigenschaft der Analyse von kurzen Sequenzen unterscheidet die diagnostische Vorgehensweise von generellen Sequenzierungsmethoden, welche vorwiegend für die Analyse eines langen unbekanntem Sequenzbereichs dienen [GHOSH *et al.*, 2006].

Prinzipiell benötigt eine Methode in der Nukleinsäure - Diagnostik (NAD) eine spezifische Erkennungskomponente in Kombination mit einem Signalwandler, der das Bindeereignis in eine auswertbare physikalische Größe transformiert. Die Mehrheit der etablierten Methoden für die sequenzspezifische Detektion von Nukleinsäuren basiert auf den Eigenschaften von einzelsträngiger DNA (ssDNA) in Kombination mit der Spezifität eines komplementären DNA - Stranges oder Moleküls (Abb. I - 5 A). Das komplementäre Molekül kann in der Form von ssDNA, ssRNA, Peptidnukleinsäuren (PNA) [NIELSEN 2001] oder bicyclischen *Locked* - Nukleinsäuren (LNA) [TOLSTRUP *et al.*, 2003] vorliegen. Die spezifische Hybridisierung oder Anlagerung bildet die Grundlage für hinlänglich bekannte Techniken wie Polymerasekettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primerpaaren, Southern Blot, Northern Blot, DNA - Microarrays und Fluoreszenz - *in situ* - Hybridisierung (FISH) [LEVSKY & SINGER 2003]. Neben spezifischer Hybridisierung wurden in den vergangenen Jahren auch alternative Methoden zum Lesen der Sequenzinformation entwickelt. Ein interessanter Vertreter dafür sind die niedermolekularen Pyrrol - Imidazol - Polyamide, die mit hoher Affinität und Spezifität in der kleinen Furche der dsDNA binden [DERVAN & EDELSON 2003]. Im Gegensatz dazu binden Triplex - formende DNA [CHAN & GLAZER 1997] und Zinkfinger (ZF) [SEGAL & BARBAS 2001] sequenzspezifisch in der großen Furche (Abb. I - 5 B). Für die Umwandlung der sequenzspezifischen Interaktion in ein adäquates physikalisches Signal wird ein Signalwandler benötigt. Typischerweise werden Wandler eingesetzt, die ein Signal erzeugen, das optisch oder

elektromesstechnisch ausgelesen werden kann (Abb. I - 5 A). Die wohl gebräuchlichste optische Methode ist das Auslesen des Fluoreszenzsignals. Eine Vielfalt von niedermolekularen Fluoreszenzfarbstoffen interkaliert in dsDNA oder ist optional an den komplementären ssDNA - Strang konjugiert, wie es bei Sonden für Microarrays [HOHEISEL 2006], Taq - Man Sonden oder FISH üblich ist [DE LA VEGA *et al.*, 2005].

Fluoreszenzmarkierte, eigens entwerfende PNA - Sonden, dienen der hochaffinen und spezifischen Detektion von denaturierten chromosomalen Segmenten in FISH - Experimenten [STENDER 2003]. Diese Methode ist jedoch stark limitiert, wenn die Anzahl der zu detektierenden genomischen Bereiche gering ist, was letztendlich ein schwaches Fluoreszenzsignal zur Folge hat. Alternative Strategien beruhen wiederum auf der sequenzspezifischen Interaktion in Kombination mit enzymatischer Amplifikation der DNA unmittelbar vor der Detektion. In diesem Zusammenhang sind insbesondere Methoden wie PCR und dessen abgewandelte Verfahren, wie *Strand Displacement Amplification* [AKDUMAN *et al.*, 2002] oder *Rolling Circle Amplification* [ZHAO *et al.*, 2008] zu erwähnen. Die Systematik dieser Verfahren beinhaltet jedoch immer eine initiale Denaturierung des Doppelstranges mit anschließender Hybridisierung des komplementären Primers (Abb. I - 5 A). Die Entwicklung von Methoden für die direkte Detektion von dsDNA, im Kontext struktureller Eigenschaften DNA-bindender Proteine ist bislang nur im geringen Maße vorangetrieben worden, da diese hochspezifischen Moleküle im Allgemeinen umständlicher zu konstruieren sind [GHOSH *et al.*, 2006].

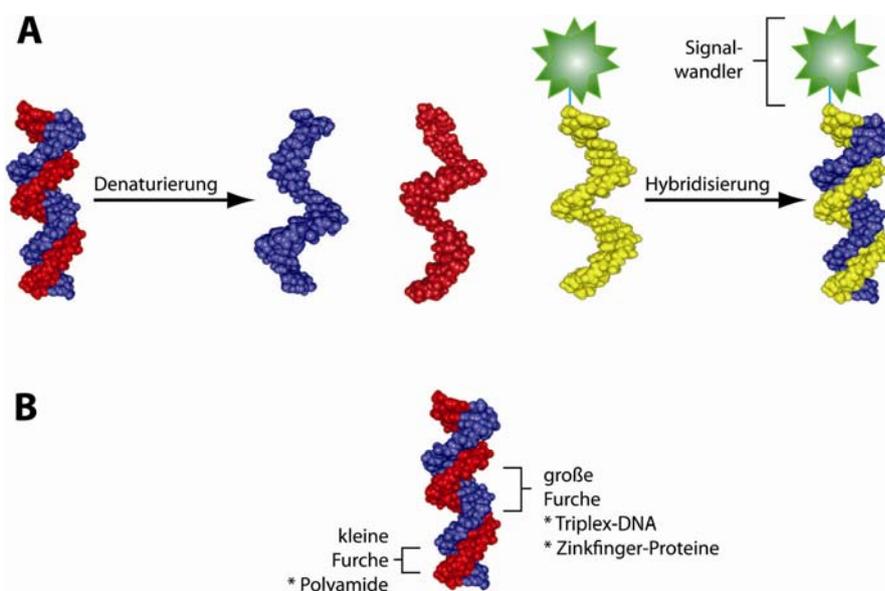


Abb. I - 5. Schematische Darstellung von Nukleinsäure - basierten Methoden in der Diagnostik. (A) Weitverbreitete Detektionsmethoden lesen die Sequenzinformation über Watson - Crick Basen - Paarung mit einem Strang (blau), wobei der Doppelstrang zunächst denaturiert wird und mit einem komplementären Strang (gelb) wiederum hybridisiert wird. Der Signalwandler konvertiert die erfolgte Interaktion in ein physikalisches Messsignal, wie z.B. Fluoreszenzintensität. (B) Alternativ kann eine direkte Detektion von dsDNA durch Interaktion mit Polyamiden in der kleinen Furche, sowie mit DNA - Gyrase oder Zinkfinger - Proteinen in der großen Furche erfolgen [adaptiert aus GOSH *et al.*, 2006].

Die spezifische Erkennung von DNA - Sequenzen durch Proteine kann aber auch nicht - enzymatisch erfolgen. Die Basis für solche neuartigen Erkennungssysteme bilden Proteine deren natürliche Funktion als Detektionsprinzip ausgenutzt wird. Durch rekombinante DNA - Technologien lassen sich heutzutage artifizielle proteinbasierte Detektionssonden verhältnismäßig unkompliziert herstellen. In Anwendungsbereichen wie Mutationsanalyse [BI *et al.*, 2005], Genom - Manipulation [CARROLL 2011] und als Signalverstärkungskomponenten für die Detektion von Amplikons [WALKER *et al.*, 1996] wurden diese Elemente bereits erfolgreich eingesetzt. Prinzipiell wurden bei den genannten Anwendungen die DNA - bindenden Domänen isoliert und mit verschiedensten funktionellen Domänen fusioniert.

Durch den modularen Aufbau von Transkriptionsfaktoren oder DNA - organisierenden Faktoren, welche in der Genregulation bzw. Strukturhaltung des Genoms eine wichtige Rolle spielen, stehen deren spezifische DNA - bindende Domänen besonders im Fokus zur Entwicklung neuartiger NAD - Assays.

3 Präanalytische Probenvorbereitung in der Nukleinsäure - Diagnostik

Vor der Durchführung eines NAD - Assays wird heutzutage eine präanalytische Probenvorbereitung durchgeführt, ein kritischer Schritt hinsichtlich der Verbesserung der Qualität der zu analysierenden Probe. Die Sensitivität und Spezifität einer diagnostischen PCR auf nicht vorbehandelte biologische Proben, wie z.B. isolierte DNA aus Blut, wird durch die Gegenwart von inhibitorischen Komponenten dramatisch reduziert. Einen solchen Effekt auf die DNA - Polymerase besitzen niedermolekulare Bestandteile wie EDTA, Heparin, Porphyrine und $H_2PO_4^{n-}$ [AL-SOUD & RADSTRÖM 2001; KREADER 1996; MORATA *et al.*, 1998]. Überdies hinaus können die coaufgereinigten Häm - Komponenten von lysierten Erythrozyten ebenso die PCR potentiell inhibieren [AKANE *et al.*, 1994a; AKANE *et al.*, 1994b]. Das Primärziel der präanalytischen Probenaufbereitung ist die Umwandlung einer komplexen biologischen Probe mitsamt ihren Nukleinsäuren in eine akzeptable Qualität für die Durchführung eines NAD - Assays. Dazu wurden in der Vergangenheit verschiedene Strategien entwickelt: (i) Optimierung der enzymatischen Amplifizierung durch Verwendung unterschiedlicher Polymerasen und Katalysatoren (*Enhancer*), (ii) Optimierung der Probenpräparation, (iii) Optimierung der Probenentnahme, (iv) Kombination von verschiedenen Nukleinsäure - Reinigungsstrategien [RADSTRÖM *et al.*, 2008]. Im Kontrast zu den oben genannten Effektoren kann die enzymatische Reaktion zum Nachweis von Fremd - DNA (z.B. bakterielle DNA) ebenfalls durch Anwesenheit von humaner genomischer DNA (gDNA) inhibiert werden, was in der Regel auch der Fall ist. Die bakterielle DNA ist naturgemäß immer stark unterrepräsentiert [COGSWELL *et al.*, 1996]. Der Schwellwert, ab dem humane gDNA einen negativen Effekt hat, muss für jeden Assayprozess neu bestimmt werden, was bislang unbeachtet blieb und daher oft zu falsch - negativen Ergebnissen führte.

Moderne präanalytische Verfahren und Werkzeuge kombinieren die selektive Anreicherung von bakterieller DNA aus Blutproben zusammen mit einer effektiven Entfernung von Komponenten, welche mit der PCR interferieren. Ein bereits evaluiertes System zur Anreicherung bakterieller Nukleinsäuren aus Blutproben besteht aus einem selektiven Lyseprozess mit sukzessiver Nukleinsäureisolation über eine Silikamatrix [HORZ *et al.*, 2010]. Eine elegante alternative Methode zur selektiven Anreicherung von bakterieller DNA aus komplexen biologischen Lösungen wird mit dem LOOXSTER™ - System erreicht. Die Diskriminierung zwischen humaner gDNA und bakterieller DNA erfolgt hier über das humane CpG - bindende Protein (CFP1), welches eine Bindepräferenz für unmethylierte CpG - Motive der Sequenz (A/C)CpG[A/C] besitzt [LEE *et al.*, 2001; VOO *et al.*, 2000]. Das Vorkommen unmethylierter CpG - Dinukleotid - Muster ist bei mikrobieller DNA um ein Vielfaches höher als vergleichsweise in der genomischen DNA von Vertebraten. Die Methylierung der 5' - CpG - Sequenz stellt eine epigenetische Modifikation dar, welche ganz typisch für Vertreter der Wirbeltiere ist. Die vorwiegend in Clustern organisierten CpG - Motive sind in Promoterbereichen von herabregulierten Genen lokalisiert [KLOSE & BIRD 2006; LARSEN *et al.*, 1992]. Durch kovalente ungerichtete Immobilisierung von CFP1 auf einer Aminoheptyl - Sepharose - Matrix konnte eine selektive Anreicherung von bakterieller DNA aus Lösungen mit einem hohen Grad an humanem gDNA - Hintergrund erzielt werden. Das Separationssystem führt zu einer signifikanten Verbesserung der Sensitivität in der NAD - Assays für Pathogene, deren Nachweis in komplexen biologischen Proben erforderlich ist. Alternative funktionelle Proteine, die eine spezifische Präferenz für prokaryotische DNA oder humane DNA aufweisen, sind bislang im Zusammenhang der präanalytischen Probenvorbereitung nicht dokumentiert.

4 Jenseits der Hybridisierung: Direkte Detektion von dsDNA

4.1 Sequenzspezifisch DNA - bindende Domänen

4.1.1 Cys₂His₂ - Zinkfinger

Das gebräuchlichste Prinzip der direkten Erkennung von dsDNA in Natur findet man bei sequenzspezifischen DNA - bindenden Proteinen. Der Großteil kodierender Bereiche im Humangenom wird durch DNA - bindende Proteine, wie Transkriptionsfaktoren und Reparaturproteine belegt [VENTER *et al.*, 2001]. Die unterschiedlichen Prinzipien der Interaktion sind aufgrund der strukturellen Eigenschaften der funktionellen Domänen innerhalb der Familie funktioneller DNA - bindender Proteine sehr verschieden. Die Kombination struktureller Elemente (Abschn. I 1.2) erzeugt räumliche Anordnungen, wodurch bestimmte AS - Seitenketten an der Oberfläche repräsentiert werden, die mit Basen oder dem negativ geladenen Zucker - Phosphat - Rückgrat in Kontakt treten.

Wie bereits erwähnt, stellt die α - Helix eine ideale Struktur für die Interaktion mit der B - DNA dar. In der Tat ist dieses strukturelle Element in zahlreichen konservierten Domänen von DNA - bindenden Proteinen wie Helix - Turn - Helix [ARAVIND *et al.*, 2005]; basische Leucin - Zipper [ALBER 1992], Helix - Loop - Helix [WEISS *et al.*, 1990], Lac - und Purinrepressoren [SCHUMACHER *et al.*, 1994] und Zinkfingern (ZF) vertreten. Insbesondere ZF vom Typ Cys₂His₂ repräsentieren die primäre spezifische DNA - bindende Struktur in eukaryotischen Transkriptionsfaktoren. Die erste ZF - Domäne (ZFD) vom Typ Cys₂His₂ wurde bei TFIIIA aus *Xenopus leavis* identifiziert und setzt sich aus insgesamt neun aufeinander folgenden ZF, wobei jeder ZF eine Sequenz aus 30 AS aufweist [BROWN *et al.*, 1985; MILLER *et al.*, 1985]. Die Charakterisierung zusätzlicher ZFD brachte schnell die konservierte Struktur der Form (F/Y) - X - C - X₂₋₅ - C - X₃ - (F/Y) - X₅ - ψ - X₂ - H - X₃₋₅ - H hervor, wobei X eine beliebige AS und ψ eine hydrophobe AS symbolisiert. Diese Strukturen bilden in Gegenwart von Zn²⁺ eine kompakte $\beta\beta\alpha$ - Struktur aus [FRANKEL *ET AL.*, 1987; LEE *ET AL.*, 1989; PARRAGA *ET AL.*, 1988; PAVLETICH & PABO 1991]. Das Zn²⁺ - Ion ist dabei tetraedisch zwischen den Cysteinenresten (Cys₂) der antiparallelen β - Faltblätter und den Histidinenresten (His₂) der α - Helix koordiniert (Abb. I - 6 A). In Abwesenheit von Zn²⁺ erfolgt kein Übergang in die ZF - typische Konformation, was letztendlich auch mit dem Ausbleiben der spezifischen DNA - Interaktion einhergeht [FRANKEL *et al.*, 1987]. Die $\beta\beta\alpha$ - Konformation von ZF besitzt eine ausgesprochen hohe Stabilität, welche überwiegend durch die Zn²⁺ - vermittelte Quervernetzung der α - Helix mit den β - Faltblättern vermittelt wird. Die Änderung der freien Enthalpie (ΔG) um - 8,8 kcal/ mol verdeutlicht die überdurchschnittliche Stabilität ordentlich gefalteter ZF [LACHENMANN *et al.*, 2002]. Die Auflösung der Kristallstruktur des eukaryotischen Transkriptionsfaktors Zif268 in DNA - assoziiertem Zustand diente als Musterbeispiel für weiterführende strukturelle Charakterisierungen der Interaktion zwischen DNA und ZFD der Mitglieder der Cys₂His₂ - Familie [PAVLETICH & PABO 1991]. Die aufgelöste Kristallstruktur des Komplexes zeigt, dass die drei hintereinander arrangierten ZF in die große Furche der DNA interkalieren (Abb. I - 6 B). Überdies hinaus zeigt sich, dass lediglich exponierte AS der N - terminalen Bereiche der jeweiligen α - Helix eines jeden Fingers mit Nukleinbasen in Kontakt treten. Jede α - Helix von Zif268 lagert sich auf die gleiche Art und Weise in die große Furche ein. Die Axen der Helices sind dabei nur näherungsweise in einer Linie mit der Furche ausgerichtet. Die β - Faltblätter treten aufgrund der Konformation des ZF nicht direkt mit den Basen in Kontakt. Aufgrund der erheblichen Distanz kann lediglich eine stabilisierende Wechselwirkung mit dem Zucker - Phosphat - Rückgrat stattfinden. In der Tat geht das Faltblatt des ersten ZF überhaupt keinen Kontakt mit der DNA ein. Ganz im Kontrast zum Faltblatt des zweiten ZF, das mit dem Zucker - Phosphat - Rückgrat entlang des DNA - Stranges hydrophobe Interaktionen eingeht [PAVLETICH & PABO 1991].

Die Mehrzahl der Basenkontakte einer α -Helix ereignet sich innerhalb eines 3 bp - Segmentes entlang des primären guaninreichen Stranges (Abb. I - 6 C). Demnach erkennt ein Polypeptid mit drei ZF eine Sequenz mit neun Basen. Zudem interagiert jeder Finger mit einem zusätzlichen Basenpaar des sekundären DNA - Stranges [PAVLETICH & PABO 1991]. Die AS - Seitenketten der Helix gehen dabei Wasserstoff - Brückenbindungen ein oder formen hydrophobe Wechselwirkungen mit den Nukleotidbasen aus. Die zusätzlichen Phosphatkontakte in der Formation des ZF - DNA - Komplexes haben jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Spezifität, scheinen aber sehr bedeutend für die Stabilität der Bindung zu sein [WOLFE *et al.*, 2000]. Die drei ZF von Zif268 sind so angeordnet, dass sich Finger 1 am 3' - Ende des Primärstranges und Finger 3 am 5' - Ende befindet (Abb. I - 6 C). Die bevorzugte Konformation der DNA nach der Interaktion mit einem ZF ist die B - Form, abgesehen von der Konformation der großen Furche, welche nach Bindung ein wenig erweitert und tiefer vorliegt. Die räumliche Erweiterung der großen Furche ist ein charakteristisches Merkmal einer Vielzahl von ZF - DNA - Komplexen, wobei diese Effekte auch bereits bei anderen Protein - DNA - Komplexen beobachtet wurden [NEKLUDOVA & PABO 1994]. Cys₂His₂ - Zinkfinger - Domänen setzen sich in der Regel aus hintereinander angeordneten Elementen zusammen, welche durch kurze Oligopeptide (Linker) verbunden sind. Basierend auf der Anzahl der Finger und deren Anordnungsmuster können diese in vier Klassen eingeteilt werden: (i) einzelner Cys₂His₂; (ii) dreifacher Cys₂His₂; (iii) mehrere aufeinanderfolgende Cys₂His₂ und (iv) separat gepaarte Cys₂His₂ [IUCHI 2001]. Ein einzelner ZF kooperiert für die Etablierung der Bindung zur Zielsequenz mit benachbarten basischen Domänen um die Bindung zu etablieren [OMICIANSKI *et al.*, 1997].

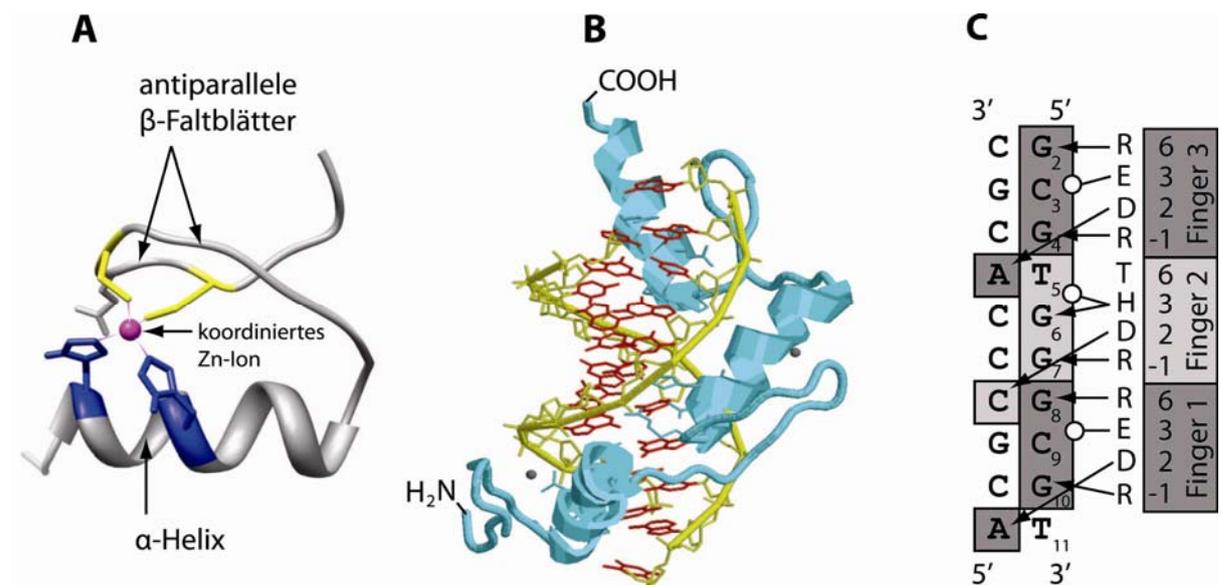


Abb. I - 6. Zinkfinger vom Typ Cys₂His₂ als DNA - bindende Strukturen. (A) Schematische Darstellung des $\beta\beta\alpha$ - Anordnung des ZF #3 von Sp1 (PDB_ID: 1SP1). (B) DNA-assoziierter ZF (Zif268) (PDB_ID: 1AAY) (C) Die Interaktion von Zif268 mit den Basen von AS - 1, 2, 3 und 6 ist schematisch dargestellt. Pfeile symbolisieren die Wasserstoffbrückenbindungen, offene Kreise kennzeichnen hydrophobe Wechselwirkungen [adaptiert aus PAVLETICH & PABO, 1991].

Die alternativen Klassen ii – iv binden ohne weitere Unterstützung von funktionellen Domänen ihre Zielsequenz. Bindeexperimente mit identischen Fingern zeigten, dass nur drei der vier Finger die vorbestimmte DNA - Sequenz binden [NAGAOKA *et al.*, 2001]. Die Bindung von drei Fingern führt zu einer leichten Krümmung der DNA, was wiederum die Bindung des vierten Fingers verhindert. Die separat gepaarten ZF können ebenfalls spezifisch ihre Zielsequenz mit einem distinkten Paar binden, ohne dass die komplette Domäne mit an der Interaktion beteiligt ist. Zusammen betrachtet erweisen sich zwei bis drei sukzessive Finger, wie bei Zif268 oder Sp1 als ideale Struktur um eine vorbestimmte DNA - Sequenz mit entsprechender Spezifität zu binden [GIDONI *et al.*, 1984; SUSKE 1999].

4.1.2 DNA - Gyrase aus *E. coli*

Eine charakteristische Topologie prokaryotischer Chromosome ist die negative, spiralförmige Verwicklung [WORCEL & BURGI 1972]. Diese Art von DNA - Verpackung ist essentiell für die Kontrolle über zelluläre Prozesse wie die DNA - Replikation und Transkription, wo eine Separation des Doppelstranges erforderlich ist. Relaxierte zirkuläre DNA wird dabei in einem ATP - abhängigen enzymatisch gekoppelten Prozess durch die DNA - Gyrase (Typ II Topoisomerase) in die negative, spiralförmige Verwicklung (*negative supercoiling*) überführt [GELLERT *et al.*, 1976]. DNA - Gyrase aus *E. coli* ist ein Heterotetramer der Form A₂B₂, bestehend aus zwei Untereinheiten A (GyrA) und B (GyrB) und einem Molekulargewicht von ~350 kDa [CHAMPOUX 2001]. Der Reaktionsmechanismus der DNA - Gyrase ist molekular relativ gut verstanden und die Kristallstrukturen der N - terminalen Domäne der GyrB (GyrB - NTD) [WIGLEY *et al.*, 1991], sowie der N - und C - terminalen Domäne der GyrA (GyrA - NTD und GyrA - CTD) wurden bereits röntgenkristallographisch aufgelöst [MORAIS CABRAL *et al.*, 1997; RUTHENBURG *et al.*, 2005]. Überdies hinaus sind die unterschiedlichen Funktionen der Domänen auch weitestgehend charakterisiert. Es ist bekannt, dass die GyrB - NTD die ATPase - Aktivität besitzt und niedermolekulare Verbindungen, wie Coumarin bindet [GILBERT & MAXWELL 1994; REECE & MAXWELL 1991]. Die CTD der GyrB ist für die Interaktion mit der GyrA verantwortlich [MORAIS CABRAL *et al.*, 1997]. Die GyrA - NTD ist die zentrale katalytische Domäne der Gyrase, welche die notwendigen enzymatischen Aktivitäten für die Strangspaltung und Religation besitzt [REECE & MAXWELL 1991]. Die Bindung bzw. Umwicklung der DNA wird durch die GyrA - CTD vermittelt [KNIGHT & SAMUELS 1999; REECE & MAXWELL 1991]. Die Kristallstruktur der 35 kDa GyrA - CTD zeigt eine Windrad - ähnliche Anordnung von sechs β - Faltblättern mit einer vorwiegend positiv - geladenen Oberfläche, eine ideale Komposition von charakteristischen Sekundärstrukturen für die Interaktion mit negativ geladenen Nukleinsäuren (Abb. I - 7). Die Assoziation der Gyrase und DNA wird einzig und allein bei Prokaryoten durch GyrA - CTD vermittelt, ganz im Gegensatz zu den eukaryotischen CTD vom Typ II - Topoisomerasen, welche

vermutlich vollkommen andere Funktionen ausüben [AUSTIN & MARSH 1998; CARON & WANG 1994a; CARON *et al.*, 1994b]. Eine isolierte bakterielle GyrA - CTD wickelt förmlich die DNA um sich herum (*wrapping*), ein kritischer Vorgang der die Richtung für das *supercoiling* vorgibt [RUTHENBURG *et al.*, 2005]. Die selektive Deletion der GyrA - CTD aus *E. coli* - Gyrase resultiert im vollständigen Verlust der Aktivität zur Einführung von (-) *supercoils* bei relaxierter, negativ gewundener DNA.

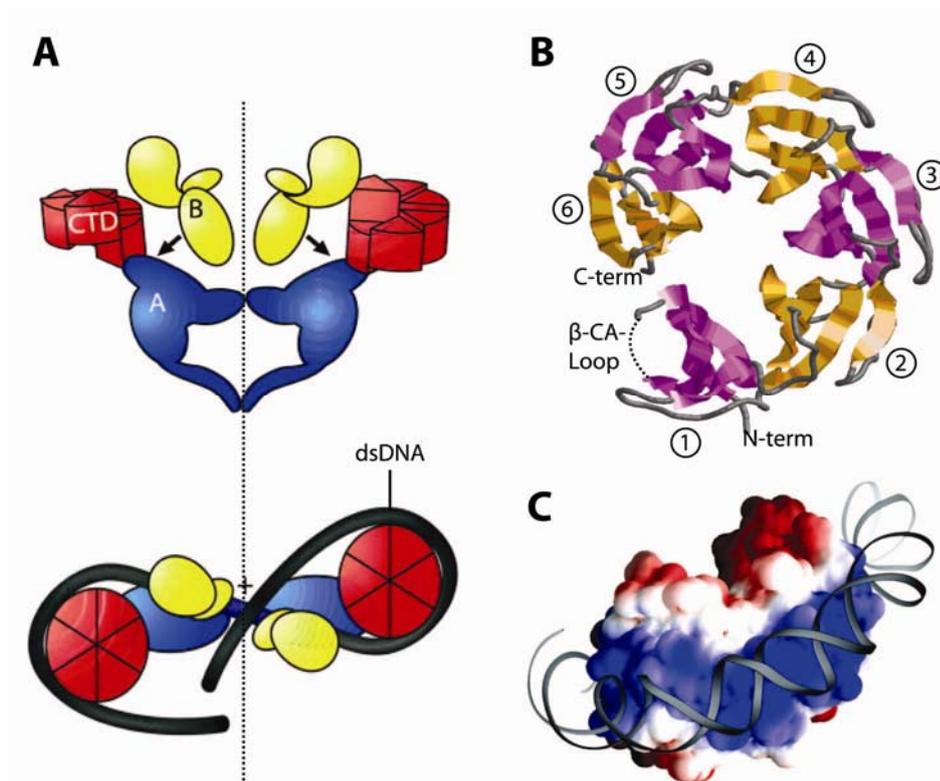


Abb. I - 7. Das DNA - Gyrase - Heterotetramer (A_2B_2) aus *E. coli* und die Interaktion mit dsDNA. (A) Schematische Darstellung der vollständigen bakteriellen DNA Gyrase. Die initiale Interaktion der DNA erfolgt über die GyrA - CTD (*rot*), welche aus sechs Segmenten besteht. Die Draufsicht (A unten) verdeutlicht die kooperative Interaktion der GyrA - CTD mit der DNA. *Blau* – gyrA - NTD; *gelb* – GyrB. (B) Kristall - Struktur der GyrA - CTD mit dem gestörten β - CA - Loop (gestrichelte Linie). Die antiparallelen β - Faltblatt - Segmente sind mit 1 - 6 durchnummeriert (PDB_ID: 1ZI0; modifiziert mit RasMol). (C) Ein vorgeschlagenes Modell von RUTHENBURG *et al.* (2005), wie sich die dsDNA um die GyrA - CTD windet um rechtsgerichtete Orientierung in den Strang einzubringen. Das Modell basiert auf der Berechnung des elektrostatischen Potentials der Oberfläche von GyrA - CTD. *blau* - positiv; *rot* - negativ, *weis* - neutral. [A und C übernommen aus RUTHENBURG *et al.*, 2005]

Eine besondere Eigenschaft der *E. coli* Gyrase zeigt sich in der Präferenz für (+) *supercoiled* DNA [BATES *et al.*, 1996], sowie der hohen Affinität für repetitive, extragene Palindrome (REP) [YANG & AMES 1988]. Die Familie der REPs wurde erstmalig auf Chromosomen von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* entdeckt, wo sie einen signifikanten Anteil (-1 %) des Genoms belegen [STERN *et al.*, 1984]. Die Familie setzt sich aus hunderten Kopien zusammen, welche über das gesamte Genom verteilt sind, wobei die REPs immer außerhalb von Struktur - Genen lokalisiert sind.

Funktionelle REP - Elemente setzen sich aus zwei bis vier einzelnen REP - Sequenzen zusammen, welche mit bis zu 200 Kopien auf einem Chromosom auftreten können [YANG & AMES 1988]. Aufgrund der hohen Spezifität der DNA - Gyrase zu REP - Motiven in Kombination mit topologischen Eigenschaften von bakterieller DNA könnte die GyrA - CTD ein neuer geeigneter Kandidat für die direkte Detektion von Nukleinsäuren prokaryotischen Ursprungs darstellen.

5 Biohybride Technologien - Immobilisierung von Proteinen

5.1 Immobilisierung von Proteinen im Bereich Biochips und Arrays

Substantieller Fortschritt auf dem Bereich der Immobilisierung von Biomolekülen auf festen Oberflächen führte zur Etablierung von anwendungsbereiten Plattformen für anspruchsvolle Aufgaben in biologischen und medizinischen Bereichen. Als repräsentatives Beispiel dienen an dieser Stelle die DNA - Mikroarrays als gängige Werkzeuge für Analysen unterschiedlichster Art auf genomischer oder RNA - Ebene. Neben der mittlerweile sehr etablierten Herstellung von DNA - Mikroarrays besteht der große Nachteil in der Hybridisierung von komplementären Einzelsträngen zu deren Nachweis. Die optimalen Prozessparameter sind mitunter nicht problemlos zu bestimmen, da die Sequenzkomposition und Länge der immobilisierten Oligomere die Hybridisierungsparameter maßgeblich beeinflussen. Die Etablierung von Proteinchips für eine direkte Detektion von bspw. dsDNA stellt daher eine sinnvolle Alternative zu herkömmlichen Ansätzen der DNA - Diagnostik dar.

Proteinchips sind definiert als planare Oberflächen auf der immobilisierte Proteine repräsentiert werden die sinngemäß als Erkennungselemente für Proteine, Nukleinsäuren oder niedermolekulare Stoffe dienen können [LUEKING *et al.*, 2005]. Die Detektion der Interaktion zwischen Ligand und Analyt erfolgt für gewöhnlich über etablierte Detektionsformate, wie *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) oder Oberflächenplasmonresonanz [LEE *et al.*, 2005]. Die Umwandlung des Signals erfolgt bei labelbasierten Methoden wie ELISAs prinzipiell über ein Fluorophor [STERN *et al.*, 1984] oder indirekt über eine enzymatische Reaktion [MENDOZA *et al.*, 1999].

Das vielversprechende Konzept des Proteinbiochips benötigt mehr Schritte in der Konstruktion und ist somit komplexer als vergleichsweise DNA - Arrays in der Herstellung. Dies ist vorwiegend begründet durch die sensitive Natur von Proteinen, welche häufig durch eine chemische Behandlung und Immobilisierung denaturieren [NIEMEYER 2002; PREDKI 2004]. Die eigentliche Herausforderung in der Generierung eines Proteinbiochips besteht in der optimalen Kombination aus einem geeigneten Substrat (Glas, Gold, Polystyrol, Silicon) und einer entsprechenden Oberflächenchemie, die kompatibel mit dem verwendeten Protein ist um dessen Integrität, native Konformation und letztendlich dessen biologische Funktion zu erhalten [KUSNEZOW & HOHEISEL 2003a; KUSNEZOW *et al.*, 2003b].

Eine weitere wichtige Rolle bei der Kopplung von Proteinen an der Oberfläche spielt die Kontrolle der chemischen Selektivität, d.h. welche funktionellen Gruppen oder Tags an der Immobilisierung beteiligt sind. Mit Hilfe der chemischen Selektivität lässt sich ebenso die Orientierung des Proteins zur Oberfläche bestimmen [LIN *et al.*, 2006; LUK *et al.*, 2004].

5.2 Die Anforderung an die Oberflächenchemie

Wie bereits angedeutet, besteht die große Herausforderung in der Entwicklung eines Proteinarrays in der Auswahl der optimalen Oberflächenchemie, welche Proteine in ihrer nativen Funktion nicht beeinträchtigt. Das erste Problem stellt der „Hintergrund“ dar. Proteine tendieren generell zur unspezifischen Adsorption auf festen Oberflächen [NAKANISHI *et al.*, 2001]. Die formelle Interaktion Protein/ Oberfläche wird naturgemäß durch hydrophobe Domänen, Oberflächenladungen und Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt. Die hydrophobe Interaktion (van der Waals) ist die vorherrschende Kraft und somit die primäre Ursache für die Ablagerung von Proteinen auf Oberflächen. Die exzessive Interaktion zwischen Protein und einer festen Oberfläche resultiert in der Störung der dreidimensionalen Struktur verbunden mit Denaturierung. Somit kommt man schnell zum zweiten Problem der Proteinimmobilisierung: Konformation/ Orientierung. Die Wahrscheinlichkeit einer ungünstigen Orientierung des Proteins ist ohne entsprechende Oberflächenchemie oder Modifikationen des Proteins sehr hoch. Idealerweise sollte eine zu funktionalisierende Oberfläche die folgenden Kriterien erfüllen: (i) die Oberfläche ist chemisch inert und vermittelt keine unspezifische Adsorption; (ii) die Oberfläche repräsentiert funktionelle Gruppen für die Immobilisierung von Proteinen; (iii) die Bindung zur Oberfläche ist stark genug um das Protein auf der Oberfläche zu fixieren ohne dabei die 3D - Struktur zu zerstören; (iv) die Kopplungsstrategie erlaubt die gerichtete Immobilisierung [PREDKI 2007]. Ein oft verwendetes Substrat für die Herstellung von Proteinarrays stellt Glas dar, wie es bereits bei DNA - Arrays verwendet wird. Die Verfügbarkeit des Materials, Oberflächenbeschaffenheit, Mikrorauigkeit, Transparenz sowie die unkomplizierte chemische Modifikation der Oberfläche sind die Eigenschaften, welche für die Anwendung im biohybriden Bereich wichtig sind [CHEUNG *et al.*, 1999; HOLLOWAY *et al.*, 2002; SOUTHERN *et al.*, 1999]. Die Modifizierung von Glasoberflächen zur Einführung funktioneller chemischer Gruppen wurde bereits für DNA - Arrays entwickelt. Dabei zeigte sich, dass reaktive Silanolgruppen auf der Glasoberfläche (Si - OH) sich für Modifikation ausgezeichnet eignen. Diese Gruppen können mit organofunktionalen Silanen, der generellen Struktur $(RO)_3Si(CH_2)_nX$, reagieren um neue funktionelle Gruppen einzuführen. Die neu eingeführten Gruppen (entweder Amino, Thiol, Carboxyl, usw.) stehen dann für nachfolgende Immobilisierungsstrategien zur Verfügung [JONKHEIJM *et al.*, 2008].

5.3 Ungerichtete oder gerichtete Immobilisierung von Proteinen

Die Immobilisierung von Proteinen kann kovalent (irreversibel) oder nicht kovalent (reversibel) erfolgen, wobei durchaus spezifische oder zufällig verteilte Konjugationen am Protein erzeugt werden können. Unspezifische physische Adsorption oder chemische Quervernetzung mit geeigneten Oberflächen resultiert in der zufälligen Orientierung des Proteins. Spezifische Kopplung unter Verwendung definierter funktioneller Gruppen erzeugt eine definiertere Anordnung und erlaubt zudem den Einsatz von Platzhaltern (*Spacer*) und Quervernetzern (*Linker*) um sterisch ungünstige Orientierung zwischen Protein und Oberfläche zu minimieren [CAMARERO 2008; HERMANSON 2008; RUSMINI *et al.*, 2007]. Im Fall der kovalenten, ungerichteten Immobilisierung werden vorwiegend funktionelle Gruppen wie z.B. die Aminogruppe der Lysinseitenkette adressiert. Diese reagieren mit funktionellen Gruppen auf der Oberfläche, wie z.B. Aldehyde [KNIGHT & SAMUELS 1999], Isothiocyanate [GROLL *et al.*, 2004], Epoxide [MATEO *et al.*, 2003] oder aktivierte N - Hydroxysuccinimid (NHS) - Ester [YAM *et al.*, 2006]. Das unkontrollierte Konjugieren von Enzymen oder Antikörpern führt meist zur Blockierung des aktiven Zentrums bzw. der Bindeaktivität und somit zur verminderten Aktivität oder zur Maskierung von Interaktionsdomänen für andere Proteine, Nukleinsäuren oder niedermolekulare Stoffe. Dieser Umstand ist die Grundlage für falsch - negative oder sehr heterogene Daten [CHA *et al.*, 2005].

Als Alternative zur kovalenten Immobilisierung besteht die Möglichkeit Proteine unspezifisch und nicht kovalent auf Oberflächen über hydrophobe, ionische oder polare Wechselwirkungen adsorbieren zu lassen. Die auch als Physisorption bezeichnete Strategie der Immobilisierung mit zufälliger Orientierung auf hydrophoben Polystyrol - Mikrotiterplatten ist wohl die bekannteste Immobilisierungsstrategie für Proteine auf festen Oberflächen [INOUE 1973]. Dennoch sollte, wenn immer die Möglichkeit besteht, die vorteilhaftere gerichtete Immobilisierung des Proteins erfolgen um dessen Aktivität oder Bindeeigenschaften zu erhalten. Zahlreiche Strategien sind dazu in der Literatur zu finden. Die Vielseitigkeit von Fusionspartnern zur Affinitätsaufreinigung von Proteinen wurde für die nicht kovalente gerichtete Immobilisierung auf festen Oberflächen adaptiert.

Populäre Beispiele als Fusionspartner in Kopplungsstrategien sind Glutathion - S - Transferase (GST) [MARTZEN *et al.*, 1999], FLAG - Tag [STITOU *et al.*, 1999], Histidin - Tag (His_6) [SCHMITT *et al.*, 1993] und Maltose - bindendes Protein (MBP) [RIGGS 2000]. Der Vorteil in der Anwendung von Affinitätstags gegenüber kovalenter Kopplungschemie besteht in der Spezifität und Ausrichtung der supramolekularen Interaktion. Die Reversibilität der Bindung an Oberflächen kann zudem ein sehr wichtiger ökonomischer Aspekt sein, da sich reversibel modifizierte Oberflächen unkompliziert regenerieren lassen [JONKHEIJM *et al.*, 2008].

Die Interaktion von Protein A oder Protein G mit der Fc - Region von IgG ist ebenfalls eine effektive Methode der nicht kovalenten gerichteten Immobilisierung von Antikörpern auf festen Oberflächen.

Diese Methode sichert die freie Verfügbarkeit der Epitop - bindenden Region von IgG. Der limitierende Faktor bei dieser Strategie ist die suboptimale Orientierung von Protein A oder G an der Oberfläche, was letztendlich die Bindekapazität für IgG beeinträchtigen kann [DUBURCQ *et al.*, 2004; MELNYK *et al.*, 2002]. Weitere effektive Strategien für die nicht - kovalente Immobilisierung von Proteinen sind ausführlich in JONKHEIJM *et al.* (2008) und in dem Standardwerk von HERMANSON (2008) beschrieben.

Die chemiselektive kovalente Kopplung über die exponierten AS führt typischerweise zu einer breiten Verteilung von modifizierten Gruppen über die gesamte Oberfläche. Daher erfolgt die Kopplung simultan über mehrere Gruppen und erzeugt eine gewisse Heterogenität in der Orientierung von immobilisierten Proteinen [HUANG *et al.*, 1997]. Neuartige Methoden für chemiselektive gerichtete Kopplung von Proteinen auf Oberflächen beruht auf Ligationsreaktionen, welche ursprünglich für die Synthese und selektive Derivatisierung von Proteinen entwickelt wurden [CAMARERO 2007; MUIR 2003]. Prinzipiell wird bei all diesen Strategien ein Derivat des Zielproteins hergestellt, welches eine spezifische Gruppe an einer definierten Position besitzt. Diese reagiert dann selektiv mit der komplementären Gruppe auf der festen Oberfläche.

6 Zielsetzung

Das Potential von nativen ZFD und DNA - modulierenden Proteinen wie *gyrA* für die Anwendung in neuen NAD - Assays gilt es im Rahmen dieser Arbeit experimentell zu bestimmen. Dazu sollen zunächst Fusionsproteine mit den genannten Domänen entworfen und kloniert werden, welche eine Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Systemen zulassen. Der Fokus für die DNA - bindende Domäne der Fusionsproteine liegt zum einen auf den humanen ZF Sp1 und Sp3 und zum anderen auf der *gyrA* - CTD aus *E. coli*. Als Fusionspartner sollen MBP bzw. EGFP verwendet werden. Im Zusammenhang mit einer späteren regioselektiven Immobilisierung von Fusionsproteinen soll zudem ein Derivat von MBP generiert werden, welches N - terminal acht zusätzliche Lysine aufweist. Im Anschluss an die erfolgreiche Aufreinigung sollen die Fusionsproteine mit unterschiedlichen Methoden auf ihre Funktionalität und Spezifität eine definierte DNA - Sequenz zu binden, hin analysiert werden.

Nach positiven Resultaten über die Funktionalität der Fusionsproteine sollen nachfolgend insbesondere die ZF aus prokaryotischer Expression für Immobilisierungsstrategien auf Glassubstraten mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen eingesetzt werden. Hierbei soll vor allem die Frage nach der geeigneten Kopplungsstrategie, sowie der Bindeeigenschaft zur dsDNA nach der Immobilisierung beantwortet werden. Alternativ zur Kopplung auf Glassubstraten, bietet sich auch die Möglichkeit der Immobilisierung in Mikrotiterplatten. Dieses Konzept soll in einem einfachen Assay zur Detektion von PCR - Produkten mit Hilfe der ZF - Fusionsproteine überprüft werden.

Das Prinzip der Anreicherung von bakterieller DNA mit Hilfe der *gyrA* - CTD soll ebenso im Rahmen dieser Arbeit als zweites Teilprojekt umgesetzt werden. Die Arbeitshypothese in diesem Teilprojekt lautet: Wenn die *gyrA* - CTD spezifisch für Prokaryoten wie *E. coli* oder *S. aureus* ist, differenziert jene auch humane von bakterieller DNA in einer komplexen Lösung? Dazu soll die *gyrA* - CTD in einfachen Bindeassays zunächst auf deren Funktionalität untersucht werden. Liegt ein funktionelles Protein vor, soll ein Verfahren entwickelt werden, dass eine magnetische Separation von bakterieller und humaner gDNA zulässt. Es gilt zudem herauszufinden, welche simple Immobilisierungsstrategie in Kombination mit Magnetpartikeln sich für reproduzierbare Assays zur Anreicherung von bakterieller DNA aus einer komplexen Lösung eignet.

II MATERIAL UND METHODEN

1 Materialien

1.1 Chemikalien

Alle Standardchemikalien und biologisch aktive Reagenzien wurden über Sigma Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe), NEB (Höchst), Promega (Mannheim) oder Fermentas (St. Leon - Rot) bezogen. Es wurden für alle Experimente nur Stoffe in p.A. - Qualität verwendet.

1.2 Antikörper

anti MBP, Maus monoklonal	New England Biolabs
Kaninchen anti GFP	Dianova
Ziege anti Maus, HRP konj.	Dako
Ziege anti Kaninchen, HRP konj.	Dako
Ziege anti Maus, Cy3 konj.	Dianova

1.3 Enzyme

T4 DNA - Ligase.....	Fermentas, Promega
<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>	Fermentas
<i>Taq</i> Polymerase	PeqLab
<i>High Fidelity Polymerase Mix</i>	Roche
Restriktionsendonukleasen.....	New England Biolabs
RNaseA	Sigma Aldrich
Lysozym	Carl Roth
DNaseI	Sigma Aldrich
M - MLV Reverse Transcriptase	Promega
HRP - Streptavidin konj. Polymer	Sigma Aldrich

1.4 Puffer, Medien und Lösungen

Die verwendeten Lösungen, Puffer oder Medien sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt. Bei der Herstellung wurde ausschließlich ddH₂O verwendet. Die Puffer für Zellkultur und molekularbiologische Anwendungen wurden bei Raumtemperatur gelagert und Medien für Zellkultur und Bakterienkulturen bei 4 °C. Vor Verwendung eigens hergestellter Lösungen wurden diese durch einen 0,22 µm - Filter steril filtriert und wenn nötig entgast.

1.5 Oligonukleotide

Die angegebenen Oligonukleotide wurden über Sigma Aldrich bezogen und sind in 5' → 3' - Richtung angegeben. Alle Oligos wurden über Umkehrphase aufgereinigt und wenn nicht anders angegeben in ddH₂O vor der Verwendung gelöst. Konjugationen mit Fluorophoren oder Biotin wurden immer am 5' - Terminus des entsprechenden Oligos durchgeführt. Die Langzeitlagerung erfolgte bei - 20 °C.

Tab. II - 1. Oligonukleotidsequenzen

VERWENDUNG / BEZEICHNUNG	SEQUENZ (5' → 3')
PCR & Klonierung	
Sp1 ZFD <i>Sal</i> I fw	GGGGATCCTGGCAAAAAGAAACAG
Sp1 ZFD rev Stop <i>Hind</i> III	TAAAAGCTTTTAAAGCTACACCTGGGCCTCCCTTCTT
Sp3 ZFD <i>Bgl</i> II fw	AGATCTAGAGGTACCAATCTTGGGAAAAAGAAG
Sp3 ZFD Stop <i>Hind</i> III rev	AAGCTTCTAAATACCTTTTTTATTCTGGTGTG
8xLys MBP Sp1 fw	CATATGAGAGGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAATCGAAGAAGGTAA
hGAPDH fw	TGCACCACCAACTGCTTAGC
hGAPDH rev	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<i>gyrA</i> <i>Bam</i> HI fw	GTCGACATTAAGAAGAAGACTTTATCGAC
<i>gyrA</i> Stop <i>Hind</i> III rev	AAGCTTTTATTCTTCTTCTGGCTCGTCGTC
EGFP - Sp3 fw	GGATCACTCTCGGCATGG
EGFP - Sp3 rev	GTGTTGCTTCTTTTCCCAAG
16S_Stau_95 - 110_F	GATGTTAGCGGCGGAC
16S_Stau_284 - 300_R	TCTCAGGTCGGCTATGC
Gram neg. <i>E. coli</i>	ATGACGTCAAGTCATCATGG
DG74	AGGAGGTGATCCAACCGCA
Protein - DNA - Interaktion	
GC - Box fw	TCGCTTGAAATGTTGCGACGCTTAGATCACAGGGGCGGGGTCGGCGCAGA
GC - Box rev	TCTGCGCCGACCCCGCCCTGTGATCTAAGCGTCGCAACATTTCAAGCGA
ΔGC - Box fw	TCGCTTGAAATGTTGCGACGCTTAGATCACAGAGGCGGGGTCGGCGCAGA
ΔGC - Box rev	TCTGCGCCGACCCCGCCTCTGTGATCTAAGCGTCGCAACATTTCAAGCGA
GC - Box Cy3 fw	[Cy3] TCGCTTGAAATGTTGCGACGCTTAGATCACAGGGGCGGGGTCGGCGCAGA
GC - Box Cy3 rev	[Cy3] TCTGCGCCGACCCCGCCCTGTGATCTAAGCGTCGCAACATTTCAAGCGA
Δ3 GC - Box fw	TCGCTTGAAATGTTGCGACGCTTAGATCACAAAGGTCGGGATCGGGCGCAGA
Δ3 GC - Box rev	TCTGCGCCGATCCCGACCTTGTGATCTAAGCGTCGCAACATTTCAAGCGA
Δ8 GC - Box fw	TCGCTTGAAATGTTGCGACGCTTAGATCACAAATATTCTAATCGGGCGCAGA
Δ8 GC - Box rev	TCTGCGCCGATTAGAATATTGTGATCTAAGCGTCGCAACATTTCAAGCGA
GC - Box Btn fw	[Btn] TCGCTTGAAATGTTGCGACGCTTAGATCACAGGGGCGGGGTCGGCGCAGA
Δ3 GC - Box Btn fw	[Btn] TCGCTTGAAATGTTGCGACGCTTAGATCACAAAGGTCGGGATCGGGCGCAGA
ΔGC - Box Btn fw	[Btn] TCGCTTGAAATGTTGCGACGCTTAGATCACAAATATTCTAATCGGGCGCAGA
<i>gyrA</i> Btn fw (FM)	[Btn] AGCTTAGCGGGTCATTTACGCGCGCGACGCGCGCTTCACGGGCACGGGCAGCAT
<i>gyrA</i> Btn rev (FM)	[Btn] ATGCTGCCCGTGCCCGTGAAGCGGCGCGTCGCGCGCTGAAATGACCCGCTAAGCT
<i>gyrA</i> Btn fw (NM)	[Btn] AGATTTGAAAAATAAATTAATAATAATTTAATAATGATATTTGAA
<i>gyrA</i> Cy3 rev (NM)	[Cy3] TTCAAATATATCATTATTAATTTAATTTAATTTAATTTTCAAACTCT

2 Bakterienstämme

Die Derivate des *E. coli* - Stammes K12, XL1 - *Blue* und DH5 α , wurden für rekombinante DNA - Techniken eingesetzt. Der Stamm BL21(DE3) wurde für die Proteinexpression verwendet.

Tab. II - 2. Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
XL1 - <i>Blue</i>	endA1 gyrA96(nal ^R) thi - 1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ (lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)
DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi - 1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA - argF) U169, hsdR17 (r _K ⁻ m _K ⁺), λ -
BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5 - T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Kultivierung von *E. coli*

Kultivierung in flüssigen Medien

Die Kultivierung von *E. coli* zur Herstellung von Starterkulturen oder Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab erfolgte in 15 ml - Zellkulturröhrchen (Greiner). Dazu wurden 5 ml LB - Medium, je nach Vorhaben mit oder ohne Antibiotika, durch eine einzelne Bakterienkolonie angeimpft. Die Kultur wurde im Schüttler (9 h, 240 U/ min, 37 °C) inkubiert. Bis zur Weiterverwendung oder Plasmidisolierung wurde die Kultur bei 4 °C aufbewahrt.

Üblicherweise wurden größere Kulturen mit (bis zu 500 ml) in entsprechenden Erlenmeyerkolben mit der Starterkultur, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindet, inokuliert (1 : 100) und im Schüttler (9 h, 240 U/min, 37 °C) bis zum Erreichen der erforderlichen optischen Dichte inkubiert. Die Biomasse wurde nun mittels Zentrifugation (3 min, 4600 U/ min, 4 °C, Eppendorf 5810 R) in 50 ml - Röhrchen (Greiner) vom Medium separiert und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 C gelagert.

Kultivierung auf festen Medien

Zur Gewinnung einzelner Bakterienkolonien wurden LB - Agarplatten präpariert. Die Herstellung der Platten erforderte 100 mm - Kulturschalen (Greiner), welche mit 35 ml LB - Agar aufgefüllt wurden. Die Agarplatten wurden mittels herkömmlichen mikrobiologischen Techniken angeimpft und im Brutschrank (37 °C) 8 - 10 h inkubiert.

LB - Medium 10 g/ L Trypton; 5 g/ L Hefeextrakt; 5 g/ L NaCl, 1 L ddH₂O; autoklaviert; 4 °C

LB - Amp wie LB - Medium zzgl. 100 μ g/ ml Ampicillin

LB - Kan wie LB - Medium zzgl. 50 μ g/ ml Kanamycin

LB - Agar LB - Medium; 15 g/ L Agar; autoklaviert, 4 °C

Zugabe von Selektions - Antibiotika nach Abkühlung auf ca. 50 °C

3.2 Generierung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Ein Volumen von 100 ml LB - Medium wurde mit 500 µl einer frischen Starterkultur von *E. coli* inokuliert. Die Kultur wurde bis zu einer $OD_{600} = 0,45 - 0,55$ im Schüttler (240 U/ min, 37 °C) inkubiert, für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend in einem 50 ml - Röhrchen abzentrifugiert (10 min; 4600 U/ min, 4 °C, Eppendorf 5810 R). Das Zellpellet wurde in 20 ml TFB I resuspendiert und für 10 min auf Eis gehalten. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min; 2000 U/ min; 4 °C, Eppendorf 5810 R) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 4 ml eiskaltem TFB II aufgenommen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße (50 µl - Aliquots) aufgeteilt und im flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Für eine Transformation wurden 50 µl chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Die Bakteriensuspension wurde mit 1 µg Plasmid - DNA oder mit 2 µl Ligationsansatz versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock (1 min; 42 °C) und eine anschließende Inkubation auf Eis für 2 min. Zur Regeneration wurde die Bakteriensuspension mit 400 µl LB - Medium aufgefüllt und für 1 h (37 °C; 700 U/ min) im Thermomixer inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1 min; 4000 U/ min) und das Zellpellet in 100 µl LB - Medium resuspendiert. Die transformierten Bakterien wurden schließlich auf eine LB - Agarplatte, welche nach Bedarf das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Handelte es sich um eine Blau - Weiss - Selektion, so wurden für das Ausplattieren IPTG/ X - Gal - beschichtete Agarplatten verwendet.

TFB I.....	50 mM MnCl ₂ ; 10 mM KCl; 10 mM CaCl ₂ ; 15 (v/ v) Glycerol; 30 mM KOAc pH 6,1; steril filtriert; 4 °C
TFB II	5 mM CaCl ₂ ; 10 mM KCl; 10 mM MOPS; 15 % (v/ v) Glycerin pH 7,0; steril filtriert; 4 °C
IPTG	100 mM in ddH ₂ O, Lagerung bei - 20 °C; 40 µl auf LB - Agar ausgestrichen
X - Gal.....	20 mg/ ml in DMSO, Lagerung bei - 20 °C, 40 µl auf LB - Agar ausgestrichen

3.3 Präparative Plasmidaufreinigung

Zur Isolation von Plasmid - DNA aus *E. coli* wurde die modifizierte Methode der alkalischen Lyse angewandt [BIRNBOIM & DOLY 1979]. Dazu wurden 250 ml LB - Medium mit 1 ml einer Starterkultur des entsprechenden transformierten *E. coli* - Stammes angeimpft und über Nacht im Schüttler (240 U/ min; 37 °C) inkubiert. Die getrübe Kultur ($OD_{600} \sim 4$) wurde in einem 50 ml - Röhrchen pelletiert (10 min; 4000 U/ min; 4 °C, Eppendorf 5810 R) und anschließend in 4 ml Glc/Tris/EDTA (GTE) - Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Lysozym erfolgte eine Inkubation für 30 min bei RT. Zur parallelen enzymatischen Degradierung von RNA wurde der Suspension 1 µl einer RNaseA - Lösung zugesetzt. Nach der Zugabe von 10 ml einer frisch hergestellten NaOH/ SDS und ausreichender Durchmischung folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min.

Durch anschließende Zugabe von 7,5 ml NaAc wurden Proteinkomplexe ausgefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (30 min; 4600 U/ min; 4 °C) und der klare Überstand durch Filtration mit Faltenfilter (Whatman) von restlichem Zellmaterial getrennt. Die Präzipitation der Plasmid - DNA erfolgte durch Zugabe von 0,6 vol. Isopropanol mit anschließender Inkubation für 20 min auf Eis. Die ausgefällte Plasmid - DNA wurde abzentrifugiert (10 min; 4600 U/ min; 4 °C, Eppendorf 5810 R), der Überstand verworfen und das DNA - Pellet mit Ethanol (70 % [v/ v]) gewaschen. Das DNA - Pellet wurde im Anschluss bei RT getrocknet und in 500 µl ddH₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei - 20 °C.

GTE - Puffer 50 mM Glucose; 50 mM Tris - Base; pH 8
10 mM EDTA; steril filtriert, Lagerung bei 4 °C
NaOH/ SDS..... 0,2 M NaOH; 1 % (w/ v) SDS
NaAc 3 M NaAc; 5 ml 90 % Ameisensäure; pH 5,5
RNaseA..... 10 mg RNaseA in 1 ml GTE - Puffer
Lagerung bei - 20 °C
Lysozym..... 20 mg/ ml in GTE - Puffer

3.4 Extraktion von Nukleinsäure - Fragmenten aus Agarosegelen

Amplikons aus PCR - Reaktionen oder DNA - Fragmente aus präparativen Restriktionsansätzen wurden mit dem NucleoSpin™ Extract II - System (Macherey - Nagel) aus der Agarosematrix, gemäß den Herstellerangaben isoliert.

3.5 Modifizierte Phenol/ Chloroform/ Isoamyl - Extraktion von Nukleinsäuren

Die präparative Isolierung von enzymatisch geschnittenen Plasmiden erfolgte mittels einer modifizierten Methode über Phasentrennung [KAPPEL *et al.*, 2007]. Hierbei wurde der Restriktionsansatz mit ddH₂O auf 200 µl aufgefüllt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zugabe von 200 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamyl - Gemisch (25:24:1 [v/ v/ v], Appllichem) und anschließender Zentrifugation (3 min; 14000 U/ min; RT, Eppendorf 5418 R). Parallel dazu wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 40 µl MSKAT - Puffer vorgelegt. Die durch Zentrifugation entstandene obere wässrige Phase wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen (ca. 200 µl) und zum vorgelegten MSKAT - Puffer überführt und gut durchmischt. Die DNA wurde durch Zugabe von 800 µl eiskaltem Ethanol (abs.) und Inkubation (- 20 °C; 10 min) ausgefällt. Das DNA - Pellet wurde im Anschluß mit Ethanol (70 %) gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl ddH₂O gelöst.

MSKAT - Puffer..... 4 mM MgCl₂; 2 M NaAc; 33 mM KCl
20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,4 M Tris - Base (pH 8,0)

3.6 Isolierung von gesamt - RNA aus eukaryotischen Zellen

Adhärente Zellen wurden mit eiskaltem PBS einmal gewaschen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 1 ml TRIzol™/ 3×10^6 Zellen (Invitrogen). Die Suspension wurde mit der Pipette gut durchmischt und anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und im Vortexer nochmals gut durchmischt. Nach Inkubation (5 min; RT) und Zugabe von 200 µl Chloroform und nochmaligen Durchmischen wurden die Phasen durch Zentrifugation (15 min; 12000 U/ min; 4 °C, Eppendorf 5418 R) separiert. Die obere wässrige Phase wurde mit einer Filterpipette in ein neues 1,5 ml - Reaktionsgefäß überführt. Die isolierte RNA wurde dann durch Zugabe von 500 µl Isopropanol ausgefällt (10 min; RT). Zur Separation der ausgefällten RNA wurde zentrifugiert (10 min; 12000 U/ min; 4 °C, Eppendorf 5418 R). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die RNA mit DEPC - Ethanol (75 %) gewaschen. Die RNA wurde anschließend luftgetrocknet (10 min; RT) und in Formamid - DEPC - H₂O gelöst. Die Integrität der isolierten RNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese auf einem 1 %igen Gel (Abschn. II 3.10).

PBS.....	1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8,5 mM Na ₂ HPO ₄ 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4 autoklaviert, steril filtriert
Formamid - DEPC - H ₂ O.....	40 % (v/ v) Formamid in DEPC - H ₂ O
DEPC - H ₂ O.....	0,1 % (v/ v) DEPC in ddH ₂ O; steril filtriert
DEPC - Ethanol.....	75 % EtOH; 0,1 % (v/ v) DEPC; steril filtriert

3.7 Isolierung humaner genomischer DNA

Für die Isolierung von humaner gDNA wurden 3×10^6 Zellen HEK293 eingesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und trypsiniert. Die Reaktion wurde mit PBS - EDTA abgestoppt und die Zellen anschließend zentrifugiert (800 U/ min, 5 min, RT, Heraeus Multifuge 3SR, Thermo Scientific). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert. Die Isolierung der gDNA erfolgte mit dem *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) nach Herstellerangaben. Die isolierte gDNA wurde bei - 20 °C gelagert.

PBS.....	1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8,5 mM Na ₂ HPO ₄ 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4 autoklaviert, steril filtriert
PBS - EDTA..	PBS; 2 g/ L EDTA; autoklaviert; steril filtriert

3.8 Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die optische Bestimmung von DNA - oder RNA - Konzentrationen erfolgte mit dem NanoDrop (PeqLab) bei einer Wellenlänge von 260 nm (A₂₆₀). Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 g/ L dsDNA oder 40 g/ L ssRNA. Die Reinheit von Nukleinsäuren lässt sich

über das Verhältnis von A260/ A280 abschätzen, wobei reine DNA einen Wert von 1,8 - 2,0 und reine RNA einen Wert um 2,5 aufweist.

3.9 Enzymatische Nukleinsäuremanipulationen

3.9.1 Manipulation von Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte nach den Herstellerangaben für die jeweils verwendeten Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs).

3.9.2 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Um eine mögliche Religation zu verhindern, wurde linearisierte Vektor - DNA an den 5' - Enden unter Verwendung von *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP, Fermentas) nach dem Protokoll des Herstellers dephosphoryliert.

3.9.3 Ligation von Nukleinsäure - Fragmenten

Zur Ligation von kohäsiven Enden wurden die erforderlichen DNA - Komponenten im molekularen Verhältnis von 1 : 3 (Vektor : Insert) eingesetzt. Die Konzentrationen wurden vorher spektrophotometrisch ermittelt (Abschn. II 3.8). Die Berechnung der einzusetzenden Insertmenge bei konstanter Vektor - DNA lautete:

$$\frac{\text{Länge Insert [kb]}}{\text{Länge Vektor [kb]}} \times \text{ng Insert für ein Verhältnis von 1:1} \quad (3.1)$$

Die Ligation erfolgte mittels T4 DNA - Ligase (Fermentas, Promega) nach Herstellerangaben. Um die Fähigkeit des Vektors zur Religation zu überprüfen, wurde parallel zum Ligationsansatz eine Kontrolle angesetzt, die bis auf die Fragment - DNA alle Komponenten enthielt.

3.9.4 Sicherung von PCR - Amplikons

Für nachfolgende Arbeitsschritte (Sequenzierung, Umklonierung) wurden PCR - Amplikons im Allgemeinen durch Klonierung in das pGEM - T - Vektorsystem (Promega) gesichert. Das PCR - Fragment wurde zunächst aus der Agarosematrix isoliert (Abschn. II 3.4) und spektrophotometrisch (Abschn. II 3.8) analysiert. Die Ligation von Vektor - DNA und PCR - Fragment erfolgte mit T4 DNA - Ligase gemäß den Herstellerangaben. Mit 2 µl Ligationsansatz wurden chemisch kompetente *E. coli* (DH5α) transformiert (Abschn. II 3.2) und auf vorher präparierten IPTG/ X - Gal LB - Amp - Platten (Blau - Weiß - Selektion) ausgestrichen.

Nach Inkubation für 8 – 10 h bei 37 °C im Brutschrank wurden weiße Kolonien für Starterkulturen von der Platte genommen und bis zu einer $OD_{600} = 2,5$ angezogen.

IPTG/X - Gal LB - Amp - Platten LB - Amp - Platten, bestrichen mit je 40 μ l IPTG (100 mM)
und 40 μ l X - Gal (20 mg/ ml in DMSO)

3.9.5 Polymerase - Kettenreaktion

Das Reaktionsvolumen der durchgeführten PCRs betrug im Allgemeinen 50 μ l und enthielt 10 ng Plasmid - DNA oder genomische DNA als Matrize, 0,2 μ M der jeweiligen Primer, 2 U *Taq* - Polymerase (PeqLab), 2,5 mM $MgCl_2$ und PCR - Puffer. Alle Komponenten wurden auf Eis pipettiert und direkt in einen auf 98 °C vorgeheizten Thermocycler (Biometra) gestellt. Je nach experimentellem Ansatz wurden verschiedene PCR - Programme verwendet. Ein typisches PCR - Programm sah wie folgt aus:

Schritt	Temp.	Zeit	Bezeichnung
1.	98 °C	3 min	initiale Denaturierung
2.	98 °C	20 – 30 s	Denaturierung
3.	60 °C	20 – 30 s	Hybridisierung
4.	72 °C	1 min/ kb	Elongation
5.	gehe zu Schritt 2.		
6.	94 °C	30 s	Denaturierung
7.	60 °C,	30 s	Hybridisierung
8.	72 °C	1 min/ kb	Elongation
9.	gehe 38 mal zu Schritt 6.		
10.	72 °C	10 min	finale Elongation
11.	15 °C	ohne Zeitlimit	

Wenn eine geringe Fehlerrate erforderlich war oder lange DNA - Abschnitte (>1 kb) vervielfältigt werden sollten, wurde die PCR mit dem *Long Template PCR - System* (Roche) durchgeführt. Das System besteht aus optimierten PCR - Puffern und einem Mix aus *Taq* - Polymerase und *Tgo* - DNA Polymerase mit *proof reading* - Aktivität. Die Reaktionskomponenten wurden nach den Vorschriften des Herstellers in der Reaktion eingesetzt.

3.9.6 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription (ReTr) von gesamt - RNA wurde diese zunächst, gemäß den Herstellerangaben, durch Behandlung mit DNaseI (Promega) von Kontamination mit coisolierter gDNA befreit. Die nachfolgende ReTr erfolgte mit Hilfe der reversen Transkriptase des murinen Leukämie Virus (*M - MLV* Reverse Transcriptase, Promega) in Gegenwart von *Random Primers* (Promega) nach Herstellerangaben. Die synthetisierte komplementäre DNA (cDNA) wurde direkt als Matrize für PCR - Reaktionen (Abschn. II 3.9.5) eingesetzt, dabei diente ein zweiter Reaktionsansatz, der keine *M - MLV* -

RT enthielt, als Kontaminationskontrolle. Um die Integrität der verwendeten cDNA zu überprüfen, wurde in parallelen Ansätzen ein ubiquitär exprimiertes Haushaltsgen amplifiziert. Für humane cDNA diente in dieser Arbeit ein 240 bp umfassendes Fragment der Glyceraldehyd - 3 - Phosphat - Dehydrogenase (GAPDH), das mit dem Primerpaar hGAPDH - fw/ hGAPDH - rev (Tab. II - 1) amplifiziert wurde.

3.10 Agarosegelelektrophorese

DNA - Fragmente wurden mithilfe der Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurde 1 – 3 % Agarose (w/ v) in 1 × Tris/ Acetat/ EDTA - Puffer (TAE - Puffer) durch Aufkochen gelöst und auf 65 °C abgekühlt. Anschließend wurde die Agaroselösung zur Detektion der DNA mit 1 µg/ ml des Fluorophors Ethidiumbromid (EtBr) versetzt, das in den DNA - Doppelstrang interkaliert und ein Absorptionsmaximum im UV - Bereich ($\lambda = 302 \text{ nm}$) besitzt. Die DNA - Proben wurden vor der Gelbeladung mit DNA - Ladepuffer versetzt und die Agarosegelelektrophorese bei einer Spannung von 120 V für 20 – 40 min in 1 × TAE - Laufpuffer durchgeführt. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA - Fragmente auf einem UV - Transilluminator, welcher mit einer Digitalkamera ausgestattet ist, dokumentiert. Als interne Kontrolle dienten, je nach zu analysierendem DNA - Fragment, vorgefertigte DNA - Marker mit definierten Fragmentgrößen (Fermentas).

50 × TAE - Puffer242 g Tris - Base; 57,1 ml Eisessig; 37,2 g Na₂EDTA
 6 × DNA - Ladepuffer ..3 ml Glycerol (30 % v/v)
 25 mg (w/ v) Bromphenolblau
 auffüllen auf 10 ml mit ddH₂O, Lagerung bei 4 °C

3.11 DNA - Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA - Proben erfolgte nach der Didesoxymethode [SANGER *et al.*, 1977] mit einem LI - COR Sequencer (MWG Biotech, Ebersberg) und fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden bei der Firma MWG Biotech.

4 Klonierungsstrategien

4.1 pMAL - Sp1

Für die Klonierung in das prokaryotische Expressionssystem pMAL - C2x (C - terminale Fusion mit *Maltose Binding Protein*, New England Biolabs) wurde die humane Sp1 Zinkfinger - Domäne (Sp1) mit dem Primerpaar Sp1 ZFD *Sal*I fw/ Sp1 ZFD Stop *Hind*III rev mittels PCR (Abschn. II 3.9.5) amplifiziert. Die Primer fügen Sequenzmotive für Restriktionsendonukleasen am 5' - und 3' - Ende des Amplikons an. Zudem fügt der 3' - Primer ein Stopcodon für die korrekten Abbruch der Translation des

Transkripts ein. Als Matrize für die initiale PCR diente die klonierte humane vollständige cDNA (freundlicherweise von G. Suske zur Verfügung gestellt, NM_138473.2). Das 339 bp PCR - Amplikon wurde zur Sicherung in pGEM - T (Promega) eingebracht. Zur Klonierung in pMAL - C2x wurde das Amplikon zunächst aus pGEM - T mit *Sal*I und *Hind*III ausgeschnitten und das Fragment aufgereinigt (Abschn. II 3.4). Der Expressionsvektor wurde mit *Sal*I und *Hind*III linearisiert, dephosphoryliert (Abschn. II 3.2.2) und aufgereinigt (Abschn. II 3.5). Durch das Einbringen der flankierenden Restriktionsschnittstellen mittels PCR wurde die korrekte Orientierung für die Ligation in pMAL - C2x gewährleistet. Das neue Expressionssystem pMAL - Sp1 (Abb. II - 1 A) kodiert MBP mit einer C - terminalen fusionierten Sp1 - ZFD (MBP - ZFD). Die korrekte Klonierung hinsichtlich der Basenabfolge wurde durch Sequenzierung überprüft (Abschn. II 3.11).

4.2 pMAL - 9×Lys - Sp1

Das Anfügen von acht N - terminalen Lysinen (Lys) erfolgte über PCR (Abschn. II 3.9.4) mit den Primerpaar 8×Lys - MBP - Sp1/ Sp1 ZFD Stop *Hind*III rev. Als Matrize für die PCR diente hierfür pMAL - Sp1 (Abb. II - 1 B). Das Amplikon wurde zur Sicherung in pGEM - T subkloniert. Zur Umklonierung wurde pMAL - C2x zunächst mit *Nde*I und *Hind*III linearisiert und dephosphoryliert. Das zuvor gesicherte PCR - Fragment wurde mit *Nde*I und *Hind*III aus dem Sicherungsvektor herausgeschnitten. Die generierten Überhänge von Restriktionsenzymen am PCR - Fragment dienten zur gerichteten Klonierung in den zuvor linearisierten pMAL - C2x - Vektor. Die Kontrolle der korrekten Klonierung erfolgte durch Sequenzierung (Abschn. II 3.11).

4.3 pMAL - gyrA

Die C - terminale Domäne der Gyrase A - Untereinheit von *E. coli* (*gyrA* - CTD) wurde mit dem Primerpaar *gyrA Bam*HI Fc/ *gyrA Stop Hind*III rev mittels PCR amplifiziert. Als Matrize für die PCR diente der Vektor pMK90 (Addgene), welcher die komplette Gyrase A - Untereinheit kodiert [MIZUUCHI *et al.*, 1984]. Das Amplikon wurde zur Sicherung in den pGEM - T - Vektor kloniert und zur Umklonierung mit *Bam*HI und *Hind*III herausgeschnitten. Der Zielvektor pMAL - C2x wurde ebenfalls mit den genannten Restriktionsenzymen linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Das *gyrA* - CTD - Fragment wurde zum Abschluss in den Leserahmen des *malE* - Gens ligiert (Abb. II - 1 C). Die korrekte Klonierung wurde durch Sequenzierung überprüft (Abschn. II 3.11).

4.4 pEGFP - Sp3

Für die C - terminale Fusion mit EGFP (Abb. II - 1 D) wurde die ZFD vom humanen Sp3 mit dem Primerpaar Sp3 *Bgl* II fw/ Sp3 Stop *Hind* III rev über PCR amplifiziert und zur Sicherung in pGEM - T kloniert. Als Matrize für die PCR diente die vollständige humane cDNA von Sp3 (G. Suske; NM_003111). Das eukaryotische Expressionssystem pEGFP - C1 (Clontech) wurde mit *Bgl* II und *Hind* III linearisiert und dephosphoryliert. Das 306 bp - Amplikon wurde wiederum aus pGEM - T mit den identischen Enzymen herausgeschnitten und in den zuvor linearisierten pEGFP - C1 ligiert und zur Kontrolle sequenziert (Abschn. II 3.11).

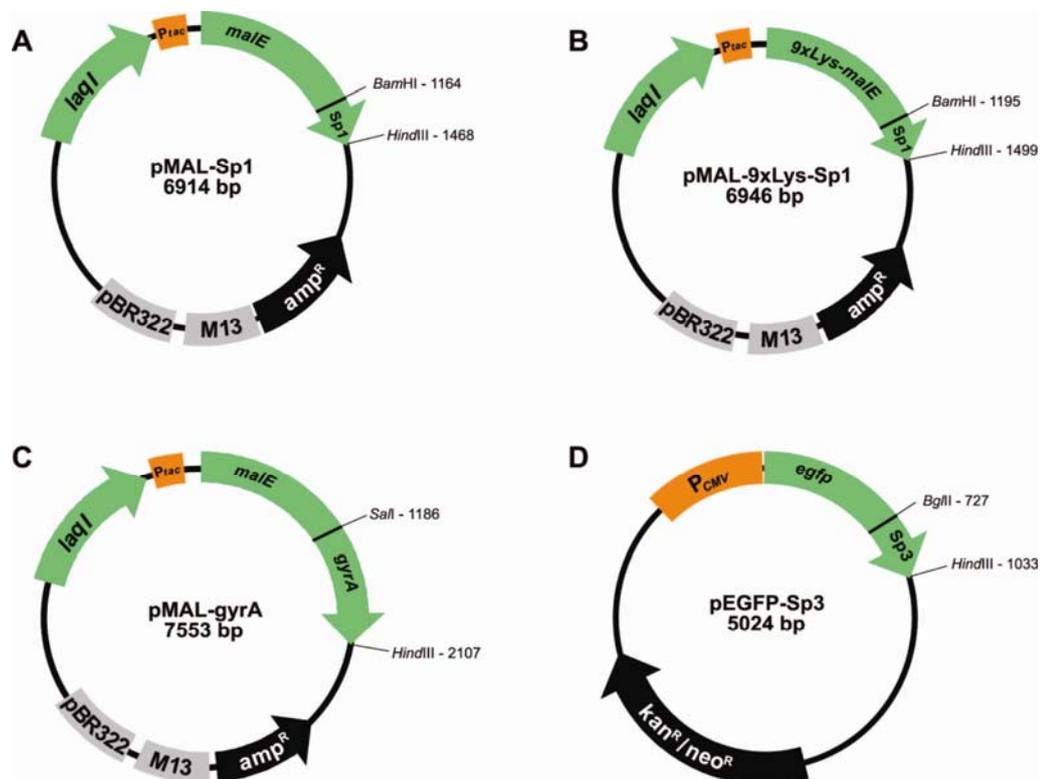


Abb. II - 1. Expressionskonstrukte für DNA - bindende Fusionsproteine. (A - C) Plasmidkarte für die prokaryotischen Expressionskonstrukte mit C - terminalen MBP - Fusionsproteinen. Die Expression des Zielgens steht bei diesen Systemen unter der Kontrolle des IPTG - induzierbaren Hybrid - Promoters P_{tac} . (D) Plasmidkarte des Konstruktes für eukaryotische Expression von Fusionsprotein EGFP - Sp3 - ZFD. Die Expression wird hier durch den konstitutiven Cytomegalo - Virus - Promoter P_{cmv} kontrolliert.

5 Zellbiologische Methoden

5.1 Kultivierung der Zelllinie HEK293

Die adhären wachsende Zelllinie HEK293 (ATCC - Nr. CRL - 1573) wurde Anfang der 70er Jahre durch Transformation von DNA - Fragmenten des Adenovirus Typ 5 in humane embryonale Nierenzellen (HEK) etabliert. Auf Grund der einfachen Handhabung und der hohen

Transfektionseffizienz erfolgte die Auswahl dieser Zelllinie. Die Kultivierung der Zellen wurde standardmäßig bei 37°C, 5 % - CO₂ - Begasung in HEK - Medium durchgeführt.

HEK - MediumDMEM mit 2 mM L - Gln, 20 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) Pen/ Strep

5.2 Auftauen eukaryotischer Zellen

Im Wasserbad bei 37 °C wurden die Zellen für ca. 2 min aufgetaut und danach sofort in 5 ml Kulturmedium überführt. Zur Entfernung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO wurden die Zellen zentrifugiert (5 min; 800 U/ min; RT; Heraeus Multifuge 3SR) und anschließend nochmals in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in eine 175 cm² - Zellkulturflasche (Greiner) überführt. Einen Tag später wurde das Zellkulturmedium erneuert.

KulturmediumDMEM mit 2 mM L - Gln, 20 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) Pen/ Strep
Lagerung bei 4 °C

5.3 Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden mit PBS - EDTA gewaschen, anschließend trypsiniert und in Kulturmedium resuspendiert. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension (5 min; 800 U/ min; RT; Heraeus Multifuge 3SR) wurden die Zellen in Cryomedium auf resuspendiert. Davon wurden etwa 2×10^6 Zellen in 1 ml Cryomedium in ein Cryoröhrchen (Greiner) überführt und sofort in einer Nalgene™ Cryo – Box zur Gewährleistung eines abfallenden Temperaturgradienten von etwa 1 °C/ min bei - 80 °C gelagert. Länger andauernde Lagerungen erfolgten in flüssigem Stickstoff.

PBS - EDTA1,5 mM KH₂PO₄; 8,5 mM Na₂HPO₄
140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4 mM EDTA; pH 7,4
autoklaviert; steril filtriert
CryomediumFBS mit 10 % (v/v) DMSO; immer frisch angesetzt

5.4 Transiente Transfektion der HEK293 - Zellen mit pEGFP - Sp3

Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ Kavität einer 6 - well - Platte bzw. 2×10^6 Zellen je 100 mm² Zellkulturschale ausgesät und im Brutschrank inkubiert (24 h; 37 °C). Die Transfektion erfolgte liposomal mit dem Reagenz *DreamFect*™ (OZ Biosciences) im Verhältnis 4 : 1 zur DNA gemäß den Vorschriften des Herstellers. Nach weiteren 24 h wurde das Kulturmedium erneuert. Die Transfektionseffizienz wurde für die folgenden 5 Tage fluoreszenzmikroskopisch, (Leica DMI 4000 B) sowie mit Hilfe des Durchflusszytometers FC500 (Beckman Coulter) ermittelt. Als Negativ - Kontrollen dienten untransfizierte HEK293 und als Positivkontrolle stabil EGFP exprimierende HEK293 (eigene Herstellung).

5.5 Behandlung transient - transfizierter HEK293 mit MG - 132

Zum Nachweis der proteasomalen Degradierung des Fusionsproteins EGFP - Sp3 wurden die transfizierten Zellen über einen Zeitraum von 48 h post-Transfektion mit MG - 132 behandelt. Das Peptidaldehyd inhibiert reversibel die Funktion aller proteasomaler Untereinheiten und intrazellulärer Proteasen. Die Zellen wurden für 48 h mit 1 µM MG - 132 in DMSO mit einem Volumenanteil von 0,5 % (v/v) in Medium inkubiert. Unbehandelte Zellen und Zellen mit 0,5 % (v/v) DMSO in Medium wurden als Kontrollen mitgeführt. Anschließend erfolgte die Isolierung der zytoplasmatischen Proteine (Abschn. II 5.6) und der spezifische Nachweis durch Western Blot (Abschn. II 6.6).

5.6 Isolierung zytoplasmatischer Proteine aus HEK293

Adhärente Zellen in 6well - Platten wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 150 - 300 µl Lysepuffer abgelöst. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (10 min; 14000 U/ min; 4 °C, Eppendorf 5418 R). Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

PBS..... 1,5 mM KH₂PO₄; 8,5 mM Na₂HPO₄
140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4
autoklaviert; steril filtriert

Lysepuffer 20 mM Tris; 2 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol
1 % (v/v) Triton X - 100; 1 mM PMSF;
0,3 % (v/v) Proteaseinhibitorcocktail, EDTA frei (Roche)
Lagerung bei - 20 °C

6 Biochemische Methoden

6.1 Expression und Löslichkeitstest von MBP - Fusionsproteinen

Für die Expression von MBP - Fusionsproteinen wurde der *E. coli* - Stamm BL21(DE3) verwendet. Im ersten Schritt des Pilotexperiments zum Expressionsverhalten wurden 80 ml LB/ Glc/ Amp mit einer Übernachtskultur des Expressionsplasmid - transformierten Stammes inokuliert (1 : 100 Verdünnung). Die Kultur wurde im Schüttelinkubator bei (37 °C; 240 U/ min) bis zu einer Zellzahl von $\sim 2 \times 10^8$ Zellen/ ml (OD₆₀₀ = 0,4 - 0,6) angezogen. An dieser Stelle wurde 1 ml der angezogenen Kultur abgenommen, zentrifugiert (2500 U/ min; 2 min; 4 C) und das Zellpellet in 1 x SDS - Probenpuffer resuspendiert (*Probe 1*) und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Zur Induktion der Expression wurden 240 µl einer 0,1 M IPTG - Lösung (0,3 mM final) zur verbleibenden Kultur hinzugegeben und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Direkt nach der Inkubation wurde wiederum eine 1 ml Probe entnommen (*Probe 2*) und, wie bereits oben beschrieben, zur Analyse aufbereitet.

Zum Abschluss wurde die Kultur in Probe A und Probe B äquivalenter Volumina aufgeteilt und herabzentrifugiert (20 min; 4600 U/ min; 4 °C; Heraeus Multifuge 3SR). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet A in 5 ml Säulenpuffer und das Pellet B in 10 ml Sucrose - Puffer resuspendiert und auf Eis gelagert. Zur Desintegration der Zellwand wurde zunächst nur Probe A bei - 80°C eingefroren und in einem Wasserbad (4 °C) wieder aufgetaut. Die Probe wurde nun auf Eis gelegt und mit Ultraschall behandelt. Die Zellreste wurden anschließend abzentrifugiert (30 min; 4600 U/ min; 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und auf Eis gelagert (*Probe 3*). Das Pellet wurde in 5 ml Säulenpuffer resuspendiert und auf Eis gelagert (*Probe 4*).

Zur Equilibrierung wurden 200 µl Amylosematrix (New England Biolabs) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei herabzentrifugiert (10 min; 2500 U/ min; 4°C, Eppendorf 5418 R), der Überstand vorsichtig abgesaugt und in 200 µl Säulenpuffer A resuspendiert. Dieser Vorgang wurde 2× wiederholt. Im Anschluss wurden 100 µl des löslichen Bestandteils zu 50 µl equilibrierter Amylose gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde anschließend zentrifugiert (5 min; 5000 U/ min; 4°C, Eppendorf 5418 R) und der Überstand verworfen. Die Amylosematrix wurde nun 2× mit je 100 µl Säulenpuffer A gewaschen und in 50 µl 1× SDS - Probenpuffer resuspendiert (*Probe 5*).

Zur Probe B wurde zunächst 20 µl 0,5 M EDTA (1 mM final) hinzugegeben und unter ständiger Durchmischung inkubiert (10 min; RT). Die Probe wurde dann zentrifugiert (10 min; 4600 U/ min; 4 °C, Eppendorf 5418 R) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in eiskaltem 5 mM MgSO₄ resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min; 4600 U/ min; 4°C, Eppendorf 5418 R) wurde der Überstand (*Probe 6*) dekantiert und das Pellet (*Probe 7*) in 5 ml Säulenpuffer A resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Zur Vorbereitung für die SDS - PAGE (Abschn. II 6.4) wurden 5 µl 2 × SDS - Probenpuffer zu je 5 µl von *Probe 3, 4, 7* und 10 µl 2 × SDS - Probenpuffer zu 10 µl *Probe 6* gegeben. Die Proben wurden zusammen mit den bereits vorbereiteten *Proben 1,2, 5* für 5 min bei 95°C aufgekocht und im Anschluss auf einem 12%igen SDS - Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

LB/Glc/Amp - Medium	LB/ Amp - Medium, 0,2 % (w/ v) Glucose
Säulenpuffer A.....	100 mM HEPES (pH 7,5); 90 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ 100 µM ZnCl ₂ (nur bei ZF); 1 mM TCEP (immer frisch zugesetzt) 1 mM PMSF (immer frisch zugesetzt)
Sucrose - Puffer	30 mM Tris - HCl (pH 8, 0); 20 % (w/ v) Sucrose
2×SDS - Probenpuffer.....	130 mM Tris (pH 6,8); 4 % (w/ v) SDS; 2 mM EDTA; 20,2 % (v/ v) Glycerin; 0,02 % (w/ v) Bromphenolblau; 10 % (v/ v) β - Mercaptoethanol

6.2 Aufreinigung von MBP - Fusionsproteinen

Zunächst wurden 400 ml LB/ Glc/ Amp - Medium mit 5 ml einer Starterkultur des entsprechenden Transformanten angeimpft. Diese Kultur wurde bis zur $OD_{600} = 0,6$ im Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator angezogen ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$; 240 U/ min). Die Proteinexpression wurde dann durch Zugabe von 450 μl einer 100 mM IPTG - Lösung induziert. Vier Stunden post Induktion wurde die Kultur auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ herabgekühlt und im 50 ml - Reaktionsgefäß herab zentrifugiert (20 min; 4600 U/ min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; Thermo Scientific Multifuge S+R). Das Pellet wurde nun in 20 ml Säulenpuffer A resuspendiert und dabei ständig auf Eis gekühlt. Der Aufschluss wurde mit kurzen Ultraschallimpulsen (10 s) für 6 min durchgeführt. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation (30 min; 4600 U/ min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Thermo Scientific Multifuge S+R) abgetrennt und der Überstand in ein 50 ml - Reaktionsgefäß überführt.

In Vorbereitung zur Aufreinigung wurde 1 ml Amylosematrix auf eine Chromatographiesäule (Poly - Prep, BioRad) geladen und mit 16 ml Säulenpuffer A equilibriert. Der Überstand wurde anschließend auf die Säule gegeben und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/ min per Gravitation über Amylosematrix geleitet. Im Anschluss wurde die Säule mit Säulenpuffer B ($4 \times 3\text{ ml}$) gewaschen. Das Zielprotein wurde zum Abschluss mit $2 \times 2\text{ ml}$ Säulenpuffer C von der Matrix eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vor der weiteren Verwendung gegen 10 mM HEPES (pH 7,5) für 72 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ dialysiert (MWCO 20k, Slide - A - Lyzer, Pierce). Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Kontrolle der Aufreinigungsschritte und Reinheit wurde mittels SDS - PAGE (Abschn. II 6.4) überprüft.

LB/ Glc/ Amp - MediumLB/ Amp - Medium, 0,2 % (w/ v) Glucose
Säulenpuffer A100 mM HEPES (pH 7,5); 90 mM KCl; 1 mM MgCl_2 100 μM ZnCl_2 (nur bei ZF); 1 mM TCEP 1 mM PMSF (immer frisch zugesetzt)
Säulenpuffer BSäulenpuffer A, 0,2 M NaCl
Säulenpuffer CSäulenpuffer A, 10 mM Maltose

6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Totalproteinkonzentration in detergentfreien Lösungen erfolgte in Anlehnung an die Methode von SMITH *et al.* unter Hilfe des BCA Assay Kits (Pierce) [SMITH *et al.*, 1985]. Die Kalibration erfolgte nach Herstellerangaben mittels einer Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) im Konzentrationsbereich von 0 - 2000 $\mu\text{g/ ml}$.

6.4 SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS - PAGE [LAEMMLI 1970; WEBER & OSBORN 1969] in Mini - PROTEAN Tetra Cells (Bio - Rad) gemäß Herstellerangaben. Die Proteinproben (aufgereinigtes Protein oder Zellpellet) wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und zusammen mit Größenstandards (Fermentas) auf das zuvor frisch präparierte Gel geladen. Der Gellauf wurde bei konstanter Spannung durchgeführt, wobei zunächst für 20 min 80 V angelegt wurden, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten. Die Elektrophorese wurde im Anschluß bei 180 V für 60 min fortgesetzt. Die Analyse der aufgetrennten Proteine erfolgte durch Coomassiefärbung (Abschn. II 6.5) oder Western Blot (Abschn. II 6.6).

Sammelgelpuffer	130 mM Tris/H ₃ PO ₄ (pH 6,8); 4,8 % (w/ v) Acrylamid:BIS (29 : 1, AppliChem); 0,1 % (w/ v) SDS; 0,1 % (w/ v) APS; 0,1 % (v/ v) TEMED
Trenngelpuffer	375 mM Tris (pH 8,8); 12 - 14 % (w/ v) Acrylamid:BIS (29 : 1); 0,1 % (w/ v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,04 % (v/ v) TEMED
Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin 0,1 % (w/ v) SDS
2× SDS - Probenpuffer ...	130 mM Tris (pH 6,8); 4 % (w/ v) SDS; 2 mM EDTA; 20,2 % (v/ v) Glycerin; 0,02 % (w/ v) Bromphenolblau; 10 % (v/ v) β - Mercaptoethanol

6.5 Coomassie - Färbung von Proteingelen

Für die qualitative Auswertung von Proteingelen wurde das GelCode[®] *Blue Stain Reagent* (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Das SDS - Gel wurde zunächst mit ddH₂O gewaschen und im Anschluss mit 15 ml GelCode[®] unter gleichmäßiger Durchmischung (1 h, RT) inkubiert. Das Gel wurde dann in 50 ml ddH₂O über 24 h entfärbt und im Anschluß mit einem handelsüblichen Flachbettscanner dokumentiert.

6.6 Western Blot

Das Western Blotting erfolgte unter Verwendung einer halbtrockenen Transfereinheit (Trans - BLOT SD Semi - Dry Transfer Unit, Bio - Rad). Dazu wurden *Extra Thick Blot Paper* (Bio - Rad), PVDF Membran (Bio - Rad), das Polyacrylamidgel und ein weiteres Blot Papier in Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei auf der Anode übereinander gelegt. Zum Transfer der Proteine wurde für 40 min eine konstante Spannung von 15 V angelegt. Nach erfolgreichem Transfer wurden freie Bindungsstellen der Membranen durch Inkubation (1 h; RT oder 16 h; 4 °C) unter ständiger Durchmischung mit Blockierungspuffer abgesättigt. Anschließend wurde mit dem entsprechenden Primärantikörper, der 1 : 1000 bis 1 : 5000 in Antikörper - Puffer verdünnt vorlag, unter Schütteln inkubiert (2 h; 4 °C). Die Membran wurde danach dreimal für 5 min in TTBS gewaschen.

Im Anschluß erfolgte die Inkubation (60 min, RT) mit einem HRPO - konjugierten Sekundärantikörper, der 1 : 20000 in TTBS verdünnt vorlag. Danach wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TTBS gewaschen und mit frisch angesetzter ECL - Lösung (Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit, Invitrogen) für 90 s im unter Lichtausschluss inkubiert. Durch Auflegen eines lichtempfindlichen Films (SuperRX, Fujifilm) auf die Membran wurde die Chemolumineszenz detektiert.

Transferpuffer	39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,0375 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) NaN ₃ 20 % (v/v) Methanol
TTBS	100 mM Tris (pH 8,0); 0,9 % (w/v) NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20
Blockierungspuffer	TTBS; 0,2 % (w/v) Casein - Hydrolysat; 4°C
Antikörper - Puffer	TTBS; 1 % Magermilchpulver; 0,01 % (w/v) NaN ₃ ; 4°C

6.7 Modifizierte Gelshift - Assays

Zur qualitativen Analyse von rekombinanten Proteinen und deren Interaktion mit dsDNA wurden modifizierte Gelshift - Assays durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das nicht denaturierende Polyacrylamidgel (8 %, 10 × 5 cm) präpariert und vor Probenauftrag für 30 min bei 75 V in Tris/ Acetat (TA) - Puffer laufen gelassen. Die Hybridisierung der einzelsträngigen, komplementären Oligos erfolgte im Thermocycler. Dazu wurde der Hybridisierungsansatz mit äquivalenten Stoffmengen an komplementären Oligos auf 95°C erhitzt und anschließend kontinuierlich auf RT herabgekühlt (Δ - 5/ 5 min). Die doppelsträngigen Oligos wurden in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen mit dem zu untersuchenden Protein in DNA - Bindepuffer inkubiert (30 min; RT) und im Anschluss mit DNA - Ladepuffer versetzt. Die Protein/ DNA - Gemische wurden anschließend auf das Gel geladen und aufgetrennt (75 V, 1,5 h). Unmittelbar nach dem Lauf wurde das Gel in EtBr - TA - Puffer inkubiert (15 min, RT) und im Anschluss in ddH₂O (30 min, RT) gewaschen. Die Belichtung und Bildgenerierung erfolgte unter UV - Licht.

10×Tris - Acetat (TA)	0,4 M Tris - Base (pH 8,0); 0,2 M Eisessig
EtBr - TA - Puffer	100 ml TA - Puffer 30 µg/ ml EtBr (immer frisch angesetzt)
natives Polyacrylamidgel	1 ml 10 × TA - Puffer; 1,25 ml 40 % Acrylamid - Lösung 7,725 ml ddH ₂ O; 10 µl TEMED; 25 µl 10 % (w/v) APS
6×DNA Bindepuffer	100 mM Tris (pH 7,5), 1 M KCl, 1 mM DTT, 50 % (v/v) Glycerol; 0,1 mg/ ml BSA
ZnCl ₂ - Lösung	10 mM ZnCl ₂ in ddH ₂ O

7 Biohybride Methoden

7.1 Einführung von Aminofunktionen auf Glasoberflächen

Zur Einführung von Aminofunktionen auf Glasoberflächen wurden diese Aminopropyltriethoxysilan (APTES, Sigma) durch wässrige Ablagerung beschichtet [HERMANSON 2008]. Teflon - beschichtete Objektträger (Menzel) wurden vor der Silanisierung in 5 M NaOH (3 h, RT) aktiviert, mit ddH₂O gründlich gespült und mit Stickstoff getrocknet. Im Anschluss wurden die Objektträger in einer APTES - Aceton - Mischung inkubiert (1 h; RT). Nach gründlichem Spülen mit Aceton und Trocknen mit Stickstoff wurden die silanisierten Träger für 20 min bei 120°C inkubiert um die Langzeitstabilität durch Quervernetzung der aufgetragenen APTES - Schicht zu steigern.

APTES - Aceton 5 % (v/v) APTES in Aceton
NaOH 5 M NaOH in ddH₂O

7.2 Charakterisierung von Protein - Nukleinsäure Interaktion mittels SPR

Die kinetische Analyse der Interaktion von Protein und DNA erfolgte auf einem BIAcore X100 - System (GE, Freiburg). Für die etablierten Assays wurde ein CMD5 Sensorchip (Xantec Bioanalytics, Düsseldorf) verwendet. Die allgemeine Flussrate während der Prozesse Aktivierung und DNA - Immobilisierung betrug 5 µl/ min. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte immer, wenn nicht anders angegeben, ein Waschschritt mit Laufpuffer (2 min). Zur Aktivierung der Carboxy - Gruppen im Zuge der Kopplung von Streptavidin (SA) auf der Chip - Oberfläche wurden unmittelbar vor der Injektion 1 - Ethyl - 3 - (3 - dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und Sulfo - *N* - Hydroxysuccinimide (Sulfo - NHS) im Verhältnis 1 : 1 gemischt und injiziert (8 min). Danach erfolgte die Injektion von Streptavidin gelöst in Streptavidinpuffer (8 min). Die verbleibenden aktivierten Oberflächenfunktionen wurden mit der Injektion von Ethanolamin inaktiviert (5 min). Die biotinylierten, zuvor hybridisierten Oligos wurden für 5 min injiziert (Abb. II - 2). Unspezifisch gebundene Oligos wurden durch zweimalige Injektion von SDS (je 30 s) entfernt. Die rekombinanten Proteine wurden in Stoffmengenkonzentration von 0 - 500 nM (30 µl/ min; 3 min) injiziert, gefolgt von einer Laufpuffer - Injektion (5 µl/ min). Die Regeneration des Sensorchips erfolgte durch zweimalige Injektion von SDS (je 30 s). MBP wurde als negativ - Kontrolle verwendet. Die Messung erfolgte in Duplikaten mittels Referenzsubtraktion, bei der die Referenzfließzelle Fc1 (nur Streptavidin immobilisiert) von der aktiven Fließzelle Fc2 (DNA immobilisiert) subtrahiert wurde.

Laufpuffer 0,01 M HEPES; 0,2 M NaCl;
0,005 % (v/v) Tween 20; 1 mM DTT
10 µM ZnCl₂; pH 7,5; steril filtriert; entgast
Streptavidinpuffer 5 mM NaAc (pH 5,0); Streptavidin 0,5 mg/ ml
Ethanolamin 1 M Ethanolamin (pH 8,5)
SDS - Lösung 0,1 % (w/v) SDS in ddH₂O

EDC0,4 M in ddH₂O (immer frisch angesetzt)
 NHS0,1 M in ddH₂O (immer frisch angesetzt)
 DNA - Lösung0,5 µM dsDNA – Oligos in Laufpuffer

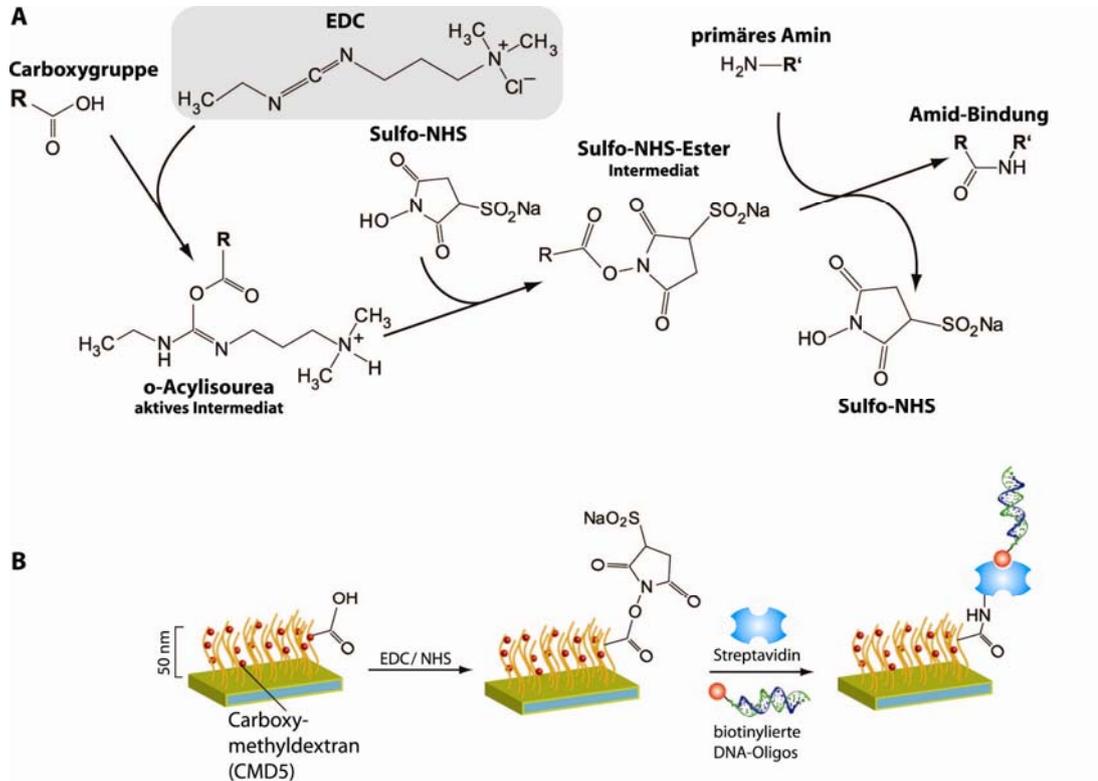


Abb. II - 2. Immobilisierungsstrategie von Nucleinsäuren auf einem carboxylierten SPR - Sensorchip über die hochaffine Interaktion von Streptavidin und Biotin (Bt). (A) Das Carbodiimid 1 - Ethyl - 3 - (3 - dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) reagiert mit Carboxygruppen in Gegenwart von Sulfo - *N* - Hydroxysuccinimid (Sulfo - NHS) zu einem reaktiven Sulfo - NHS - Ester - Intermediat. In Gegenwart primärer Amine als Nucleophile wird eine Amid - Bindung, unter Abspaltung von Sulfo - NHS, ausgebildet (adaptiert aus Hermanson, 2008). (B) Der SPR - Sensorchip ist mit einer 50 nm - Schicht aus Carboxymethyldextran (CMD5) funktionalisiert. Über EDC/ NHS - Aktivierung der Carboxygruppen wird Streptavidin über dessen exponierte Amingruppen kovalent gekoppelt. Biotinylierte Nucleinsäuren werden in Anschluss über die hochaffine, nahezu irreversible Interaktion von Streptavidin und Bt immobilisiert (Streptavidin PDB_ID: 3MG5; dsDNA PDB_ID: 2JYK).

7.3 Zinkfinger - 2D - Proteinarrays und Bindung von DNA

7.3.1 Adsorptive Immobilisierung

Zur Immobilisierung von rekombinanten MBP - Fusionsproteinen in 2D - Arrays auf Glasträgern (Menzel) über Adsorption wurde die Oberfläche in der Vorbereitung in 5 M NaOH (3 h; RT) aktiviert. Die Glasträger wurden im Anschluss mit ddH₂O gründlich gespült und mit Stickstoff getrocknet.

Ein Volumen von 2 μ l Protein, mit jeweiligen Konzentrationen an rekombinanten Protein, wurde auf die entsprechenden Glasbereiche (Abb. II - 3) pipettiert und bei H₂O - gesättigter Atmosphäre inkubiert (1 h; RT). Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit PBS (2 \times 15 ml; 3 min; RT) und ddH₂O entfernt und mit Stickstoff getrocknet. Die adsorptive Immobilisierung von Proteinen auf APTES - beschichteten Glaträgern (siehe Abschn. II 7.1) wurde auf äquivalente Art und Weise durchgeführt.

NaOH5 M NaOH in ddH₂O
 dsDNA - Lösung.....x pmol dsDNA in 10 mM HEPES (pH 7,5); 100 μ M ZnCl₂
 1 mM DTT (immer frisch zugegeben)

7.3.2 Kovalente Immobilisierung

Auf zuvor silanisierte Objektträger (vgl. Abschn. II 7.1) wurde in definierten Bereichen 2 μ l Crosslinker - Lösung (BS³, Thermo Scientific) aufgebracht und unter H₂O - gesättigter Atmosphäre inkubiert (1 h; RT). Der Glaträger (Abb. II - 4) wurde im Anschluss mit ddH₂O gespült und unter Stickstoff getrocknet. Unmittelbar nach dem Trocknen wurden 2 μ l Proteinlösung unterschiedlicher Konzentrationen auf die Crosslinker - behandelten Bereiche aufgetragen und wiederum unter H₂O - gesättigter Atmosphäre inkubiert (1 h; RT). Ungebundene Proteine wurden durch einen finalen Waschschriff mit PBS und ddH₂O entfernt und der Glaträger jeweils unter Stickstoff getrocknet. Die Detektion von dsDNA erfolgte nach der identischen Vorgehensweise wie in Abschn. II.7.3.3 beschrieben.

Crosslinker - Lösung12,5 mM BS³ in PBS, immer frisch präpariert
 PBS.....1,5 mM KH₂PO₄; 8,5 mM Na₂HPO₄
 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4
 autoklaviert; steril filtriert

7.3.3 Bindung von dsDNA auf modifizierten Glasoberflächen

Auf die proteinmodifizierten Bereiche des Glaträgers wurde ein Volumen von 2 μ l (0,5 pmol/ μ l) einer zuvor hybridisierten dsDNA (Cy3 - markiert) gespottet und für 15 min unter Lichtausschluss und H₂O - gesättigter Atmosphäre inkubiert. Die ungebundene dsDNA wurde durch zwei Waschschriffe mit PBS (2 \times 15 ml; 5 min; RT) entfernt. Die Glaträger wurden vor der Detektion mit Stickstoff getrocknet. Die Detektion des Cy3 - Signals erfolgte am Microarray - Reader (PMT 300, Molecular Devices, 532 nm). Die Kalkulation der absoluten Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit GenePix Pro - Software (Version 6.1).

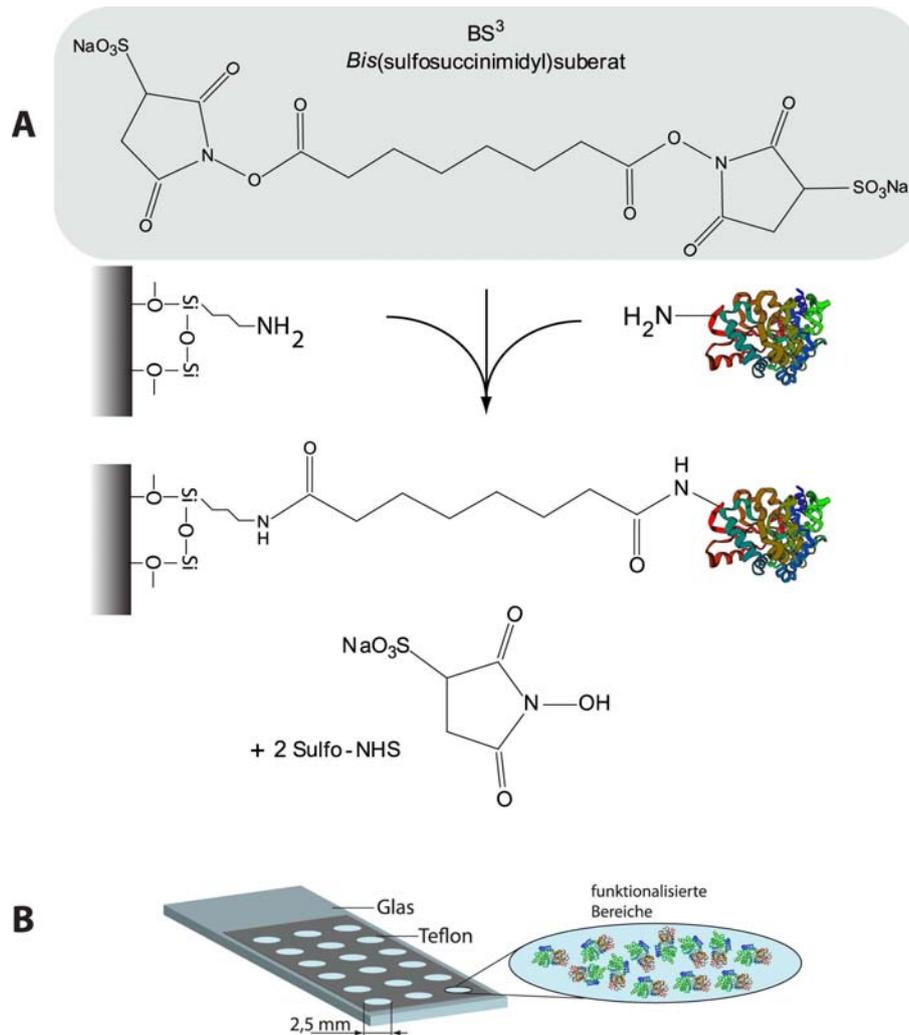


Abb. II - 3. Kovalente Immobilisierung von Biomolekülen durch den homobifunktionalen Quervernetzer *Bis(sulfosuccinimidyl)*-suberat (BS^3) auf APTES - beschichteten Glasoberflächen. (A) In wässriger Lösung reagiert der aktivierte Sulfo - NHS - Ester mit einem primären Amin zu einer Peptidbindung unter Abspaltung von Sulfo - NHS (adaptiert aus Hermanson, 2008; MBP PDB_ID: 1ELJ). (B) Schematische Darstellung des 2D - Proteinarrays auf Teflon - beschichteten Glasträgern. Auf Glas können MBP - Fusionsproteine kovalent oder adsorptiv immobilisiert werden. Teflon bietet eine inerte Schicht und definiert die funktionalen Bereiche in ihren Ausmaßen, was die Auswertung durch bildverarbeitende Software begünstigt.

7.3.4 Immunodetektion auf Glasoberflächen

Mit Protein modifizierte Glaträger wurden zunächst in Blockierungspuffer (Abschn. II 6.6) unter Schwenken inkubiert (15 ml; 1 h; RT). Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem primär - AK (1 : 1000 in TTBS; 1 h; RT). Unspezifisch gebundene AK wurden durch dreimaliges Waschen mit TTBS (3 × 15 ml; je 5 min; RT) entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären AK (Cy3 - konj.) erfolgte unter Lichtausschluss (1 : 15000 in TTBS; 1 h; RT). Der Glaträger wurde zum Abschluss in TTBS gewaschen (3 × 15 ml; je 15 min, RT) und mit Stickstoff getrocknet. Die Detektion erfolgte mit dem Microarray - Reader und die Kalkulation der absoluten Fluoreszenzintensitäten erfolgte wie bereits in Abschn. II 7.3.3 beschrieben.

Dazu wurden 50 µl ECL - Substratlösung (Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit, Invitrogen) in die Kavitäten injiziert, 10 s geschüttelt und anschließend die absolute Chemilumineszenzsignal detektiert.

TTBS.....100 mM Tris (pH 8,0); 0,9 % (w/ v) NaCl;
0,1 % (v/ v) Tween20
Blockierungspuffer.....TTBS; 0,2 % (w/ v) Casein - Hydrolysat; 4°C
Antikörper - Puffer.....TTBS; 1 % Magermilchpulver; 0,01 % (w/ v) NaN₃; 4°C

7.5 Kovalente Immobilisierung von Protein A auf Nanopartikeln

Für die EDC/ NHS - vermittelte kovalente Immobilisierung (Abb. II - 2 A) wurden carboxylierte MagPrep25 - Partikel (d = 25 nm; Merck Darmstadt) verwendet. Zunächst wurden 3 mg Partikel mit MES/ Tween gewaschen (3 × 500 µl; RT). Die Partikel wurden dann in MES/ EDC/ NHS - Puffer resuspendiert und unter stetigem Schütteln inkubiert (30 min; RT). Die Partikel wurden im Anschluß je einmal mit MES/ Tween und PBS/ Tween gewaschen (500 µl; RT). Zu den aktivierten Partikeln wurde nun 150 µg Protein A gegeben und inkubiert (2 h; RT). Die Suspension wurde von Zeit zu Zeit vorsichtig durchmischt. Die Partikel wurden danach per Magnet separiert und der Überstand verworfen. Dann wurden 300 µl Ethanolamin zu den Partikeln gegeben und inkubiert (1 h, RT). Zum Abschluss wurde das Ethanolamin entfernt und PBS/ Tween gewaschen (2 × 300 µl; RT). Die funktionalisierten Partikel wurden in PBS/ Tween nun resuspendiert (10 mg/ ml) und bei 4°C gelagert.

MES.....25 mM MES in ddH₂O
MES/ Tween.....25 mM MES, 0,05 % (v/ v) Tween20
PBS/ Tween.....PBS, 0,05 % (v/ v) Tween20
Ethanolamin1 M Ethanolamin (pH 8,5)
EDC50 mg/ ml EDC in 25 mM MES (frisch hergestellt)
NHS50 mg/ ml NHS in 25 mM MES (frisch hergestellt)

7.6 Gerichtete Immobilisierung von MBP - gyrA auf Protein A - Nanopartikeln

Insgesamt 650 µg Protein A - Partikel (Abschn. II 7.5) wurden magnetisch separiert und der Überstand verworfen. Die Partikel wurden in anti - MBP - Lösung resuspendiert und inkubiert (200 µl; 10 min; RT). Im Anschluss wurden die Partikel je einmal mit PBS/ Tween und gyrA - Bindepuffer gewaschen und nach Abschluss 40 µl gyrA - Bindepuffer resuspendiert. Im finalen Schritt der Immobilisierung wurde zur Partikelsuspension MBP - gyrA - Puffer hinzugegeben und inkubiert (60 µl; 15 min; RT). Die Partikel wurden im Anschluss separiert, der Überstand verworfen und mit gyrA - Bindepuffer gewaschen (2 × 100 µl; RT).

Die gyrA - Partikel wurden bis zur weiteren Verwendung in 40 µl gyrA - Bindepuffer resuspendiert ($C_{\text{Partikel}} = 16,25 \mu\text{g}/\mu\text{l final}$). Die Immobilisierung wurde vor jedem Experiment neu durchgeführt.

gyrA - Bindepuffer	10 mM HEPES (pH 7,5); 50 mM KCl 4 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT
PBS Tween	PBS; 0,05 % (v/v) Tween 20
anti MBP - AK - Lösung.....	monoklonaler AK Maus anti - MBP (1:46) in PBS/ Tween
Protein A - Partikel	10 mg/ ml MagPrep Protein - A - Partikel in PBS/Tween
MBP - gyrA - Puffer.....	10 mM HEPES (pH 7,5); 50 mM KCl 4 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT, 18,9 ng/ µl MBP - gyrA

7.7 Separation und Anreicherung von bakterieller gDNA

Für die Aufreinigung von bakteriellen gDNA aus Proben mit humaner gDNA wurden 10 ng genomische *E. coli* - bzw. *S. aureus* DNA mit Verhältnissen von 1:1, 1:10 und 1:100 (Verhältnis bakterielle DNA zu human gDNA) in einem Volumen von 40 µl PBS vermischt. Dazu wurden 65 µg MBP - gyrA - Partikel (Abschn. II 7.6) in gyrA - Bindepuffer resuspendiert und inkubiert (10 min; RT). Die Partikel wurden dann magnetisch separiert und PBS/ Tween gewaschen (2 × 100 µl; RT). Das Partikelpellet wurde anschließend in 47,5 µl zuvor präparierten PCR - Mix ohne *Taq* - Polymerase und ohne Primer aufgenommen und im Thermocycler erhitzt (95°C; 10 min). Die Partikel wurden dann magnetisch separiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wo Primer und *Taq* - Polymerase bereits vorgelegt wurden. Zum Nachweis angereicherter mikrobieller DNA wurde standardmäßig eine PCR (Abschn. II 3.9.4) mit dem Primerpaar Gram neg./ DG74 für *E. coli* - gDNA und 16S_Stau_95 - 110 fw/ 16S_Stau_284 - 300 rev für *S. aureus* - gDNA durchgeführt. Die Analyse der PCR - Produkte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (Abschn. II 3.10). Als Kontrollen dienten PCR - Ansätze ohne Partikel.

8 Statistik und Bildbearbeitung

Bei den in Diagrammen gezeigten Daten handelt es sich, wenn nicht anders angegeben, um die Mittelwerte der Datenreihen ± Mittelwertabweichung. Das Signifikanzniveau zwischen verschiedenen Datenreihen wurde mit Hilfe von zweiseitigen *t* - Tests Typ 3 bestimmt, dabei wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten von $P < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Alle Strukturmodelle wurden im Original aus der RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) entnommen und in RasMol (Version 2.7.5.2) oder Chimera (Version 1.5.3; *University of California*) für diese Arbeit modifiziert um Strukturelemente farblich zu kennzeichnen.

III ERGEBNISSE

1 Entwurf und Klonierung von DNA - bindenden Proteinen

1.1 ZF - basiertes Protein für eukaryotische Expression

Das Konzept eines artifiziellen DNA - bindenden Proteins, welches in eukaryotischen Expressionssystemen hergestellt wird, wurde mit der ZFD vom humanen Sp3 umgesetzt. Der Transkriptionsfaktor der Sp - Familie (*Specificity protein*) zeigt eine hohe Spezifität gegenüber der Konsensussequenz 5' - GGG GCG GGG - 3' [SUSKE 1999]. Um mögliche posttranslationale Interaktionen mit anderen Proteinen oder Modifikationen zu minimieren wurde die ZFD von Sp3 von der Transaktivierungsdomäne isoliert. Zudem sollte das Protein mit dem Reporter gen *egfp* fusioniert werden. Diese Strategie soll eine spätere Selektion von stabil exprimierenden Zellklonen bzw. fluoreszenzgestützten Lokalisationsuntersuchungen ermöglichen. Die entworfenen Primer (Abschn. II 1.5) flankieren die ZFD von Sp3 und führen in der PCR zu einem 306 bp - Amplikon, welches über Agarosegelelektrophorese identifiziert und anschließend isoliert wurde (Abb. III - 1 A).

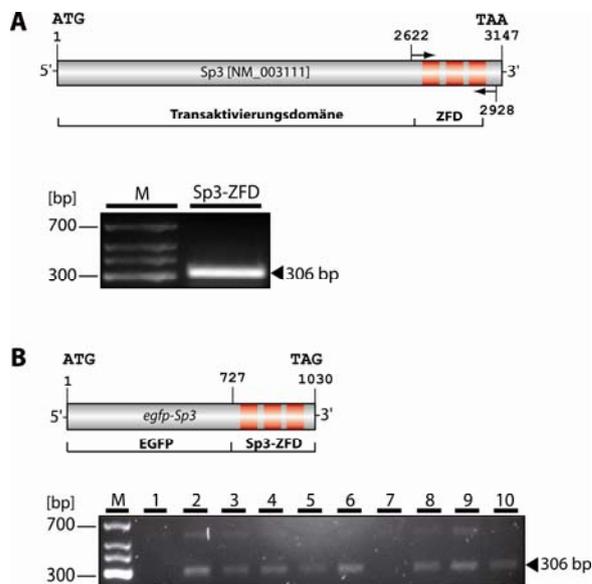


Abb. III - 1. Konzept und Klonierung für das Fusionsprotein EGFP - Sp3. (A) Der humane Transkriptionsfaktor Sp3 setzt sich aus zwei N-terminal, glutaminreichen Transaktivierungsdomänen und der C-terminalen Zinkfinger-Domäne (ZFD) zusammen. Die ZFD von Sp3 wurde mittels flankierender Primer (Pfeile) über PCR amplifiziert. Das PCR - Produkt wurde über Agarosegelelektrophorese identifiziert. (B) Die Sp3 - ZFD ist C - terminal im Leserahmen mit dem *egfp* - Gen fusioniert. Die Kontrolle der korrekten Klonierung erfolgte über Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Bgl*II und *Hind*III Sequenzierung. M – Fermentas Low Range DNA - Leiter; Spur 1 pEGFP - C1; Spur 2 - 10 pEGFP - Sp3 - Klone; 2 % Agarose, EtBr - Färbung.

Die ursprüngliche Lokalisation der ZFD im nativen Transkriptionsfaktor führte zum Entschluss die Domäne C - terminal mit dem Reporter gen EGFP zu fusionieren. Insgesamt wurden neun Klone isoliert und mittels Restriktionsanalyse charakterisiert. Von den isolierten Klonen sind anhand der spezifischen 306 bp - Fragments nach Restriktionsverdau acht Klone positiv evaluiert worden (Abb. III - 1 B).

Nach Kontrolle der positiven Klone durch Sequenzierung wurde Klon #1 (Abb. III - 1 B; Bahn 2) für alle weiteren Transfektionsexperimente verwendet. Das resultierende Konstrukt mit der Bezeichnung pEGFP - Sp3 kodiert neben dem Fusionsprotein EGFP - Sp3 (Abb. II - 1 D) ebenfalls das Neomycin/ Kanamycin - Resistenzen von Tn5. Damit kann eine Selektion von stabil transfizierten Zellen über das Neomycin - Analogon G418 erfolgen.

1.2 ZF - basierte Proteine für prokaryotische Expression

1.2.1 Klonierung von pMAL - Sp1

Für die prokaryotische Expressionsstrategie eines chimären DNA - bindenden Proteins wurde die ZFD vom humanen Transkriptionsfaktor Sp1 ausgewählt (Abb. III - 2 A). Sp1 gilt als Prototyp unter der Sp - Familie und zeigt daher auch identische strukturelle Eigenschaften wie Sp3. Ebenso wie Sp3, hat die ZFD von Sp1 auch die Spezifität für die neun Basen lange Konsensussequenz 5' - GGG GCG GGG - 3' [SUSKE 1999]. Die bereits im Abschnitt zuvor beschriebene Klonierungsstrategie wurde auch für Sp1 übernommen, um die ZFD von der Transaktivierungsdomäne zu isolieren. Vor der Klonierung wurde die ZFD auf Codonpräferenz für die heterologe Expression in *E. coli* überprüft. Alle Codons humanen Ursprungs der ZFD von Sp1 können durch *E. coli* t - RNAs erkannt werden. Damit ist keine Anpassung kritischer Codons an die Präferenzen von *E. coli* nötig. Durch PCR wurde die ZFD isoliert und C - terminal im Leserahmen mit dem bakteriellen *malE* - Gen fusioniert (Abb. III - 2 B). Zur Termination der Translation des gewünschten Fusionsgens wurde durch entsprechendes Primerdesign ein Stopcodon (TAA) eingeführt.

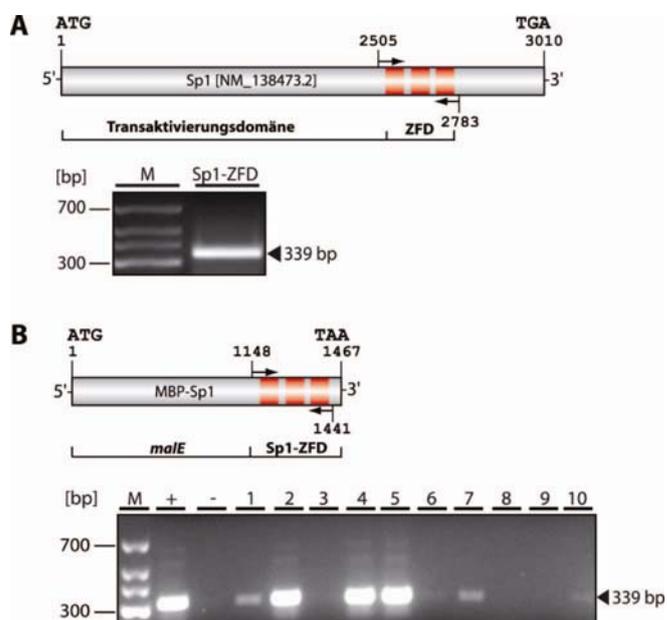


Abb. III - 2. Konzept und Klonierung für das Fusionsprotein MBP - Sp1. (A) Die C - terminale ZFD vom humanen Transkriptionsfaktor Sp1 wurde mittels flankierender Primer (Pfeile) über PCR amplifiziert. Das PCR - Produkt wurde über Agarosegelelektrophorese identifiziert. (B) Die Sp1 - ZFD ist C - terminal im Leserahmen mit dem *malE* - Gen fusioniert. Die Analyse der korrekten Klonierung erfolgte durch PCR mit den Klonierungsprimern und Sequenzierung. M – Fermentas Low Range DNA - Leiter; + pGEM - Sp1; - ddH₂O; Spur 1 - 10 pMAL - Sp1 - Klone. 2 % Agarose, EtBr - Färbung.

Auch bei diesem Konstrukt wurde die natürliche Anordnung der ZFD im C - terminalen Bereich auf das artifizielle Protein übertragen. Insgesamt zehn Klone wurden isoliert, wobei drei Klone durch PCR - Analyse anhand der spezifischen 336 bp - Bande als positiv evaluiert wurden. Nach finaler Sequenzierung wurde Klon #2 für alle weiteren Experimente verwendet (Abb. III - 2 B, Bahn 2). Das prokaryotische Expressionskonstrukt pMAL - Sp1 (Abschn. II 4.1) kodiert MBP mit der C - terminal fusionierten ZFD von Sp1. Die Expression des 1467 bp umfassenden Fusionsgens *malE* - Sp1 steht unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren Promoters P_{tac} . Die Selektion positiver Klone erfolgt über Ampicillin.

1.2.2 Klonierung von 9×Lys - MBP - Sp1

Um die Wahrscheinlichkeit einer gerichteten Immobilisierung zu erhöhen, wurde ausgehend vom *malE* - Sp1 - Fusionsgen (Abb. III - 3 A) über rekombinante DNA - Technologie eine N - terminale Domäne, bestehend aus acht hintereinander angeordneten Lysinen, angefügt. Damit besteht die Domäne nun aus insgesamt 9 hintereinander angeordneten Lysinen (9×Lys), da bereits ein Lysin an Position 7 des Ausgangsproteins vorhanden ist. Die PCR mit dem Primerpaar 8×Lys MBP Sp1 fw/ Sp1 ZFD rev Stop *Hind*III (Tabelle II - 1) führt zum 1509 bp umfassenden Amplikon (Abb. III - 3 A), das über Agarosegelelektrophorese nachgewiesen wurde. Die Klonierung in pMAL - C2x führte zu 5 Klonen, wobei drei als positiv mittels PCR evaluiert wurden (Abb. III - 3 B). Nach Sequenzierung der drei positiven Kandidaten wurde Klon #2 für weitere Experimente verwendet. Die Expansion von nativem MBP auf die 9×Lys - Domäne und deren positive Ladung führt zur Verschiebung des theoretischen pI (Anhang C1) und verstärkt den basischen Charakter des Proteins.

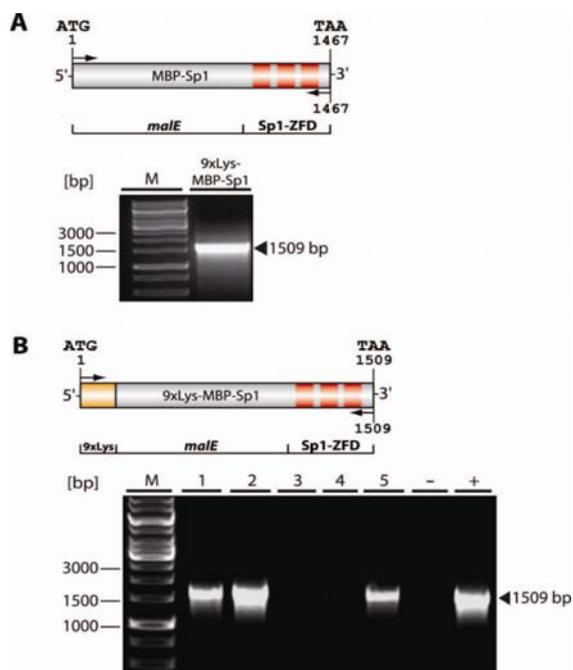


Abb. III - 3. Konzept und Klonierung für die Lysin - Domäne (9×Lys) zur gerichteten Immobilisierung von rekombinanten Proteinen. (A) Als Matrize für die PCR dient das Fusionsgen *malE* - Sp1, welches sich aus dem N - terminalen *malE* - Gen und der C - terminalen ZFD von Sp1 zusammensetzt. Die Pfeile symbolisieren die Positionen des Primerpaares. (B) Das Vorläufergen *malE* - Sp1 wurde durch PCR um die N - terminale lysinreiche Domäne erweitert (9×Lys). Die isolierten Klone wurden durch PCR und analysiert. Die 1509 - bp - Bande indiziert die erfolgreiche Klonierung, welche im Anschluß nochmals durch Sequenzierung der entsprechenden Klone überprüft wurde. M – Fermentas 1 kb DNA Ladder plus Range DNA - Leiter; + pGEM - 9×Lys - MBP - Sp1; - ddH₂O; Spur 1 - 5 pMAL - 9×Lys - Sp1 - Klone, 1 % Agarose, EtBr - Färbung.

1.3 Klonierung eines DNA - bindenden Proteins auf der Basis von DNA-Gyrase

Neben ZFD als funktionelle Elemente, wurde eine alternative Strategie auf der Basis von *E. coli* DNA - Gyrase entwickelt. Konzeptionell stellt das alternative Protein, ebenso wie die ZFD - basierten, ein Fusionsprotein aus MBP und einer C - terminal angeordneten DNA - bindenden Domäne dar. Zur spezifischen Interaktion mit dsDNA wurde die C - terminale Domäne der DNA-Gyrase (Typ II Topoisomerase, Untereinheit A, AS 572 - 875) in den Leserahmen des *malE* - Gens kloniert (Abb. III - 4 A). Dieser Bereich interagiert spezifisch mit den REP, welche spezifisch in Prokaryoten wie *E. coli* und *S. aureus* auftreten [ESPELI & BOCCARD 1997]. Als Ausgangsmatrize für eine initiale PCR diente die bereits klonierte Untereinheit A der DNA-Gyrase, welche auf dem Plasmid pMK90 kodiert ist [MIZUUCHI *et al.*, 1984]. Die flankierenden Primer erzeugten das erwartete spezifische 927 bp - Amplikon (Abb. III - 4 A), welches im Anschluß erfolgreich in den Expressionsvektor pMAL - C2x kloniert wurde. Die erfolgreich umgesetzte Strategie führte zur C - terminalen Fusion mit dem *malE* - Gen. Die Kontrolle der Klonierung durch PCR zeigte, dass sämtliche isolierten Klone den Expressionsvektor propagieren (Abb. III - 4 B). Die anschließende Analyse durch Sequenzierung bestätigte die erfolgreiche Klonierung. Für die Expression wurden die Klone #1, #4 und #6 ausgewählt.

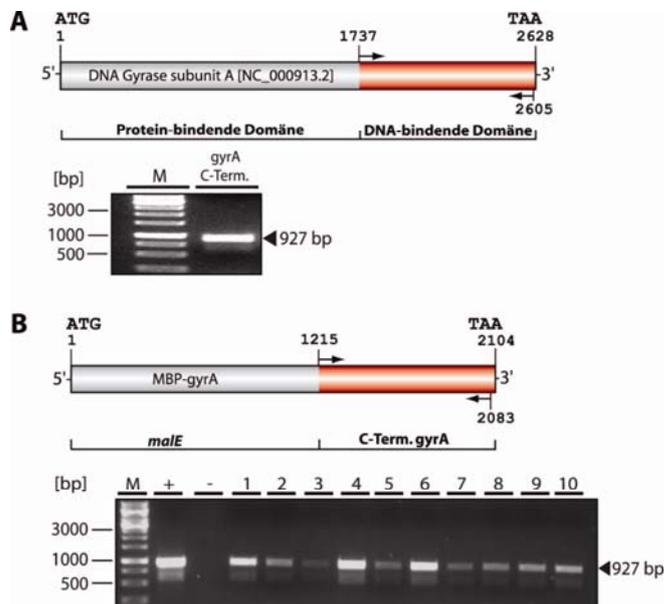


Abb. III - 4. Schematische Darstellung der DNA - Gyrase (Untereinheit A) aus *E. coli* und das klonierte Fusionsgen MBP - gyrA zur prokaryotischen Expression. (A) Die funktionelle DNA - Gyrase (Untereinheit A) besteht aus der N - terminalen Domäne, welche für die Interaktion mit der Untereinheit B verantwortlich ist. Der C - terminale Teil von AS 572 – 875 interagiert spezifisch mit dsDNA [REECE & MAXWELL 1991]. Die Pfeile symbolisieren die entsprechenden Primer, welche die kodierende Zielregion der C - terminalen Domäne flankieren. **(B)** Der kodierende Bereich für die DNA - bindende Domäne der Untereinheit A ist C - terminal mit dem *malE* - Gen fusioniert. Zur Kontrolle der korrekten Klonierung wurde eine PCR mit flankierenden Primern (Pfeile) durchgeführt. Das spezifische 927 bp - Amplikon indiziert positive Klone. M – Fermentas 1 kb DNA Leiter plus; + pGEM - gyrA; - ddH₂O; 1 - 10 pMAL - gyrA - Klone, 1 % Agarose, EtBr - Färbung.

2 Expression von EGFP - Sp3 in HEK293

2.1 Expression von EGFP - Sp3 in HEK293 - Zellen

Zur Expression des Fusionsproteins EGFP - Sp3 - ZFD wurden verschiedene eukaryotische Zelllinien mit dem Konstrukt pEGFP - Sp3 (Abschn. II 4.4) liposomal transfiziert und das Fluoreszenzsignal über einen Zeitraum von 120 h fluoreszenzmikroskopisch überprüft (Abb. III - 5 A). Im Vorfeld durchgeführte Experimente zeigten, dass die Zelllinie HEK293 gegenüber CHO und HeLa - Zellen die akzeptabelste Transfektionseffizienz aufweist (Daten nicht gezeigt). Für die Generierung einer stabil exprimierenden Zelllinie wurde im Folgenden HEK293 - Zellen verwendet. Die *in vitro* - Selektion positiver Transfektanden erfolgte über das Neomycin - Analogon G418.

Nicht transfizierte Zellen (wt) zeigten erwartungsgemäß kein spezifisches Fluoreszenzsignal. Als Positivkontrolle wurden HEK293 - Zellen mit dem Expressionsvektor pEGFP - C1 transfiziert. Das EGFP - Signal stieg hierbei signifikant über 48 h und blieb über den gesamten Zeitraum stabil (Abb. III - 5 A). Die Transfektion mit dem Expressionskonstrukt pEGFP - Sp3 - ZFD führte zum spezifischen Signal nach 24 h, welches über 72 h leicht anstieg. Nach 96 h schwächte das Fluoreszenzsignal jedoch überraschend stark ab.

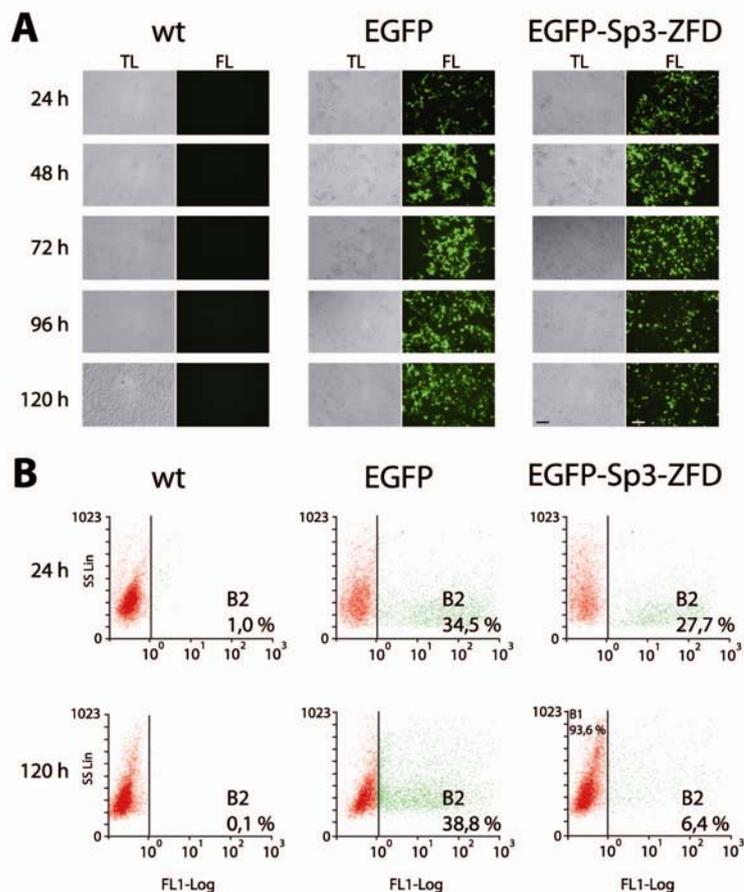


Abb. III - 5. Die Expression von EGFP - Sp3 - ZFD in HEK293 - Zellen. (A) Nachweis der Expression von EGFP - Sp3 - ZFD und EGFP durch Fluoreszenzmikroskopie über einen Zeitraum von insgesamt 120 h post Transfektion. Das exprimierte native EGFP, sowie das artifizielle EGFP - Sp3 - ZFD erzeugen das spezifische Fluoreszenzsignal bei 488 nm Anregungswellenlänge. Die untransfizierten HEK293 (wt) zeigen lediglich unspezifische Hintergrundsignale. Maßstab: 100 μ m (weißer bzw. schwarzer Balken); TL - Durchlicht; FL - Fluoreszenzanregung
(B) Quantitative Analyse des prozentualen Anteils von EGFP - und EGFP - Sp3 - ZFD exprimierender HEK293 - Zellen nach Transfektion über den Zeitraum von 120 h. Der prozentuale Anteil von positiven Transfektanden, welche EGFP - Sp3 - ZFD exprimieren, ist nach 120 h signifikant reduziert. Die dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für drei unabhängige Wiederholungen.

Eine präzisere durchflußzytometrische Analyse transfizierter Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten ergab, dass der prozentuale Anteil EGFP - exprimierender Zellen sich über den Zeitraum von 120 h post Transfektion von 34,5 % auf 38,8 % erhöht. Im Gegensatz dazu wurde bei der Population der EGFP-Sp-ZFD exprimierenden Zellen eine massive Abnahme deren prozentualen Anteils von zunächst 27,7 % auf 6,4 % über einen Zeitraum von 120 h nachgewiesen (Abb. III - 5 B).

2.2 Analyse der Integrität des EGFP - Sp3 - ZFD - Transkripts

Die geringe Ausbeute an EGFP - Sp3 - ZFD exprimierenden Klonen gegenüber dem nativen EGFP lässt eine Degradierung des Fusionsproteins durch endogene Mechanismen, wie proteasomale Degradierung, vermuten. Um diese Hypothese zu belegen, wurde zunächst die Integrität des Transkripts qualitativ über einen Zeitraum von 120 h post Transfektion untersucht. Dazu wurden HEK293 - Zellen mit dem Expressionsvektor pEGFP - Sp3 - ZFD transfiziert und im Anschluß über einen Zeitraum von 120 h die gesamt - RNA isoliert und in cDNA transkribiert, welche als Matrize für nachfolgende PCR - Reaktionen diente. Für den Nachweis der cDNA - Integrität wurden Primer verwendet (Tab. II - 1), welche spezifisch für das, nahezu in allen Geweben exprimierte, Haushaltsgen *Gapdh* sind [BARBER *et al.*, 2005]. Für den Nachweis des EGFP - Sp3 - ZFD - Transkripts wurden ebenfalls spezifische Primer verwendet (Tab. II - 1).

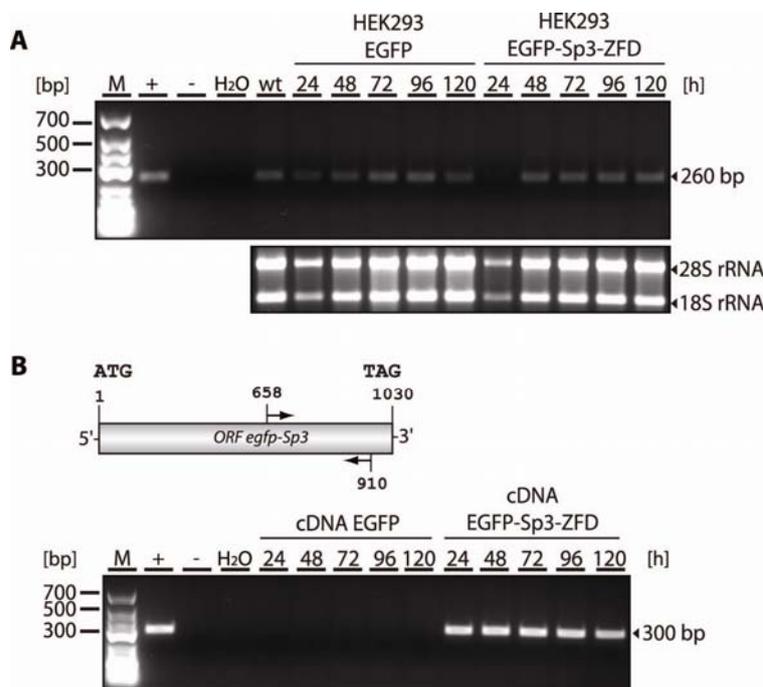


Abb. III - 6. Qualitative Analyse er *egfp - Sp3* mRNA nach Transfektion von HEK293.

(A) Eine nachgeschaltete PCR mit spezifischen Primern für das Haushaltsgen *Gapdh*, dient als Kontrolle für die cDNA - Integrität. Die spezifische 260 bp - Bande indiziert eine erfolgreiche cDNA - Synthese (oben). Als qualitative Analyse für isolierte RNA, wurde diese über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (unten). + humane cDNA; - ohne Reverse Transcriptase (B) Eine typische PCR auf cDNA für den Nachweis des *egfp - Sp3* Transkripts. Die Pfeile markieren die Positionen der EGFP - Sp3 - ZFD - Primer. Die spezifischen Banden bei 300 bp indizieren Integrität der spezifischen cDNA des Fusionsgens nach der Transfektion über einen Zeitraum 120 h. M – Fermentas Low Range Marker; + pEGFP - Sp3 - ZFD; - wt (nicht transfiziert); PCR - Gele 2 % Agarose, RNA - Gel 1 % Agarose; EtBr - Färbung

Die spezifischen Signale für *Gapdh* (Abb. III - 6 A) belegen die erfolgreiche reverse Transkription der RNA. Die Signale bleiben bei parallelen Ansätzen ohne Reverse Transkriptase (-) aus, somit kann es sich nicht um Artefakte durch Kontamination von humaner gDNA handeln. Die PCR für *egfp - Sp3* ergab in allen isolierten Proben die spezifische Bande, was eine korrekte Transkription der mRNA indiziert. Durch die fehlenden Banden bei der cDNA von *egfp*, wird eine Kreuzkontamination ausgeschlossen (Abb. III - 6 B).

2.3 Translation von EGFP - Sp3 - ZFD und Degradierung

Der Nachweis der mRNA führt zur Annahme, dass EGFP - Sp3 - ZFD womöglich posttranslational modifiziert und degradiert wird. Dazu wurde zunächst isoliertes zytosolisches Protein zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert und proteinbiochemisch mittels Western Blot analysiert.

GFP und sein viel verwendetes Derivat EGFP gelten als sehr stabile Proteine mit einer überdurchschnittlichen Halbwertszeit [CHALFIE *et al.*, 1994; LI *et al.*, 1998]. Im Immunoblot kann EGFP über den gesamten Zeitraum von 120 h detektiert werden (Abb. III - 7). Im Gegensatz dazu wird das Fusionsprotein EGFP - Sp3 - ZFD bereits nach 72 h kaum noch im Immunoblot detektiert, was auf eine progressive Degradierung hinweist. Nach 120 h ist das Protein in den zytosolischen Lysaten nicht mehr nachweisbar. In Anbetracht der zuvor durchgeführten mRNA - Analyse wird die Hypothese einer cytosolischen Modulation gefolgt von einer proteasomalen Degradierung aufgestellt. Es ist bekannt das die Mitglieder der Sp - Familie posttranslational phosphoryliert [CHUN *et al.*, 1998], glycosyliert [GOLDBERG *et al.*, 2006], acetyliert [BRAUN *et al.*, 2001] und SUMOyliert [SAPETSCHNIG *et al.*, 2002] werden. Die Modifikationen modulieren vorwiegend die Aktivität und Translokation der Sp - Transkriptionsfaktoren in den Zellkern. Die Konjugation von SUMO (*small ubiquitin like modifier*) an ϵ - Aminogruppen von Lysinresten, markiert ein Protein für den proteasomalen Abbau.

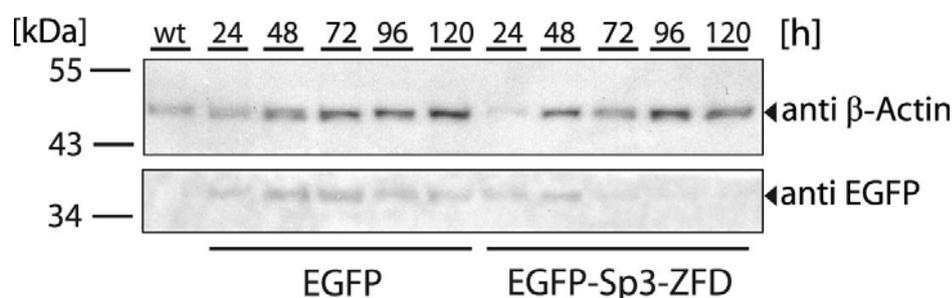


Abb. III - 7. EGFP - Sp3 - ZFD wird posttranslational reguliert. Die Analyse mittels Western Blot mit einem anti - EGFP - Antikörper auf isoliertes cytosolisches Protein von transfizierten HEK293 - Zellen zeigt, dass EGFP - Sp3 - ZFD bereits nach 72 h degradiert wird. Nach 120 h ist EGFP - Sp3 - ZFD nicht mehr zu detektieren. Das native EGFP hingegen zeigt eine deutlich höhere Stabilität über den gleichen Zeitraum. Der Immunoblot mit anti β - Actin - Antikörper dient als Ladekontrolle. wt - untransfizierte Kontrolle

Die Behandlung von EGFP - Sp3 - ZFD exprimierenden HEK293 hingegen hat einen deutlichen Effekt auf die Stabilität des Fusionsproteins. Bereits 24 h nach Gabe von MG132 konnte EGFP - Sp3 - ZFD im Zytosol stabilisiert werden (Abb. III - 8). Der Effekt der Stabilisierung konnte über einen Zeitraum von 48 h mit MG132 - Exposition ebenso gezeigt werden. Die Behandlung der EGFP - und EGFP - Sp3 - ZFD exprimierenden Zellen mit dem MG132 - Lösungsmittel DMSO hat keinen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Proteinexpression, was wiederum unspezifische Effekte ausschließt. Die ZFD von Sp3 als Fusionspartner von EGFP vermittelt einen destabilisierenden Effekt und führt zur zum proteasomalen Abbau des Fusionsproteins. Die Art der posttranslationalen Modifikation der ZFD muss in weiterführenden Experimenten charakterisiert werden.

3 Expression von DNA - bindenden Proteinen in *E. coli*

3.1 Expression und Lokalisation MBP - Sp1 und 9xLys - MBP - Sp1

Als alternative Strategie zur Herstellung von ZFD - basierten Proteinen in eukaryotischen Zellen, wurde die heterologe Expression im *E. coli* BL21(DE3) etabliert. Um die optimalen Expressionsbedingungen zu ermitteln wurden mit den entsprechenden Konstrukten (Abschn. II 4) transformierte BL21(DE3) bis zur optimalen OD angezogen und die Expression von der Zielgene mit IPTG induziert (Abschn. II 6.1). Als Kontrollen dienten nicht induzierte Kulturen (- IPTG). In Zeitabschnitten von 1 h wurden von sämtlichen Kulturen Proben entnommen und durch proteinbiochemische Methoden analysiert.

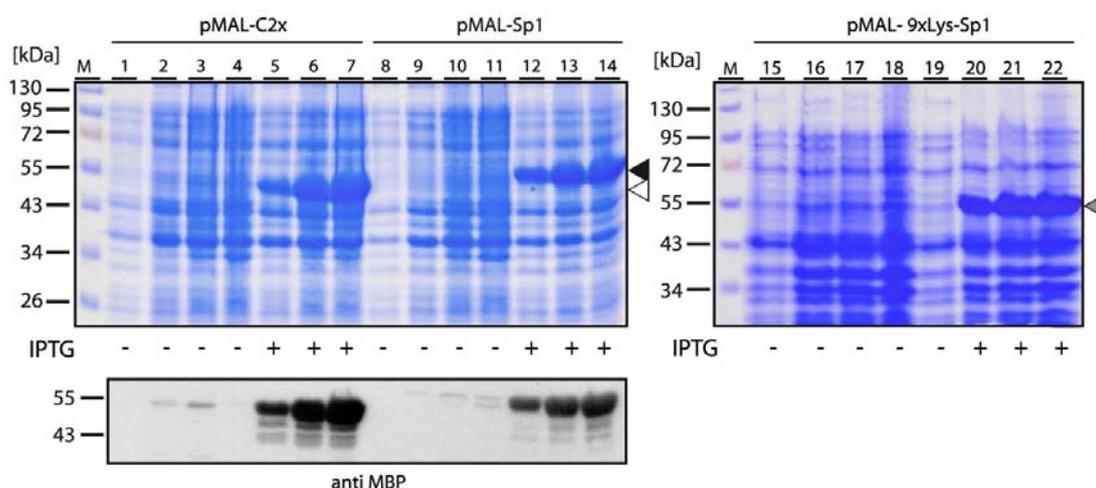


Abb. III - 9. Heterologe Expression von MBP - Fusionsproteinen in *E. coli* BL21(DE3). Zur Analyse der IPTG - vermittelten Expression von MBP und MBP - Sp1 wurden Lysate von Transformanten in der SDS - PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die spezifische Analyse von exprimierten MBP - Sp1 und nativen MBP erfolgte mittels Western Blot. Die Pfeile indizieren die spezifischen Banden für MBP (weiss), MBP - Sp1 (schwarz) und 9xLys - MBP - Sp1 (grau). M – Fermentas Page Ruler, vorgefärbt.

Die qualitative Analyse mittels SDS - PAGE zeigt, dass die Expression von nativen MBP und den Fusionsproteinen MBP - Sp1 sowie 9xLys - MBP - Sp1 durch Gabe von IPTG induziert wird (Abb. III - 9). Die Expression erfolgte bei allen Zielproteinen über 3 h und die Akkumulation der spezifischen Genprodukte kann im Gel eindeutig nachgewiesen werden. Das Ausbleiben der spezifischen Banden bei den uninduzierten Kontrollen (Abb. III - 9; Bahn 1 - 4/ 8 - 11/ 15 - 19), verdeutlicht die effektive Repression des P_{tac} - Promoters durch das Repressorprotein *LacI* [AMANN *et al.*, 1983]. Die spezifische Bande für MBP bei den pMAL - C2x - Transformanten erscheint nach der Zugabe von IPTG und korrespondiert mit der internen Kontrolle (M) bei ~ 43 kDa (Abb. III - 9; Bahn 5 - 7), was mit dem Molekulargewicht (MW) von nativen MBP mit 42,5 kDa korreliert [DI GUAN *et al.*, 1988]. Nach der IPTG - Induktion der pMAL - Sp1 - Transformanten wird eine intensive Bande bei 55 kDa sichtbar (Abb. III - 9; Bahn 12 - 14), was mit dem vorhergesagten MW von MBP - Sp1 von 54 kDa korreliert (Anhang C1). Im Anschluss an die Expressionsanalyse wurde die Lokalisation und Löslichkeit des Fusionsproteins MBP - Sp1 bestimmt. Es ist für den Erfolg der Aufreinigung von außerordentlicher Bedeutung, das Expressionsverhalten des Zielproteins zu bestimmen, um eine geeignete Aufschluss - bzw. Aufreinigungsstrategie festzulegen. Dazu wurden IPTG - induzierte Zellpellets mit Ultraschall oder osmotischen Schock aufgeschlossen (Abschn. II 6.1) und in der SDS - PAGE analysiert. Die schwache Bandenintensität des zytoplasmatischen Pellets (P) gegenüber dem löslichen Überstand (Ü) zeigt, dass MBP - Sp1 zu 90 % im gelösten Zustand im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. III - 10). Die vergleichsweise intensivste Bande bei der mit Amylose - inkubierten Zytoplasma - Fraktion (A) deutet auf eine erfolgreiche Anreicherung von MBP - Sp1 aus dem zytoplasmatischen Überstand. Für den Aufreinigungsprozess wurde aufgrund der guten Löslichkeit und Stabilität eine native Strategie gewählt, wobei das Zielprotein in der ursprünglichen Konformation während der Aufreinigung erhalten bleibt. Die Isolierung der periplasmatischen Fraktion, zeigt dass MBP - Sp1 dort zu 95 % unlöslich vorliegt (P) und nur ein sehr geringer Anteil gelöst ist. Der Zellaufschluss durch Ultraschall stellt für MBP - Sp1 die optimale Vorgehensweise dar. Für MBP sowie 9xLys - MBP - Sp1 wurde die äquivalente Aufschlussmethode gewählt.

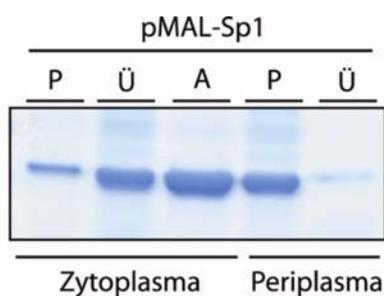


Abb. III - 10. Lokalisation von MBP - Sp1 und Löslichkeit. Fraktionen von zytoplasmatischen und periplasmatischen Isolaten von pMAL - Sp1 - Transformanten wurden in der SDS - PAGE mit anschließender Coomassiefärbung analysiert. Der Überstand (Ü) repräsentiert den löslichen und das Pellet (P) den unlöslichen Anteil. MBP - Sp1 wurde aus dem zytoplasmatischen Überstand mittels Amylosegranulat (A) angereichert.

3.2 Aufreinigung von nativen MBP und MBP - Fusionsproteinen

Natives MBP und die Fusionsproteine MBP - Sp1 und 9×Lys - MBP - Sp1 wurden aus BL21(DE3) - Lysaten über Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abschn. II 6.2). Fusionsproteine, welche vom pMAL - C2x - System exprimiert werden, repräsentieren 20 - 40 % des zellulären Proteingehalts [HEWITT *et al.*, 2011]. Bei 500 ml - Kulturen geht man einer Menge von 175 mg Totalprotein aus [GRIFFITH & WOLF 2002]. Hierbei liegt Anteil an nativen, zytosolischen Zielprotein bei ~30 mg, wenn 90 % gelöst sind (Abschn. III 3.1). Ein Volumen von 1 ml Amylosegranulat besitzt eine Bindekapazität von 6 - 8 mg (nach Herstellerangaben) rekombinantem MBP. Durch verschiedene Faktoren, welche die intrinsische Bindeaktivität von MBP an Amylose beeinflussen und die Konkurrenz um die Bindestelle mit endogenem MBP, wird eine Ausbeute der Fusionsproteine um 1 - 2 mg/ ml erwartet.

Die Analyse der einzelnen Aufreinigungsschritte durch SDS - PAGE zeigt, dass MBP sowie die zwei Fusionsproteine MBP - Sp1 und 9×Lys - MBP - Sp1 durch Amylose - Affinitätschromatographie aus zytosolischen Überständen nach Ultraschallaufschluss aufgereinigt werden können (Abb. III - 11). Bei sämtlichen Lysaten zeigt die Proteingehaltsbestimmung durch BCA - Assay (Abschn. II 6.3), dass ein Großteil des Proteins im Überstand nicht an der Amylose - Matrix binden. Ein erheblicher Teil des Proteins geht zudem in den Waschsritten (W) verloren. Der gebundene Anteil an Protein konnte durch Maltose - Puffer von der Amylosematrix eluiert werden (E). In der Regel wurden aus 500 ml - Kulturen, nach 3 h Expression bei 37°C, um die 1 - 2 mg MBP und MBP - Fusionsprotein aufgereinigt, was mit den im Vorfeld kalkulierten Ausbeuten einhergeht. Die Reinheit der Elutionsfraktion (E1) betrug bei sämtlichen Aufreinigungen um die 90 %, die zweite Elutionsfraktion (E2) wies eine Reinheit um 95 % auf.

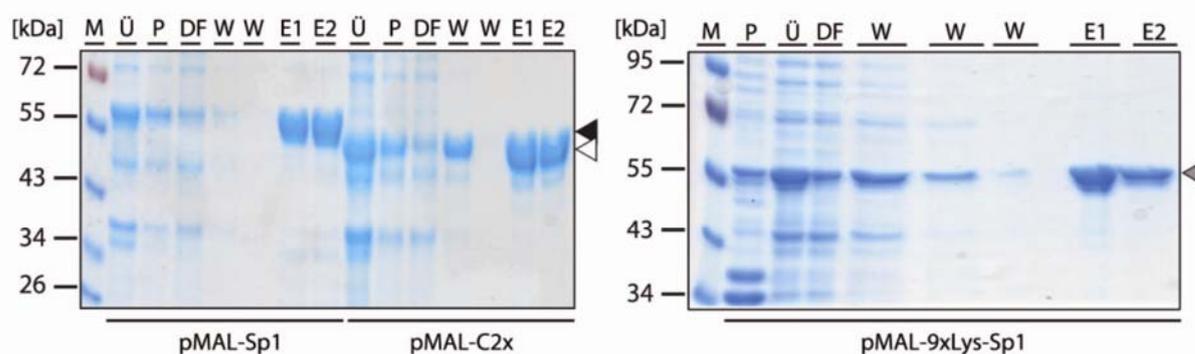


Abb. III - 11. Aufreinigung von MBP und MBP - Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie.

Zur Analyse der des Aufreinigungsprozesses aus zytosolischen Lysaten wurden Proben mit 10 µg Gesamtproteingehalt durch SDS - PAGE mit anschließender Coomassie - Färbung analysiert. Die Pfeile markieren die spezifischen Banden für MBP (weiss), MBP - Sp1 (schwarz) und 9×Lys - MBP - Sp1 (grau). M - Marker Fermentas Page Ruler *prestained*; Überstand (Ü); Pellet (P) Durchfluss vom Überstand (DF); Waschfraktionen (W); Elutionsfraktionen (E1-2).

3.3 Expression und Lokalisation MBP - gyrA

Mit dem Expressionskonstrukt pMAL - gyrA wurden BL21(DE3) transformiert und zur optimalen OD herangezogen. Die Expression des Zielgens wurde durch Zugabe von IPTG während der exponentiellen Wachstumsphase induziert. Die Analyse der Expression und Lokalisation wurde mit SDS - PAGE durchgeführt. Bereits 1 h post Induktion kann im Gel eine intensive Bande bei ~72 kDa detektiert werden, was mit dem vorhergesagten MW von MBP - gyrA von 75 kDa (Anhang C1) übereinstimmt (Abb. III - 12, Bahn 2). Durch den Aufschluss mit Ultraschall unter nativen Bedingungen liegt MBP - gyrA zu je 50 % ungelöst im Pellet (P) und gelöst im Überstand (Ü) des Zytosols vor. Die Anreicherung (A) durch Inkubation mit Amylosegranulat bestätigt die aktive Konformation von MBP - gyrA und lässt eine native Aufreinigungsstrategie zu. Die Analyse der periplasmatischen Fraktion indiziert, dass MBP - gyrA nach der Translation in relativ geringen Mengen im Periplasma lokalisiert ist und dort vorwiegend in der löslichen Konformation vorliegt (Abb. III - 12).

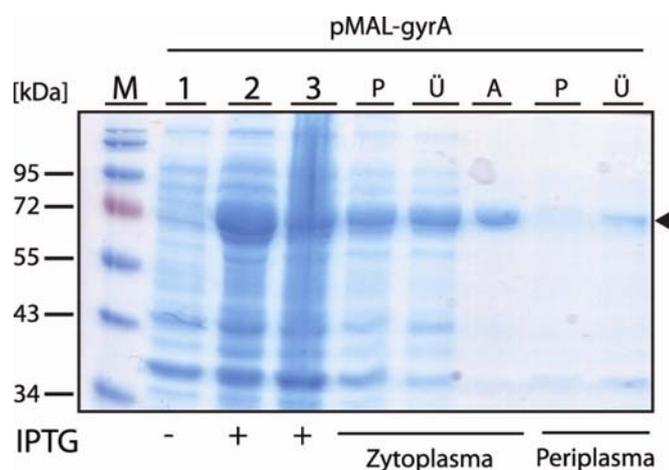


Abb. III - 12. Expression, Löslichkeit und Lokalisation von MBP - gyrA in *E. coli* BL21(DE3). Lysate von nicht induzierten Kulturen (Bahn 1) und IPTG - induzierten Kulturen (Bahn 2 - 3) wurden über SDS - PAGE mit anschließender Coomassie - Färbung analysiert. Der Pfeil markiert die spezifische Bande für MBP - gyrA bei ~75 kDa. Für die Lokalisationsbestimmung und Löslichkeitsanalyse wurden 5 µg Totalprotein vom Überstand (Ü) und vom Pellet (P) auf dem Gel aufgetrennt. Angereicherte Fraktion aus zytoplasmatischem Überstand mit Amylosegranulat (A), M – Marker Fermentas Page Ruler *prestained*.

3.4 Aufreinigung von MBP - gyrA

Wie bereits bei MBP - ZFDs theoretisch ermittelt (Abschn. III 3.2), wird eine Ausbeute aus einer 500 ml Kultur und 1 ml Amylosegranulat um 1 - 2 mg/ml erwartet. MBP - gyrA wurde in BL21(DE3) überexprimiert und unter nativen Bedingungen aus der löslichen Fraktion aufgereinigt (Abb. III - 13).

Nahezu 80 % der gelösten Fraktion binden nicht an der Amylosematrix und fließen durch die Säule (DF). Während den Waschschrinen (W) wird ein zudem beträchtlicher Anteil von MBP - gyrA von der Säule gewaschen. Offenbar interagiert MBP - gyrA mit anderen Monomeren über elektrostatische Wechselwirkungen, welche mit Waschpuffern höherer Ionenstärke wieder aufgelöst werden. MBP - gyrA wird durch den maltosehaltigen Puffer von der Säule eluiert und liegt angereichert, mit einer Reinheit von ~95 % vor. Durch die gewählten nativen Aufreinigungsbedingungen, wurden in den Elutionsfraktionen (E1 und E2) ~2 mg/ ml MBP - gyrA angereichert.

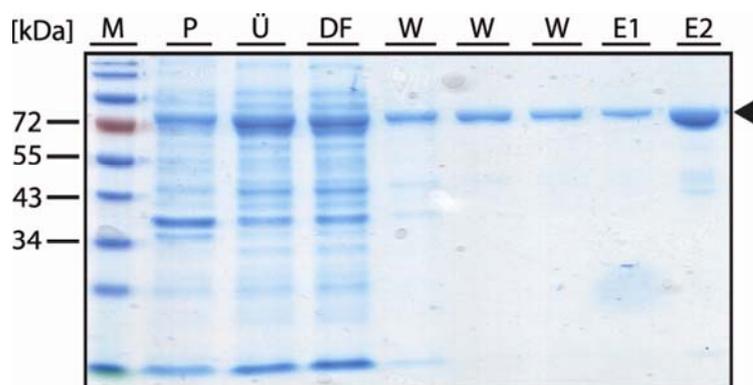


Abb. III - 13. Aufreinigung von MBP - gyrA durch Affinitätschromatographie. Zur Analyse des Aufreinigungsprozesses aus zytoplasmatischen Lysaten wurden Proben mit 20 µg Gesamtproteingehalt durch SDS - PAGE mit anschließender *Coomassie* - Färbung analysiert. Der Pfeil markiert die spezifische Bande für MBP - gyrA. M – Marker, Fermentas Page Ruler *prestained*; Überstand (Ü); Pellet (P) Durchfluss vom Überstand (DF); Waschfraktionen (W); Elutionsfraktionen (E1-2).

4 DNA - Bindeigenschaften von MBP - Fusionsproteinen

4.1 DNA - Protein - Interaktion von Fusionsproteinen mit Sp1 - ZFD

Zur simplen Analyse der DNA - Bindeaktivität von aufgereinigten rekombinanten MBP - ZFD - Fusionsproteinen wurden modifizierte Gelshift - Assays etabliert (Abschn. II 6.7). Das jeweilige Fusionsprotein wurde mit dsDNA - Oligos, welche die GC - Box - Konsensussequenz (im Folgenden GC - Box genannt, Tabelle II - 1) beinhalten, in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Zn^{2+} inkubiert. Das stöchiometrische Verhältnis von dsDNA/ Protein wurde zudem variiert.

DNA - Protein - Komplexe wurden bei einem Verhältnis von 1:1 (DNA/ Protein) nicht über die EtBr - Färbung vom Gel detektiert (Abb. III - 14 A). Bei einem Verhältnis DNA/ Protein von 1:4 wurden schwache Signale von dsDNA - Protein Komplexen bei MBP - Sp1, sowie bei dem Derivat 9xLys - MBP - Sp1 detektiert. Die Signalintensität wird stärker bei 10 fachem Stoffmengenüberschuss an Protein. Die ausbleibenden Signale bei MBP in Gegenwart von dsDNA demonstrieren, dass die Interaktion mit der dsDNA nur über die fusionierte Sp1 - ZFD vermittelt wird.

Man kann davon ausgehen, dass sich der Komplex bereits bei einem Verhältnis von 1:1 bildet, deren Detektion jedoch durch die untere Nachweisgrenze von EtBr limitiert wird [SHARP *et al.*, 1973]. In Abwesenheit von Zn^{2+} wird bei MBP - Sp1 überraschenderweise eine Bindeaktivität zur dsDNA detektiert (Daten nicht gezeigt). Das Zinkion ist von außerordentlicher Bedeutung für die Faltung der ZF und die daraus resultierende Spezifität [MICHAEL *et al.*, 1992]. ZF kommen in drei Konformation vor: ungefaltet, gefaltet und DNA - assoziiert. Ungefaltete ZF binden zumindest keine dsDNA mit der entsprechenden Spezifität [IUCHI & KULDELL 2005].

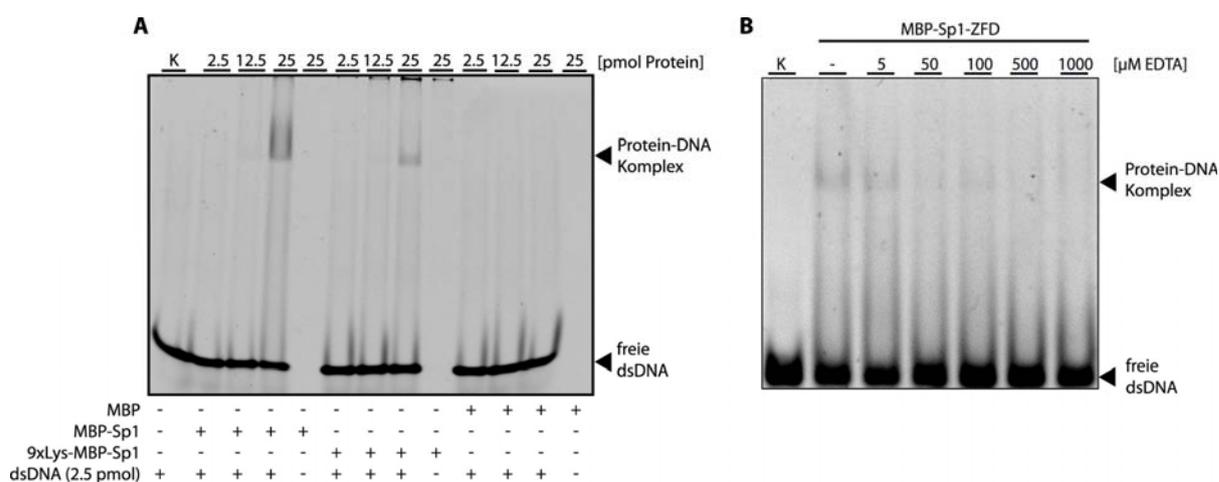


Abb. III - 14. Funktionalität von rekombinanten MBP - ZFD - Fusionsproteinen. (A) Ein dsDNA - Oligo mit dem spezifischen GC - Box - Bindemotiv (5' - GGG GCG GGG - 3') wurde mit steigenden Stoffmengen von rekombinanten Protein inkubiert und anschließend auf einem nativen Acrylamidgel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt. Als Kontrolle (K) diente eine Probe ohne Proteinzugabe, sowie rekombinantes MBP. **(B)** MBP - Sp1 und das spezifische dsDNA - Oligo (10:1) wurden zusammen mit steigenden Konzentrationen des Metallchelators EDTA inkubiert und auf einem nativen Acrylamidgel mit anschließender EtBr - Färbung analysiert.

Ein Experiment mit MBP - Sp1 und dsDNA im Verhältnis 10:1 und in Gegenwart steigender EDTA - Konzentrationen bis 1 mM unterstützt die Theorie über die Funktion des Zinkions bei der Faltung von Cys_2His_2 - ZFD (Abb. III - 14 B). Bereits bei einer Konzentration von 5 μ M EDTA zeichnet sich eine deutliche Inhibierung der ZFD - DNA Interaktion ab. Bei einer Konzentration von 50 μ M EDTA sind nahezu keine DNA - Protein - Komplexe mehr zu detektieren.

ZFD sind in der Zn^{2+} - vermittelten, gefalteten Form mit einer freien Enthalpie (ΔG) von - 10 kcal/mol äußerst stabil [MATSUSHITA & SUGIURA 2001]. Die Koordinierung des Zinkions und die damit verbundene Faltung wird vermutlich bereits nach der Expression im Zytosol vollzogen. Die Sp1 - ZFD oder ZF im Allgemeinen besitzen offenbar eine sehr starke Affinität zum Zinkion was die stabile Konformation des Komplexes über den gesamten Aufreinigungsprozess und die einhergehende Bindeaktivität in Abwesenheit von Zn^{2+} erklärt.

4.2 Charakterisierung der Spezifität der Sp1 - ZFD zur GC - Box und Varianten

Eine Analyse der Spezifität der humanen Sp1 - ZFD gegenüber der GC - Box wurde anhand von synthetisierten dsDNA - Oligos untersucht bei denen für die Interaktion der Sp1 - ZFD relevante Basen ausgetauscht wurden bzw. das Motiv nicht beinhalten (Abb. III - 15 A). Für Anwendungen, in bspw. diagnostischen Systemen auf dem Bereich der Nukleinsäureanalytik, entscheidet die Spezifität zur Zielsequenz über eine mögliche Verwendung von rekombinanten artifiziellen ZFD - Fusionsproteinen.

In modifizierten EMSAs wurde die Bindung an das GC - Box - Oligo bei 10fachem Überschuss an MBP - Sp1 gegenüber dsDNA - Oligo gut reproduziert. Allerdings interagiert MBP - Sp1 auch mit dsDNA - Oligos, welche die GC - Box - Derivate beinhalten (Abb. III - 15 B). Der Bandenintensität freier dsDNA nach zu urteilen, zeigt MBP - Sp1 unter den veränderten Oligos eine vergleichbare Affinität, aber dennoch nicht in dem Maße, wie für die native GC - Box. Studien über den Erkennungsmechanismus der Sp1 - ZFD, demonstrieren dass alle ZF in der Interaktion mit der GC - Box involviert sind.

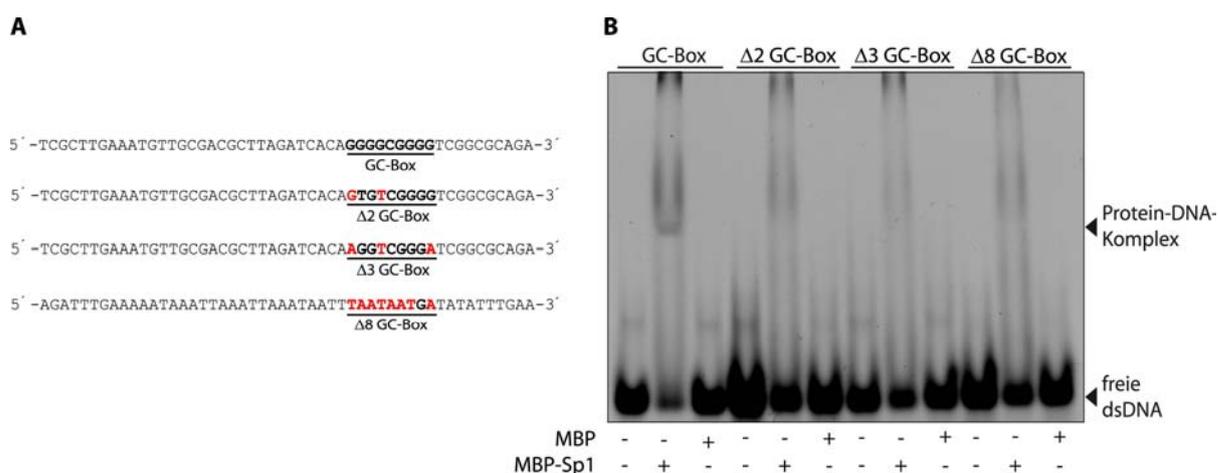


Abb. III - 15. Bindung von MBP - Sp1 an GC - Box - Derivate. (A) Die verwendeten 50 bp - Oligos beinhalten eine native GC - Box bzw. abgewandelte Derivate (Δx , x - Anzahl der Basensubstitutionen). Die komplementären Stränge sind zur Vereinfachung nicht angegeben. (B) Gel - Shift - Assays zur qualitativen Analyse der Interaktion zwischen MBP - Sp1 und GC - Box - Derivaten. 2,5 pmol der jeweiligen dsDNA - Oligos wurden zusammen mit 25 pmol MBP - Sp1 inkubiert und auf einem 5%igen, nativen Acrylamidgel mit EtBr - Färbung analysiert. Als Kontrollen dienten äquivalente Stoffmengen an MBP sowie dsDNA - Oligos ohne Gegenwart von Protein.

Tieferegehende NMR - Analysen der Sp1 - ZFD verdeutlichen, dass ZF1 für das 3' - Triplet GGG eine geringere Affinität aufweist, verglichen zu ZF2 und ZF3. Zurückzuführen ist die geringe Affinität auf die AS - Reste, welche an der dsDNA - Interaktion involviert sind. Für ZF1 sind lediglich zwei Aminosäurereste der Helix - Region für die Erkennung der Sequenz zuständig [YOKONO *et al.*, 1998], was die dennoch erfolgte Bindung von MBP - Sp1 an die hier modifizierten Motive erklären kann.

4.3 Kinetische Analysen der Interaktion von MBP - Sp1 zur GC - Box und Varianten

4.3.1 Optimierung des BIAcore - Assays für Interaktionsmessungen

Die Carboxygruppen der funktionalen Dextranmatrix auf handelsüblichen BIAcore - Chips erlauben die effiziente, kovalente Modifizierung durch bspw. Streptavidin (SA) über die EDC/ NHS - Strategie (Abschn. II 7.2). Die Immobilisierung beginnt mit der Transformierung von Carboxylgruppen zu aktivierten Estern durch Injektion von wässriger EDC/ NHS - Lösung, gefolgt von der Injektion der SA - Lösung. Die Absättigung der verbleibenden NHS - Ester nach der SA - Injektion erfolgte durch Ethanolamin. Über EDC/NHS - Aktivierung wurden auf der Sensorchipoberfläche zwischen 1549 RU und 1925 RU von SA immobilisiert (Abb. III - 16 A). Nimmt man an, dass 1000 RU einer immobilisierten Menge an Protein von 1 ng/ mm² entsprechen [SAFSTEN 2009], dann wurden Mengen von 1,5 bzw. 1,9 ng/ mm² SA an die Sensoroberfläche gekoppelt. Zur Überprüfung der irreversiblen Immobilisierung von SA wurde die Sensoroberfläche mit 0,05 % SDS gespült. Darauf folgende Injektionen hatten keinen messbaren Einfluss auf die Stabilität der Basislinie, was die irreversible Kopplung von SA bestätigt (Daten nicht gezeigt). Biotinylierte dsDNA - Oligos und ssDNA - Oligos binden mit nahezu irreversibel und mit hoher Affinität an immobilisiertes SA. Durch Titration verschiedener Mengen an biotinylierter DNA wurde die Beladung der SA - Oberfläche dahingehend optimiert, dass nach Oligo - Immobilisierung ein Verhältnis von SA zu dsDNA bzw. ssDNA von 1:1,2 bis 1:2,8 vorlag (Tabelle III - 1). Für die Experimente wurden zwischen 376 RU und 476 RU an biotinylierten Oligos an die Oberfläche gekoppelt (Abb. III - 16 B). Um Fehlinterpretationen der Dissoziationsraten zu verhindern, wurde die Stabilität der Biotin - SA - Bindung durch Injektion von Laufpuffer über mehrere Stunden überprüft. Die extensive Spülung der modifizierten Sensoroberfläche resultierte in der vernachlässigbaren Abnahme der Basislinie von < 10 RU per Stunde.

Tab. III - 1. Übersicht der gemessenen Parameter der DNA - Immobilisierung auf SA - modifizierten Sensoroberflächen

Konsensussequenz	Signaländerung (ΔRU)	DNA (ng/ mm ²)	molekulares Verhältnis DNA : SA
GC - Box	476	0,371	1 : 2,2
Δ3 GC - Box	438	0,342	1 : 2,1
Δ8 GC - Box	376	0,293	1 : 2,8
ssDNA GC - Box	454	0,354	1 : 1,2

Eine optimale Beladung der Oberfläche mit Ligand ist wichtig, damit die initiale Bindung von MBP - Sp1 nicht diffusionslimitiert ist (gilt nur bei $c_{\text{MBP-Sp1}} = \text{const.}$). Mit fortlaufender Reaktion sinkt die Anzahl der freien Bindestellen, und die Rate der Bindungen wird nur noch durch die intrinsischen Reaktionskonstanten bestimmt. Es stellen sich damit innerhalb kürzester Zeit stationäre Zustände ein,

welche für die Berechnung der Konstanten wichtig sind [BONDESON *et al.*, 1993]. Um eventuelle unspezifische Wechselwirkungen mit der SA auszuschließen, wurden hierzu verschiedene Konzentrationen von MBP - Sp1 über die SA - modifizierte Oberfläche geleitet. Daraufhin wurden keine messbaren Änderungen der Basislinie detektiert. Eine unspezifische Interaktion von MBP - Sp1 mit SA kann somit ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

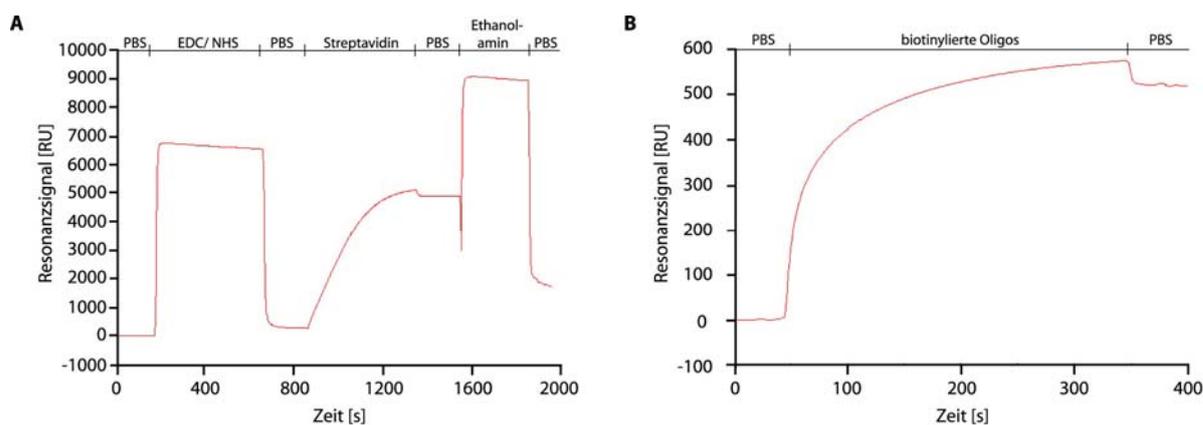


Abb. III - 16. Prozess der Immobilisierung von DNA auf CMD5 - Sensorchips. (A) Sensogramm einer typischen SA - Immobilisierung an die CMD5 - Matrix über EDC/NHS - Aktivierung. SA - Lösung – 50 µg/ ml in 5 mM NaAc (pH 5); 1 M Ethanolamin (pH 8,0) (B) Repräsentatives Sensogramm der Immobilisierung von biotinylierten Oligos nach SA - Funktionalisierung. Oligo - Lösung – 0,5 µM in HBS - T (pH 7,5).

4.3.2 Kinetische Analyse der MBP - Sp1 - DNA - Interaktion

Entsprechend der Theorie hinter dem BIAcore - System können Assoziations - und Dissoziationsraten aus den Sensogrammen kalkuliert werden. Eine Übersicht der kalkulierten kinetischen Parameter für die Interaktion von MBP - Sp1 und GC - Box - Derivaten ist in Tab. III - 2 zusammenfassend dargestellt. Die daraus ermittelten Dissoziationskonstanten (K_d) bewegen sich bei allen GC - Box - Derivaten zwischen 1 - 10 nM.

Diese Resultate korrelieren mit bereits publizierten Daten, wo eine K_d für das native Sp1 (*full length*) im Bereich von 1 – 3 nM bestimmt wurde [HARRINGTON *et al.*, 1988]. Das Reaktionsgleichgewicht liegt demzufolge auf der Seite des Protein/ DNA - Komplexes. *De facto* interagiert MBP - Sp1 grundsätzlich mit dsDNA, unabhängig ob das spezifische Bindemotiv vorliegt, ein Derivat mit Basenaustauschen oder eine unspezifische Sequenz.

Über eine unspezifische Bindung von Cys₂His₂ - ZF zu dsDNA wurde bereits beschrieben [NEDVED & MOE 1994]. Die Assoziationsrate (k_a) für MBP - Sp1 unterscheidet sich jedoch deutlich zwischen den Derivaten und der nativen GC - Box. Bei einem Austausch von 3 Basen ($\Delta 3$ GC Box) reduziert sich die k_a im Vergleich zur nativen GC - Box um bis zu fünf Größenordnungen.

Erwartungsgemäß, zeigt sich die massiv reduzierte k_a auch für die $\Delta 8$ GC - Box und ssDNA (Tab. III - 2). Bei Untersuchungen von KRIWACKI *et al.* zur Interaktion von Peptiden mit der Sp1 - ZFD und GC - Box - Mutanten wurde ebenfalls eine deutlich reduzierte k_a ermittelt. Bereits mit der Substitution von einer Base (G \rightarrow T, Position 3 oder 4) im Bindemotiv führte zur 5 bzw. 10fachen verringerten Affinität [KRIWACKI *et al.*, 1992].

Bei allen Derivaten sowie der ssDNA mit der GC - Box ist die Abnahme von k_a immer verbunden mit der Abnahme der Dissoziationsrate (k_d), was letztendlich keinen Einfluss auf die kalkulierte K_d hat. Die native Konsensussequenz in Kombination mit den exponierten AS der gefalteten ZFD sorgt für eine stabile Interaktion von DNA und MBP - Sp1. Die Fusion der Sp1 - ZFD mit MBP zeigt anhand der kalkulierten K_d , dass der Fusionspartner keine strukturellen Einflüsse im Kontext mit der Bindeaktivität der Sp1 - ZFD hervorruft. Als Kontrolle für die ZFD - vermittelte Interaktion mit der DNA wurde aufgereinigtes MBP injiziert, wobei keine messbaren Änderungen des Resonanzsignals detektiert wurden (siehe auch Anhang C2).

Tab. III - 2. Kinetische Parameter k_a und k_d , sowie kalkulierte K_d - Werte von MBP - Sp1

$C_{\text{MBP-Sp1}}$ (nM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d (M)	$C_{\text{MBP-Sp1}}$ (nM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d (M)
dsDNA GC - Box				dsDNA $\Delta 3$ GC - Box			
50	$3,4 \times 10^{10}$	40,6	$1,8 \times 10^{-9}$	50	$8,3 \times 10^5$	$4,7 \times 10^{-4}$	$5,8 \times 10^{-10}$
100	$2,0 \times 10^{10}$	130,0	$6,1 \times 10^{-9}$	100	$3,4 \times 10^5$	$5,7 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-9}$
250	$5,8 \times 10^{11}$	798,7	$1,9 \times 10^{-9}$	250	$1,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-9}$
500	$5,8 \times 10^6$	$9,8 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-9}$	500	$5,1 \times 10^4$	$2,9 \times 10^{-4}$	$5,9 \times 10^{-9}$
dsDNA $\Delta 8$ GC - Box				ssDNA GC - Box			
50	$4,5 \times 10^5$	$5,6 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-9}$	50	$1,2 \times 10^6$	$7,4 \times 10^{-4}$	$5,9 \times 10^{-10}$
100	$3,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-9}$	100	$6,1 \times 10^5$	$6,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-9}$
250	$2,1 \times 10^5$	$6,9 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-8}$	250	$1,5 \times 10^5$	$4,2 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-9}$
500	$3,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-8}$	500	$5,1 \times 10^4$	$3,4 \times 10^{-4}$	$6,8 \times 10^{-9}$

4.4 Analyse der Interaktion von MBP - gyrA und dsDNA

Neben ZF als funktionelle DNA - bindende Domänen, wurde zudem eine alternative Strategie der Protein - vermittelten Bindung von Nukleinsäuren evaluiert. Im Folgenden wurde eine Domäne analysiert, welche exklusiv in Prokaryoten auftritt. Die C - terminale Domäne der Untereinheit A der DNA - Gyrase wurde mit MBP fusioniert (Abschn. III 1.3). Als spezifisches Bindemotiv wurden 54 bp - Oligos (FM) verwendet (Abb. III - 17 A), wie sie bereits von REECE und MAXWELL zur Charakterisierung der DNA - Interaktion der Gyrase eingesetzt wurden [REECE & MAXWELL 1991].

Als unspezifische Kontroll - DNA wurden AT - reiche doppelsträngige Oligos (NM) verwendet. Die Interaktion von MBP - gyrA mit den dsDNA - Oligos wurde qualitativ mittels EMSA bestimmt (Abschn. II 6.7). Zur Evaluierung der Spezifität von MBP - gyrA, wurden zudem Konkurrenzexperimente mit humaner gDNA durchgeführt.

Initiale Experimente zur Untersuchung der Bindeaktivität (Abb. III - 17 B) demonstrieren deutlich, dass MBP - gyrA eine Bindeaktivität aufweist. Bei einem molaren Verhältnis von FM (*full match*) - DNA zu MBP - gyrA von 1:1 (Abb. III - 17 B, Bahn 6) ist kein eindeutiges Signal zu detektieren. Bei der Erhöhung des Anteils von MBP - gyrA um den Faktor 4 (Abb. III - 17 B, Bahn 7) erscheint die Bande, welche einen ersten Hinweis auf einen DNA - Protein - Komplex gibt. Die weitere Erhöhung des Proteinanteils um den Faktor 10 führt zu einer deutlichen Signalverstärkung (Abb. III - 17 B, Bahn 8). Die Inkubation von NM (*no match*) - DNA zusammen mit MBP - gyrA im Verhältnis 1:10 (Abb. III - 17 B, Bahn 10) erzeugt ebenfalls ein gleichermaßen intensives Signal im EMSA, was eine unspezifische Bindung von MBP - gyrA andeutet. Die Bindung der DNA wird lediglich über die gyrA - Domäne des Fusionsproteins vermittelt, was durch die ausbleibenden Signale bei den Ansätzen mit MBP gezeigt wird (Abb. III - 17 B, Bahn 3 - 5; 9).

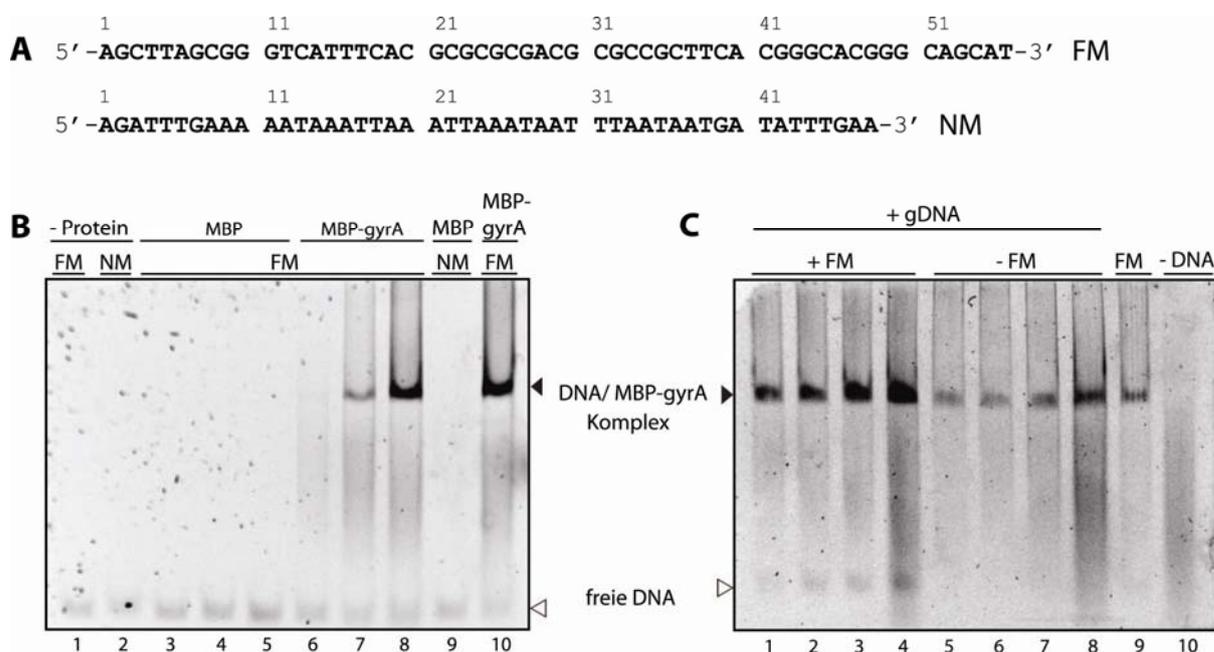


Abb. III - 17. Analyse der Bindeaktivität von MBP - gyrA. (A) Sequenz der Oligos für die Untersuchungen der Bindeaktivität von MBP - gyrA. Die komplementären Sequenzen sind der Einfachheit halber nicht angegeben. (B) 2,5 pmol spezifisches, dsDNA - Oligo (FM) wurde mit entweder mit äquivalenten (Bahn 6), 4fachem Überschuss (Bahn 7) oder 10fachem (Bahn 8) Überschuss an MBP - gyrA inkubiert und anschließend auf einem 10%igen nativen Acrylamidgel aufgetrennt. Als Kontrolle dienten MBP und ein unspezifisches dsDNA - Oligo (NM). (C) 25 pmol MBP - gyrA wurde mit 2,5 pmol FM - Oligo und steigendem Hintergrund an gDNA inkubiert. Die Auftrennung erfolgte auf einem 10%igen nativen Gel. Bahn 1 & 5, 1 ng gDNA; Bahn 2 & 6, 10 ng gDNA; Bahn 3 & 7, 100 ng gDNA; Bahn 4 & 8, 1×10^3 ng gDNA. Als Kontrollen dienten der FM - Oligo und MBP - gyrA ohne gDNA (Bahn 9) und nur gDNA (Bahn 10). EtBr - Färbung

Die Spezifität von MBP - gyrA zu den dsDNA - Oligos wurde in Gegenwart von humaner gDNA untersucht. Die FM - Oligos wurden dazu mit unterschiedlichen Mengen an gDNA zusammen mit MBP - gyrA inkubiert (Abb. III - 17 C).

In Gegenwart des FM - Oligos und Menge an gDNA und 10fachem Überschuss an MBP - gyrA ist deutlich eine Komplex - abhängige Bande im Gel zu erkennen (Bahn 1). Das Signal und die damit einhergehende Komplexbildung wurde durch steigenden Anteil an gDNA um Faktor 10 gegenüber dem FM - Oligo, leicht intensiviert (Abb. III - 17 C, Bahn 2). Das Signal im äquivalenten Ansatz, ohne das FM - Oligo, bleibt im direkten Vergleich schwächer (Abb. III - 17 C, Bahn 6). Die Bandenintensität nimmt bei einer weiteren Erhöhung des gDNA - Anteils um Faktor 10 noch weiter zu (Abb. III - 17 C, Bahn 4). Diese starke Erhöhung der Signalintensität ist beim parallelen Ansatz ohne FM - Oligo nicht zu beobachten (Abb. III - 17 C, Bahn 7). Der kooperative Effekt von dsDNA - Oligo und gDNA ist auch bei 1000fachem Überschuss an gDNA zu erkennen (Abb. III - 17 C, Bahn 4), wobei der Parallelansatz ebenso auffällige Verstärkung des Signals aufweist (Abb. III - 17 C, Bahn 8). Das Verhältnis von FM - Oligo zu MBP - gyrA wurde konstant bei 1:10 gehalten (Abb. III - 17 C, Bahn 9), wobei die Bande hier im direkten Vergleich eine geringere Intensität zeigt.

Somit hat die Gegenwart von gDNA einen synergistischen Effekt auf die Komplexbildung von MBP - gyrA und DNA, welcher vermutlich durch EMSA - bezogene Phänomene, wie Sequestrierung unterstützt wird [FELICOLI *et al.*, 1997]. Die korrespondierenden gDNA - vermittelten Banden, ohne FM - Oligo, sind ausnahmslos schwächer als ihre Parallelansätze mit FM - Oligo. Daher kann man von einer weniger starken Komplexbildung mit der humane gDNA ausgehen. Naturgemäß liegt demnach das Gleichgewicht wohl bei dieser Interaktion auf der Seite der Dissoziation.

5 2D - Protein - Arrays zur Detektion von Nukleinsäuren

5.1 Rekombinante ZFD - Proteine als Liganden in 2D - Arrays

5.1.1 Nachweis von dsDNA nach adsorptiver Immobilisierung auf Glassubstraten

Neben der Konstruktion und Herstellung von DNA - bindenden Proteinen zur spezifischen Detektion bzw. Anreicherung von Nukleinsäuren, wurden zudem mögliche Array - Anordnungen evaluiert. Zur Konstruktion dieser Arrays wurden die rekombinanten ZFD - Proteine über reversible (Adsorption) und irreversible (kovalent) Strategien auf eine Auswahl gängiger Substrate immobilisiert. Glas ist das favorisierte Material für die Herstellung von Microarrays. Aufgrund ihrer grundlegenden Eigenschaften wie Verfügbarkeit, Oberflächenbeschaffenheit, Festigkeit, Gefügigkeit der Oberfläche zu chemischen Modifikationen wurde dieses Material für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet [JONKHEIJM *et al.*, 2008].

Um einen definierten Bereich für vergleichbare Messungen der Fluoreszenzintensität zu erzeugen wurden Teflon - beschichtete Glaträger verwendet. Teflon, als inertes und hydrophobes Material, eignet sich ausgezeichnet zur Abgrenzung von funktionalisierten Bereichen. Die Teflonmaske erzeugt ein Array von

3×10 kreisrunden Bereichen mit 2 mm Durchmesser. Die einfachste Funktionalisierung der Glassoberfläche besteht in der Generierung von reaktiven Silanolgruppen (Si - OH). Diese polaren Gruppen können durch einfache Behandlung mit NaOH erzeugt werden. Über physische Adsorption wurden die rekombinanten Proteine im Anschluss immobilisiert und mit Cy3 - konjugierten dsDNA - Oligos mit GC - Box inkubiert. Das Auslesen des Fluoreszenzsignals erfolgte im Microarray - Reader (Abschn. II 7.3.1).

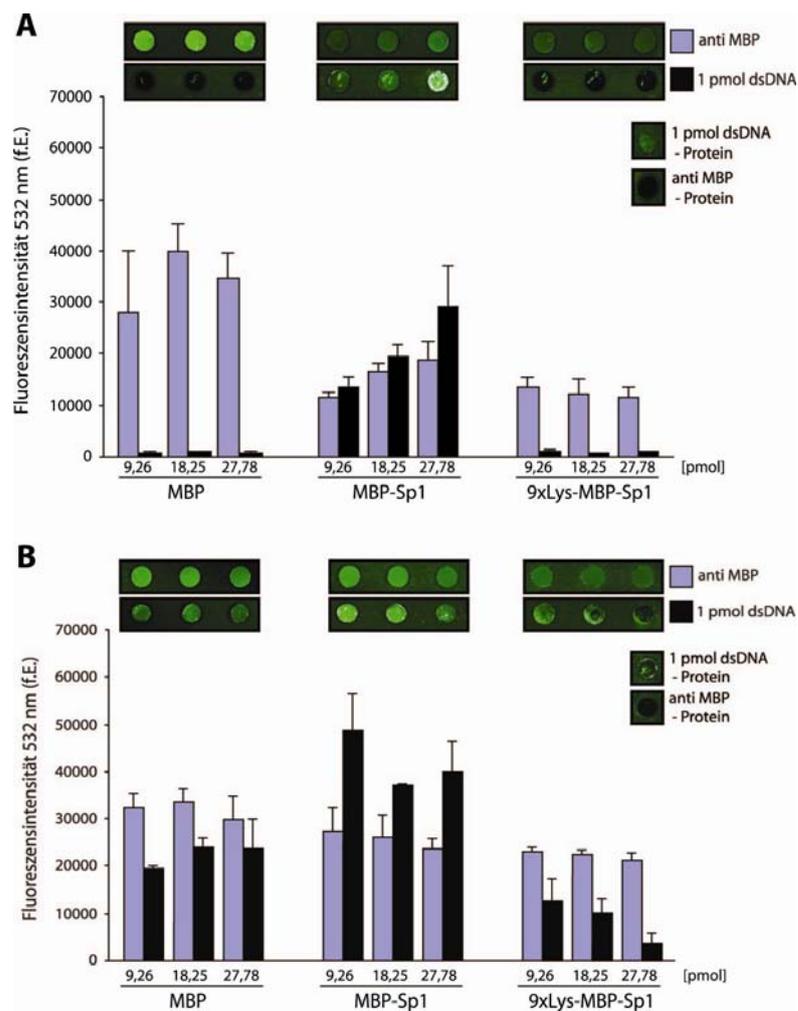


Abb. III - 18. Adsorptions - vermittelte Immobilisierung von ZFD - basierten MBP - Fusionsproteinen auf modifizierten Glassubstraten. Proteinmengen im Bereich von 9,26 pmol - 27,78 pmol wurden in Teflon - abgegrenzte, NaOH - behandelte (A) bzw. APTES - beschichtete (B) Bereiche aufgetragen. Die Kontrolle von immobilisiertem Protein erfolgte mittels Immunoanalyse mit einem anti - MBP - AK. Freie Bindestellen wurden vor der Immunodetektion durch Casein abgesättigt. Protein - beschichtete Bereiche wurden mit 1 pmol dsDNA - Oligo inkubiert und intensiv mit PBS gewaschen. Zur Charakterisierung der unspezifischen Bindeeffekte wurden AK, sowie dsDNA auf aktivierte Glasoberflächen ohne Protein gespottet. Das Auslesen des Fluoreszenzsignals erfolgte mit dem Microarray - Reader. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen als Mittelwert ± Standardabweichung; n = 3; f.E. freie Einheiten

Eine Immunodetektion mit spezifischem anti - MBP - Antikörper verdeutlicht, dass MBP auf einer hydrophilen Oberfläche über physische Adsorption, im Vergleich zu MBP - Sp1 und 9×Lys - MBP - Sp1, stark bindet (Abb. III - 18 A). Die MBP - Fusionsproteine zeigen anhand verringerter Fluoreszenzintensität eine abgeschwächte Bindung zur hydrophilen Oberfläche.

Relativ zum MBP gesehen, ist die immobilisierte Menge an MBP - Sp1 um 50 % reduziert. Die Inkubation mit 1 pmol dsDNA - Oligos (GC - Box, Abschn. III 4.2) in Bereichen mit immobilisiertem MBP führt lediglich zu einem sehr schwachen Hintergrundsignal. Die verwendeten Oligos gehen unter den gegebenen Bedingungen keine Wechselwirkungen mit immobilisierten MBP ein und können durch einfache Waschschrte entfernt werden. Adsorptiv immobilisiertes MBP - Sp1 zeigt nach Inkubation mit dsDNA ein Signal in Abhängigkeit von der immobilisierten Menge an Protein. Die Adsorption von 9×Lys - MBP - Sp1 auf der hydrophilen Oberfläche führte zu vergleichbaren Signalen nach Immunofärbung wie MBP - Sp1. Demgegenüber zeigt die Inkubation mit dsDNA kein spezifisches Signal, was eine adsorptionsvermittelte Inaktivierung von 9×Lys - MBP - Sp1 während der Immobilisierung vermuten lässt, ein Effekt der bereits seit geraumer Zeit bekannt ist [BULL 1956].

Der Fusionspartner MBP besitzt einen hohen Anteil an exponierten hydrophoben Regionen [HAN *et al.*, 2009]. Durch chemische Modifikation mit Silanen kann der hydrophile Charakter der Glasoberfläche in eine hydrophobe Oberfläche umgewandelt werden. Die funktionelle Silanverbindung APTES ist ein populärer Vertreter, um anorganische Substrate zu modifizieren [JONKHEIJM *et al.*, 2008]. Durch die Interaktion der hydrophoben Regionen von MBP kann theoretisch eine gerichtete adsorptive Immobilisierung stattfinden, was letztendlich die Organisation des Proteins auf der Oberfläche und deren Funktionalität positiv beeinflussen würde. Die Glasträger wurden zusätzlich mit APTES beschichtet (Abschn. II 7.1) und die Proteine im Anschluss in die entsprechenden Bereiche gespottet. Die Immunoanalyse zeigt, dass MBP sowie die Fusionsproteine auf APTES - beschichteten Oberflächen durch Adsorption stärker binden als vergleichsweise auf unbeschichteten Glasoberflächen (Abb. III - 18 B). Die Fluoreszenzintensitäten und die somit abgeleiteten Mengen an adsorptiv gebundenem Protein sind für MBP wiederum am intensivsten. Die immobilisierte Menge an MBP - Sp1 konnte durch APTES - Beschichtung im geringen Maße verbessert werden. Das gilt auch für 9×Lys - MBP - Sp1. Die stärkere Interaktion von Proteinen auf hydrophoben Oberflächen im Vergleich zu hydrophilen wurde bereits in der Arbeit von BUIJS und HLADY diskutiert [BUIJS & HLADY 1997]. Die Bindeaktivität nach der Inkubation mit dsDNA ist jedoch bei immobilisierten MBP recht ausgeprägt und indiziert eine unspezifische Bindung an die mit Protein modifizierte Oberfläche.

Das intensivste Fluoreszenzsignal nach dsDNA - Inkubation wurde bei MBP - Sp1 detektiert, wo die Intensität um Faktor 2 gegenüber den unbeschichteten (NaOH behandelt) Substraten erhöht ist.

Bei 9×Lys - MBP - Sp1 wurden die vergleichsweise geringsten Fluoreszenzintensitäten nach dsDNA - Inkubation detektiert. Vermutlich vermittelt die lysinreiche Domäne eine ungünstige Orientierung des Proteins zur Oberfläche, was letztendlich auch die Funktionalität der ZFD beeinträchtigen kann.

Die unspezifische Bindung der dsDNA in den MBP - modifizierten Bereich lässt sich mit der Strukturänderung eines Proteins während der hydrophob - vermittelten Adsorption erklären. Proteine verlieren ihre kompakte Konformation durch den Kontakt mit der Oberfläche [BUIJS & HLADY 1997], wodurch inneliegende Aminosäuren exponiert werden. Dadurch könnte der Bereich einen positiven geladenen Charakter erhalten und die elektrostatische Wechselwirkung mit der negativ geladenen dsDNA wird forciert.

5.1.2 Nachweis von dsDNA nach kovalenter Immobilisierung auf Glassubstraten

Im Allgemeinen bieten Proteine eine Vielzahl von funktionellen Gruppen, vorwiegend durch exponierte Seitenketten der Aminosäuren, welche sich für Immobilisierungsstrategien eignen. Für eine kovalente Kopplung an Oberflächen bieten sich z.B. die Aminogruppen von Lysin - Seitenketten an, welche natürlicher Weise mit hoher Abundanz repräsentiert werden. Die Kopplung über Aminogruppen wird sehr favorisiert, beinhaltet aber auch Nachteile. Die direkte Kopplung auf bspw. APTES - beschichtete Oberflächen über Aminofunktionen kann zu erhöhter Heterogenität, sowie zur verminderten konformalen Flexibilität und damit zur Inaktivierung des Proteins führen. Durch Einführen eines „*Spacers*“ zwischen Protein und reaktiver Gruppe auf der Oberfläche können diese Effekte minimiert werden [JONKHEIJM *et al.*, 2008]. Ein typischer Vertreter aus der Gruppe der homobifunktionalen Quervernetzer ist BS³. Das wasserlösliche DSS - Derivat besitzt zwei, durch sulfo - NHS - Ester, aktivierte Carboxylgruppen (Abschn. II 7.3.2) und verbindet unter Abspaltung von sulfo - NHS zwei primäre Aminogruppen untereinander.

Die kovalente Immobilisierung von auf APTES - beschichteten Glasträgern über BS³ führt zu einer sehr hohen Dichte an gekoppelten Proteinen (Abb. III - 19). Die Intensität der Spots führt dabei an die Grenze des oberen Meßbereichs des Microarray - Readers, so dass individuelle Unterschiede nicht detektiert werden konnten. Durch die kovalente Beschichtung mit MBP bindet dsDNA in nur sehr geringem Maße, so dass unspezifische Signale ausgeschlossen werden können. Bei gekoppelten MBP - Sp1 wurde eine Signaländerung von gebundener dsDNA in Abhängigkeit von der immobilisierten Menge an MBP - Sp1 nachgewiesen. Das dsDNA - abhängige Signal steigt um Faktor 2 nach Verdopplung der Proteinmenge. Das MBP - Derivat mit der lysinreichen Domäne zeigt nach der kovalenten Kopplung signifikant verringerte Bindeaktivität. Die zusätzlichen Lysine (9×Lys), welche für eine gerichtete Orientierung des Proteins zu Oberfläche bestimmt sind, zeigen keine signifikante

Verbesserung gegenüber MBP - Sp1 hinsichtlich der Bindaktivität. Die Präsentation einer Vielzahl an Lysinen mit deren Aminogruppen, fördert den Nachteil von langkettigen homobifunktionalen Quervernetzern wie BS³, indem benachbarte Gruppen untereinander verbunden werden. Die daraus resultierende blockierte Flexibilität führt vermutlich zur verminderten Funktionalität der ZFD von 9xLys - MBP - Sp1.

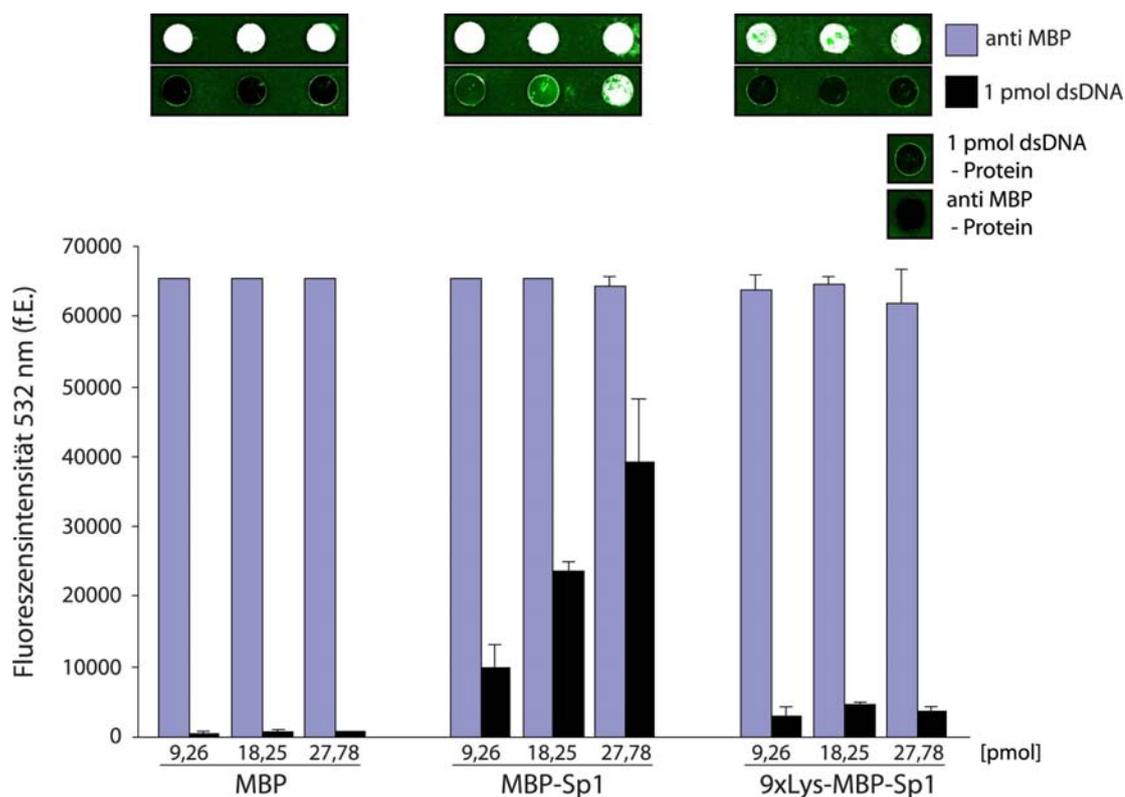


Abb. III - 19. Kovalente, BS³ - vermittelte Immobilisierung von ZFD - basierten MBP - Fusionsproteinen auf Glaträgern. APTES - beschichtete Bereiche wurden mit BS³ aktiviert und anschließend mit verschiedenen Mengen Protein inkubiert. Die Detektion von immobilisiertem Protein erfolgte über einen anti - MBP - AK. Vakante Bindestellen wurden vor der Immunodetektion durch Casein abgesättigt. Die jeweiligen Protein - beschichteten Bereiche wurden mit 1 pmol dsDNA - Oligo inkubiert und anschließend intensiv mit PBS gewaschen. Zur Charakterisierung der unspezifischen Bindeeffekte wurden AK, sowie dsDNA auf BS³ - aktivierte Glasoberflächen gespottet, welche zuvor mit Casein abgesättigt wurden. Das Auslesen des Fluoreszenzsignals erfolgte mit dem Microarray - Reader. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen als Mittelwert ± Standardabweichung. n = 3; f.E. – freie Einheiten

5.1.3 Mikrotiterplatten - basiertes ZFD - Array zur Detektion von dsDNA

Um das ZFD - Array im Mikrotiterplattenformat zu charakterisieren wurde zunächst der dynamische Messbereich sowie die maximale Proteinbeladung der Kavitäten bestimmt. Proteinmengen im Bereich von 0,185 fmol bis 18,5 fmol von MBP - Sp1 wurden adsorptiv in den Kavitäten immobilisiert und im Anschluß an einen Blockierungsschritt mit verschiedenen Mengen an spezifischen, biotinylierten

dsDNA - Oligo (0,001 pmol; 0,01 pmol; 0,1 pmol; 1 pmol und 10 pmol) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem Konjugat aus SA und HRP über Chemilumineszenz.

Die dsDNA - abhängige Antwort des Assays ist linear und quantitativ über einen Bereich von 3 – 700 nM bei einer Proteinbeladung mit 1,85 bis 18,5 pmol MBP - Sp1. Der dynamische Messbereich erstreckt sich beim Einsatz von 0,185 pmol MBP - Sp1 von 0,1 μ M bis 10 μ M. Ein exponentielles Fitting durch die erhaltenen Messpunkte verdeutlicht die jeweiligen dynamischen Messbereiche bei verschiedenen Proteinbeladungen der Oberfläche (Abb. III – 20 A).

Der ermittelte lineare Messbereich ist durchaus vergleichbar in der Sensitivität mit den ZF - Arrays von KIM *et al.*, wo ein linearer Messbereich von 5 nM - 2,5 μ M erzielt werden konnte [KIM *et al.*, 2010]. Die Detektion von dsDNA sollte unter gesättigten Bedingungen stattfinden, um einen möglichst dicht - gepackten Monolayer an ZFD - Protein auf der Oberfläche zu erzeugen und um die Sensitivität des Assays zu erhöhen. Dazu wurden die Kavitäten mit unterschiedlichen Konzentrationen von MBP bzw. MBP - Sp1 inkubiert und die adsorptiv immobilisierten Proteine über ein Immunoassay detektiert (Abb. III - 20 B). Für MBP - Sp1 sowie MBP als Kontrolle wurde eine maximale Beladung der Oberfläche ab einer Menge von 10 pmol bestimmt. Die somit bestimmte Menge an Protein führt zu einer Sensitivität im nM - Bereich für die vorgegebenen dsDNA - Oligos. Die untere und die obere Nachweisgrenze beim Einsatz von 10 pmol MBP - Sp1 liegt demnach bei 3 nM bzw. 700 nM für dsDNA der Länge 50 bp.

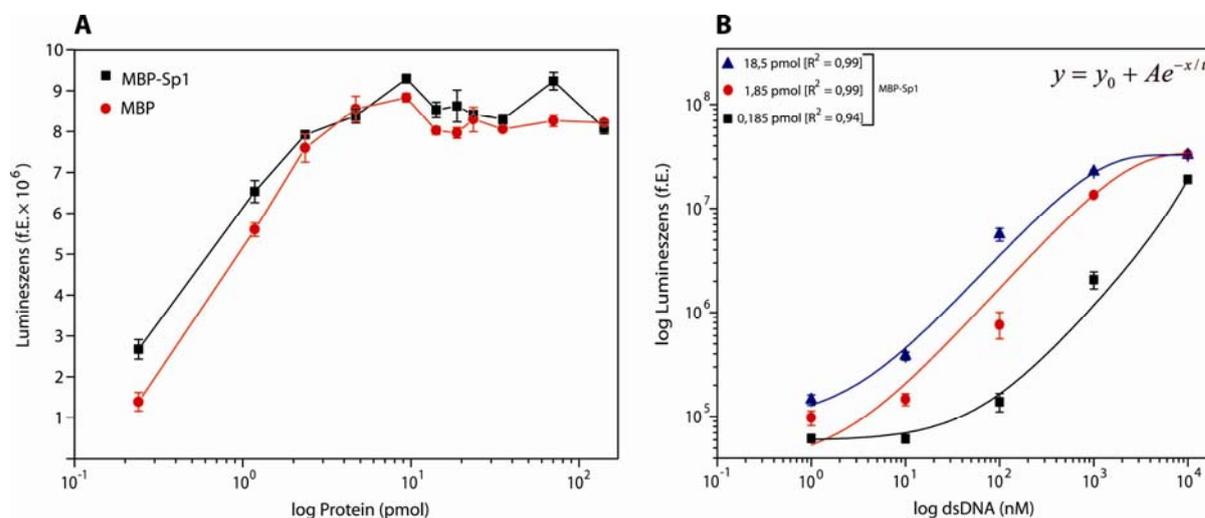


Abb. III - 20. Charakterisierung von ZFD - Arrays in Mikrotiterplatten (A) Die Mikrotiterplatten wurden mit unterschiedlichen Mengen (0,25; 1,28; 2,56; 5,13; 10,26; 15,38; 20,51; 25,64; 38,46; 76,92; 153,85 pmol) an MBP oder MBP - Sp1 beladen und mit einem anti - MBP - AK detektiert (Abschn. II 7.3.6). **(B)** Unterschiedliche Mengen an MBP - Sp1 wurden auf Nunc PolySorp™ - Mikrotiterplatten adsorptiv immobilisiert und anschließend mit steigenden Konzentrationen von biotinylierten dsDNA - Oligos inkubiert. Die gebundenen Oligos wurden mit HRPO - konjugierten Streptavidin (1:1000 in PBS) detektiert. Zur Ermittlung des dynamischen Messbereichs wurde ein exponentielles Kurvenfitting angewandt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen als Mittelwert \pm Standardabweichung. f.E. - freie Einheiten; R^2 - Determinationskoeffizient

5.1.4 Mikrotiterplatten - basiertes ZFD - Array zur Detektion von Pathogen - DNA

Für die Implementierung der ZFD zur direkten Detektion und Identifizierung von Nukleinsäuren bakterieller Natur wurde ein simples Assay entwickelt, womit z.B. spezifische PCR - Produkte in Gegenwart von humangenomischem Hintergrund detektiert werden können. Die PCR - basierte Diagnostik für die Detektion von Pathogenen hat sich neben den Kultur - basierten Methoden als wichtige Methode im klinischen Alltag etabliert [JOHANSSON *et al.*, 2000; MOTHERSHED & WHITNEY 2006]. Mit Hilfe der Multiplex - PCR können eine Vielzahl von Genen innerhalb einer Reaktion analysiert werden. Im Kontrast dazu, sind Microarrays in der Lage, eine noch höhere Anzahl von Pathogenen simultan zu detektieren. Über die vorteilhafte Kombination von Microarrays und PCR zur Pathogen - Detektion wurde bereits vielfach berichtet [CLEVEN *et al.*, 2006; PALKA-SANTINI *et al.*, 2009; WARSEN *et al.*, 2004].

Diese Strategien zur Detektion von PCR - Produkten sind auf der Basis von einzelsträngigen DNA - Sonden aufgebaut, wobei die Hybridisierung immer die entscheidende Rolle spielt [CLEVEN *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2010; PEPLIES *et al.*, 2004]. Die DNA - Hybridisierung ist verbunden mit einem hohen zeitlichen Aufwand und der Tatsache, dass die Duplex - Formation durch Sekundärstrukturen stark beeinflusst wird. Im Kontrast dazu, können spezifische DNA - bindenden Proteine die Sequenz - Information direkt aus der doppelsträngigen DNA auslesen, ohne jegliche Denaturierung und anschließende Renaturierung mit der sequenzspezifischen Sonde [KIM *et al.*, 2010].

Der Methicillin - resistente Erreger *S. aureus* (MRSA) ist von bedeutender klinischer Relevanz in Bezug auf klinikassoziierte Infektionen und die damit verbundenen Erkrankungen mit Todesfolge [BEEKMANN *et al.*, 2003]. Der Nachweis von spezifischer DNA von *S. aureus* erfolgt in der Regel aus Blutproben und ist gekennzeichnet durch hohen Anteil an humaner gDNA, was wiederum erforderliche Amplifikationsschritte bzw. Detektion durch herkömmliche Methoden beeinträchtigt [COGSWELL *et al.*, 1996; SISTA *et al.*, 2008].

Zunächst wurde über BLAST [ALTSCHUL *et al.*, 1990], das 9 bp Sp1 - Bindemotiv (GC - Box) im kompletten Genom des MRSA - Stammes N315 (GenBank BA000018.3) gesucht, was zu zwei Treffern führte. Eine GC - Box ist im *gltB* - Gen (+Strang) lokalisiert, welches eine Untereinheit der Glutamat Synthase kodiert. Die zweite GC - Box - Motiv ist unmittelbar abwärts vom SA1403 - Gen (+Strang) lokalisiert. Für die Amplifikation wurden Primer entworfen, welche eine 91 bp - Region im *gltB* - Gen flankieren und die GC - Box darin eine zentrale Position hat (Abb. III - 21 A). Über eine weitere Suche in der Datenbank für prokaryotische Genome wurde die Spezifität der 91 bp - Sequenz für *S. aureus* - Stämme bestimmt [ROMUALDI *et al.*, 2007]. Die Sequenz ist zu 100 % identisch für alle *S. aureus* - Genome welche in der Datenbank hinterlegt sind und demonstriert zudem, dass diese Region innerhalb des *gltB* - Gens der *S. aureus* Stämme hoch konserviert ist.

Überdies hinaus wurde nur geringe Homologien im Human - Genom und anderen Bakterien - Genomen gefunden, was letztendlich die PCR in Kombination mit MBP - Sp1 für eine spezifische Detektion von MRSA - Stämmen ermöglicht.

Mit den entworfenen Primern wurde im Folgenden die PCR etabliert, wobei isolierte gDNA von *S. aureus* (subsp. N315) als Matrize diente. Die Kontrolle der spezifischen Amplifikation erfolgte über Agarosegelelektrophorese (Abschn. II 3.10). In Gegenwart von *S. aureus* - gDNA in der PCR - Reaktion konnte ein spezifisches Amplikon detektiert werden, was mit der internen Größenkontrolle bei 90 bp korreliert (Abb. III - 21 B, Bahn 2). Als Kontrolle für die Spezifität wurde die PCR mit humaner gDNA als Matrize durchgeführt, was letztendlich zu keinem spezifischen Signal im Gel führte (Abb. III - 21 B, Bahn 3). Diese Resultate zeigen, dass ausschließlich die spezifische Region durch das entworfene Primerpaar in Gegenwart von *S. aureus* - gDNA amplifiziert wird. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von humaner gDNA auf die spezifische PCR untersucht. Dazu wurden konstante Mengen an *S. aureus* - gDNA mit steigenden Mengen an humaner gDNA in der PCR eingesetzt. Bis zu einem 100fachen Überschuss an humaner gDNA gegenüber *S. aureus* - gDNA wurde ein spezifisches Amplikon detektiert (Abb. III - 21 B, Bahn 4 - 6). In Gegenwart von 1000fachem Überschuss an humaner gDNA wird die PCR - Reaktion wahrscheinlich so massiv durch kompetitive Effekte beeinflusst, dass kein spezifisches Amplikon über Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden konnte (Abb. III - 21 B, Bahn 7).

Um die Bindefähigkeiten zum PCR - Produkt von MBP - Sp1 zu untersuchen, wurden die PCR - Reaktionen im Mikrotiterplatten Plattenassay angewandt (Abb. III - 21 C). Das Lumineszenzsignal steigt deutlich in Gegenwart des spezifischen PCR - Produktes, welches aus reiner *S. aureus* - gDNA generiert wurde (Abb. III - 21 C, Bahn 1). In Kontrast dazu wird in der PCR - Reaktion mit humaner gDNA kein Anstieg des Lumineszenzsignals detektiert, was wiederum die Spezifität der PCR bestätigt (Abb. III - 21 C, Bahn 2). Mit human genomischen Hintergrund von 1:1 und 1:10 (*S. aureus* gDNA/ humaner gDNA) lässt sich das PCR - Produkt noch sehr effizient nachweisen und führt zu äquivalenten Signalintensitäten verglichen mit dem Ansatz ohne humangenomischen Hintergrund (Abb. III - 21 C, Bahn 3 - 4). Der Einfluss der humanen gDNA im Bindeassay wird erst bei 100fachem Überschuss deutlich (Abb. III - 21 C, Bahn 5). Das Lumineszenzsignal verringert sich signifikant, was die Kompetition des PCR - Produktes mit humaner gDNA um die ZFD - Bindestellen schliessen lässt. Bei 1000fachem Überschuss an humaner gDNA wird kein Lumineszenzsignal mehr detektiert, was zum einen auf die ineffiziente PCR zurückzuführen ist und zum anderen auf kompetitive Effekte um die ZFD - Bindestelle (Abb. III - 21 C, Bahn 6). Das Assay mit rekombinantem ZFD - Fusionsprotein eignet sich um Amplikons aus PCR - Reaktionen zu detektieren.

Aufgrund der Sensitivität und Spezifität, sowie der vorgeschalteten PCR und vorausgehender DNA-Extraktion (vgl. 4.2) ist ein Einsatz von ZFDs nicht unbedingt vorteilhafter gegenüber alternativen, bereits etablierten Vorgehensweisen in der Pathogendiagnostik.

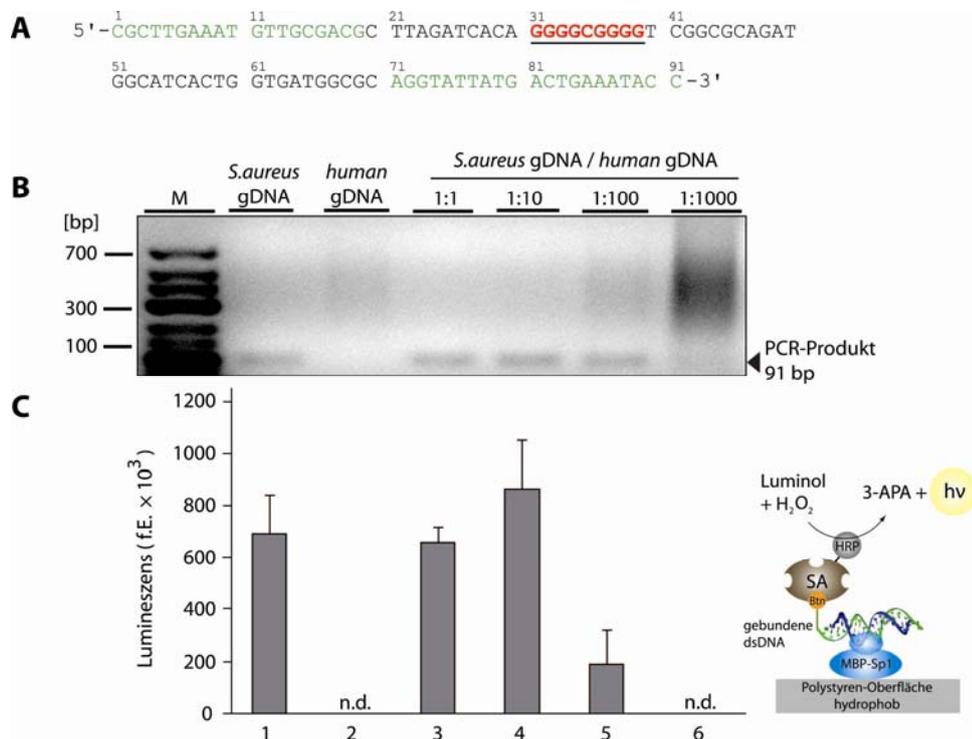


Abb. III - 21. Nachweis von PCR - Produkten über das Mikrotiterplatten - Assay (A) Die Sequenz des spezifischen PCR - Produktes aus dem dem *gltB* - Gen von *S. aureus* (subsp. N315). Die grünen Bereiche markieren die Primerregionen. Rot markiert ist die GC - Box als Bindestelle für MBP - Sp1. Der komplementäre Strang ist nicht dargestellt. **(B)** Agarosegelelektrophorese zur qualitativen Bestimmung des spezifischen 91 bp - PCR - Produktes. **(C)** ZFD - Assay zur Bestimmung der PCR - Produkte aus den Reaktionsansätzen, sowie die schematische Darstellung des ZFD - Assays. SA - Streptavidin, HRP - *Horseradish Peroxidase*, Biot - Biotin, 3 - APA (3 - Aminophthalat); 2 % Agarose, EtBr - Färbung. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen. Die Lumineszenz wird als Mittelwert ± Standardabweichung gezeigt. n = 3; f.E. - freie Einheiten; n.d. - nicht detektierbar

5.2 *gyrA* - vermittelte Anreicherung von Pathogen - DNA

5.2.1 Funktionalisierung von Magnetpartikeln mit MBP - *gyrA*

Magnetische Partikel haben sich im biotechnologischen Umfeld als wertvolle Werkzeuge zur Separation von Biomolekülen etabliert [DUNLOP *et al.*, 1984]. Verschiedenste Magnetpartikelgrößen im nm - bis μm - Maßstab eignen sich aufgrund ihrer funktionellen Gruppen auf der Oberfläche für die Immobilisierung von Biomolekülen, die wiederum als Ligand für Analyten oder andere Bindepartner dienen. Die Magnetpartikel - Plattform diente in dieser Arbeit als Grundlage für die *gyrA* - vermittelte Isolierung von Pathogen - DNA.

Zunächst wurde MBP - gyrA auf carboxylierten Mikropartikeln ($d = 1,08 \mu\text{m}$) über EDC/ NHS (Abschn. II 7.3) immobilisiert. Die Inkubation von verschiedenen Mengen an MBP/ gyrA - Partikeln mit biotinylierten spezifischen Oligos zeigte jedoch keinen Effekt hinsichtlich einer Protein/ DNA - Interaktion im TMB - Assay (Daten nicht gezeigt). Vermutlich hat die ungerichtete kovalente Kopplung von MBP - gyrA auf der Partikeloberfläche eine Inaktivierung der Bindeaktivität zur Folge. Diese Inaktivierung wird vermutlich hervorgerufen durch die unspezifische Ausbildung der Amidbindung über die an der DNA - Bindung involvierten Aminosäureseitenketten [KORTT *et al.*, 1997].

Eine alternative und effektive Immobilisierungsstrategie zur Gewährleistung der Funktionalität bietet die gerichtete Kopplung über Affinität. Die erste Komponente des Assays besteht aus carboxylierten MagPrep25 - Partikeln, worauf kovalent Protein A immobilisiert wurde. Protein A bindet selektiv über vier Regionen den Fc - Teil von IgG [WRIGHT *et al.*, 1977]. Die IgG - Komponente stellt dabei ein anti MBP - AK dar. Die Kopplung von MBP - gyrA wird nur über die Affinität des AK zum MBP vermittelt, womit die gyrA - Domäne theoretisch unbeeinflusst verbleibt (Abb. III - 22 A). Die funktionalisierten Partikel wurden im Anschluss in einfachen Bindeassays evaluiert. Dazu wurden 65 μg funktionelle Partikel mit 10 pmol biotinylierten dsDNA - Oligos inkubiert, wobei spezifische (FM) und unspezifische (NM) Oligos verwendet wurden (Abb. III - 23 A). Die nach intensivem Waschen verbliebenen gyrA - assoziierten biotinylierten Oligos wurden über SA - HRP und ECL detektiert. Die spezifischen FM - Oligos konnten vergleichsweise zu den NM - Oligos um 50 % mehr an die funktionellen Partikel gebunden werden, was die Affinität gegenüber der spezifischen Sequenz demonstriert (Abb. III - 22 B). Die gerichtete Immobilisierung von MBP - gyrA über Affinität führte zum Erhalt der Funktionalität. Die Kontrolle ohne dsDNA (- dsDNA) generierte lediglich ein vernachlässigbares Hintergrundsignal, wodurch eine unspezifische Interaktion von SA - HRP mit funktionellen Partikeln ausgeschlossen werden kann.

5.2.2 Spezifische Isolierung von Pathogen - DNA über funktionalisierte Magnetpartikel

Eine kritische Thematik für den Erfolg von molekularbiologischen Anwendungen in der Diagnostik ist die Probenaufbereitung bzw. die Nukleinsäure - Isolation [AKANE *et al.*, 1994b]. Die niedrige Konzentration von Pathogenen sowie die Präsenz von PCR - Inhibitoren stellen Parameter dar, die mitunter maßgeblichen Einfluss auf die nachfolgende molekularbiologische Analyse der entsprechenden Probe haben können [AKANE *et al.*, 1994a; COGSWELL *et al.*, 1996; EISENSTEIN 1990]. Eine präventive Maßnahme während der Probenvorbereitung ist die selektive Anreicherung pathogener DNA aus Blut mit integrierter Beseitigung von PCR - Inhibitoren [HANSEN *et al.*, 2009].

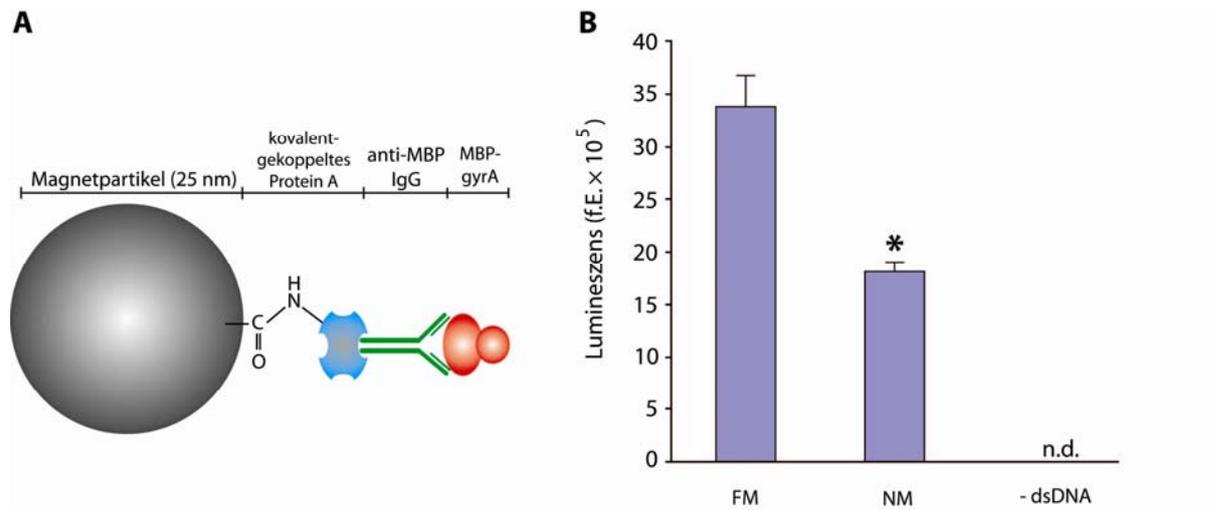


Abb. III - 22. Aufbau und Funktionalität von magnetischen MBP - gyrA - Partikel. **A** Schematische Darstellung der Immobilisierungsstrategie für eine gerichtete Orientierung von MBP - gyrA auf MagPrep25 - Partikeln. **B** Evaluierung der Bindeaktivität und Spezifität von immobilisierten MBP - gyrA. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen. Die Lumineszenz wird als hintergrundsabtrahierter Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt; * $P < 0,05$, $n = 3$; f.E. - freie Einheiten; n.d. - nicht detektierbar

Auf der Grundlage der Bindeeigenschaften der gyrA - CTD in Kombination mit magnetischer Separation wurde ein Assay zur Evaluierung des Systems als präanalytisches Werkzeug entwickelt. Funktionelle Partikel (Beads) wurden zusammen mit 10 ng gDNA aus *E. coli*; *S. aureus* oder humaner gDNA aus HEK293 - Zellen inkubiert und extensiv gewaschen. Durch kurzes Erhitzen wurde die gyrA - assoziierte DNA freigesetzt und die Magnetpartikel vom Ansatz separiert. Der gewonnene Überstand wurde im Anschluß in einer PCR auf verbliebene gDNA mit spezifischen Primerpaaren (vgl. Abschn. II 1.5) untersucht. Als Kontrollen für Kontaminationen von bakterieller DNA wurden Wasserproben parallel in der PCR analysiert (Abb. III - 23, Bahn 1 - 2). In die Proben mit Beads und bakterieller DNA (Abb. III - 23, Bahn 3/ 5) wurde verbleibende gDNA durch PCR nachgewiesen, welche aber generell eine schwächere Bandenintensität im direkten Vergleich zur Referenzprobe aufweisen (Abb. III - 23, Bahn 4/ 6).

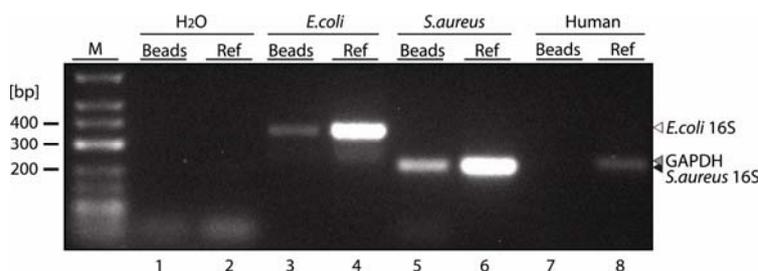


Abb. III - 23. MBP - gyrA - Partikel (Beads) und die spezifische Bindung von bakterieller DNA. PCR - Analyse der an Beads assoziierten DNA von *E. coli*, *S. aureus* und humanen Zellen. Die Pfeile markieren die Lauffronten der spezifischen Amplikons. 2 % Agarose, Etbr - Färbung, M - Marker Fermentas *low Range*. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Wiederholungen.

Bakterielle gDNA kann unter den gegebenen Bedingungen aus einem Gemisch mit hundertfachem Überschuss an humaner gDNA angereichert werden (Abb. III - 24 A, Bahn 5 - 7; 10 - 12). Das spezifische ubiquitäre bakterielle 16S rDNA - Gen lässt sich bei sämtlichen Anreicherungsansätzen durch PCR nachweisen, was die Spezifität und von *gyrA* für bakterielle gDNA bestätigt, sowie den Anreicherungseffekt durch die magnetische Separation belegt. Die PCR - Analyse auf humane gDNA zeigt jedoch, dass ein hoher Überschuss an humaner gDNA zu Beginn durchaus kompetitive Effekte hervorruft und diese dann coaufgereinigt wird (Bild III - 24 B, Bahn 8/ 12). Trotz paralleler Aufreinigung von humaner gDNA wird das Verhältnis zur bakteriellen DNA minimiert, was letztendlich die PCR - Bedingungen optimiert. Eine Minimierung der kompetitiver Faktoren, wie humane gDNA, im PCR - Reaktionsansatz zeigte bereits in anderen nukleinsäurebasierten Analysesystemen eine signifikante Verbesserung hinsichtlich der unteren Nachweisgrenze. Der direkte Vergleich der Bandenintensitäten der GAPDH - Amplikons lässt ebenfalls die Vermutung zu, dass MBP - *gyrA* zu *S. aureus* - gDNA eine höhere Affinität besitzt als zur *E. coli* - gDNA. Diese Hypothese erklärt zugleich den höheren Anteil an humaner gDNA in den *E. coli* - Ansätzen. Aufgrund der schwächeren Interaktion der *gyrA* - CTD mit den *E. coli* - Motiven wird die Assoziation von *gyrA* - CTD und humaner gDNA begünstigt. Die magnetische Separation von bakterieller DNA mit MBP - *gyrA* als spezifische Komponente aus simulierten komplexen Lösungen heraus, konnte in den aufgeführten Ergebnissen als „*proof of concept*“ gezeigt werden.

IV DISKUSSION

1 DNA - bindende Proteine als funktionelle Komponenten in der Diagnostik

Die sensitive und spezifische Detektion oder Anreicherung von Pathogen - DNA ist von großem Interesse für die zusehends wachsende Anwendung in biomedizinischen Studien und Anwendungen sowie klinischer Diagnostik [KIM *et al.*, 2010]. In dieser Arbeit wurden neuartige, modular zusammengesetzte DNA - bindende Proteine entworfen, kloniert exprimiert. Funktionelle DNA - bindende Proteine konnten mit Hilfe des MBP - Systems in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert und aus Lysaten aufgereinigt werden, was die Herstellung derartiger rekombinanter Proteine über Affinitätsaufreinigung mit MBP demonstriert und zudem unkompliziert in einen großtechnischen Herstellungsprozess übertragbar ist. Die MBP - Fusionsproteine wurden in Arrays auf festen und semifesten Phasen immobilisiert und für die Detektion von dsDNA sowie für die Anreicherung bakterieller DNA aus komplexen Lösungen erfolgreich verwendet. Als funktionelle DNA - bindende Domänen zur direkten Detektion von PCR - Produkten oder dsDNA wurden Cys₂His₂ - ZF verwendet. Diese Familie von ZF repräsentieren die umfangreichste Art von DNA - bindenden Domänen im Humangenom [VENTER *et al.*, 2001]. Die ZFD von Sp1 [YOKONO *et al.*, 1998] und Sp3 [HAGEN *et al.*, 1992] sind hinsichtlich ihrer hohen Präferenz, für das 9 bp umspannende Konsensusmotiv (GC - Box) bestens charakterisiert und wurden aufgrund dieser Tatsache als Modell für Untersuchungen ausgewählt.

Die qualitative Analyse der Funktionalität von rekombinanten ZFD erfolgte über modifizierte EMSAs. Initiale Experimente demonstrierten für die Sp1 - ZFD die erwartete Binfunktionalität zu dsDNA, die aber letztendlich ebenso unspezifisch ist (Abschn. III 4.1 & 4.2). In der Arbeit von OSAWA *et al.* wurde ebenfalls die Sp1 - ZFD für die Detektion von GC - Box im Zusammenhang mit PCR - Produkt - Analyse verwendet [OSAWA *et al.*, 2008]. Die Autoren beobachteten eine signifikant reduzierte Affinität der Sp1 - ZFD bei nur einem Basenaustausch im ersten Triplet (Position 3; G → A). Um diese verringerte Affinität bei GC - Box - Mutanten näher zu untersuchen wurden die kinetischen Parameter der Interaktion von MBP - Sp1 dsDNA mit GC - Box, dsDNA mit Basensubstitutionen und ssDNA über Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore) bestimmt. Interessanterweise fanden sich deutliche Unterschiede in den Assoziations - bzw. Dissoziationsraten zu den GC - Box - Mutanten (Abschn. III 4.3.2). Die kalkulierte K_d zur nativen GC - Box sowie den Derivaten liegt im Bereich von ~10 nM, was wiederum sehr gut mit den Kalkulationen von KRIWACKI *et al.* übereinstimmt [KRIWACKI *et al.*, 1992]. Eine abgeschwächte Affinität aufgrund der Isolation der ZFD konnte nicht nachgewiesen werden, was einerseits die optimale Klonierungsstrategie indiziert und andererseits MBP als einen geeigneten Fusionspartner zeigt.

Den BIAcore-Assays nach zu urteilen bindet die Sp1 - ZFD grundsätzlich dsDNA sowie ssDNA, unabhängig von der Gegenwart der GC - Box oder den Derivaten. Eine hohe Toleranz von nativem Sp1 gegenüber Basensubstitutionen innerhalb der GC - Box ist bekannt, wobei die hohe Affinität erhalten bleibt [JONES *et al.*, 1986]. Diese Ergebnisse verdeutlichen nun vielmehr den Nachteil der Sp1 - ZFD als DNA - bindende Domäne für die spezifische Detektion von Motiven in Form einer GC - Box, insbesondere bei der Anwendung in der direkten Detektion von dsDNA. Lediglich über aufwendige Sensorik wie Oberflächenplasmonresonanz würden sich Mutationen in der GC-Box detektieren. Eine aus klinischer Sicht wünschenswerte Multiplex-Reaktion wäre daher sehr aufwendig und kostenintensiv. Cys₂His₂ - ZFD bieten dennoch eine geeignete Plattform zur Konstruktion von artifiziellen DNA - bindenden Proteinen, welche jede erdenkliche DNA - Sequenz binden können [BEERLI & BARBAS 2002; WOLFE *et al.*, 2000]. Neu konstruierte ZFD variieren im hohen Maße bezüglich ihrer Spezifität zur geplanten Zielsequenz [CORNU *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2002; SANDER *et al.*, 2009; SEGAL *et al.*, 2003; WOLFE *et al.*, 1999]. Vor einer Anwendung sollte daher jede neue ZFD auf ihre Spezifität und Affinität charakterisiert werden. Eine optimale Vorgehensweise auf der Suche nach der idealen ZFD für die entsprechende Sequenz sollte daher selektiv über *Phage Display* in Kombination mit einer sensitiven Methode, wie Oberflächenplasmonresonanz, erfolgen [WU *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 1995].

2 Proteinchips mit rekombinanten MBP - ZFD

Eine attraktive Anwendung für die direkte Detektion von dsDNA mittels rekombinanter ZF würde das Konzept des Protein - Microarrays oder Proteinchips darstellen [PHIZICKY *et al.*, 2003]. Das Prinzip des Proteinchips als Detektionseinheit für Nukleinsäuren mit immobilisierten, rekombinanten Proteinen wurde bereits in der Vergangenheit für die Punktmutationsanalyse gezeigt [ZHANG & BI 2007]. Die wohl größte Herausforderung in der Herstellung eines Proteinchips ist die optimale Auswahl des Substrats in Kombination mit einer geeigneten Oberflächenchemie, welche kompatibel mit den zu koppelnden Proteinen ist. Die festgelegte Strategie sollte letztendlich die Integrität, native Konformation und biologische Funktion des Zielproteins während und nach der Immobilisierung gewährleisten [KUSNEZOW & HOHEISEL 2003a; KUSNEZOW *et al.*, 2003b]. Um diese Parameter zu adressieren, spielt die chemische Selektivität und die Regioselektivität des Zielproteins bei der Immobilisierung eine entscheidende Rolle [JONKHEIJM *et al.*, 2008]. Bei der chemischen Selektivität soll Kontrolle über die funktionellen Gruppen oder Tags eines Proteins bestehen, welche an der Kopplung beteiligt sind. Bei der Regioselektivität ist es wünschenswert z.B. nur eine bestimmte Domäne des Proteins in Kontakt mit der Oberfläche treten zu lassen, um die Orientierung der funktionellen Domäne, weg von der Oberfläche, zu forcieren.

MBP, als der Fusionspartner der Wahl für rekombinante ZFD aus *E. coli*, zeigte sich in den Adsorptionsexperimenten auf Glassubstraten als durchaus geeignet für die physische Immobilisierung über Adsorption auf hydrophilen oder hydrophoben Oberflächen.

Die hydrophoben Regionen, welche anteilig höher beim MBP gegenüber der fusionierten ZFD liegen, begünstigen die Orientierung und die Flexibilität und nicht zuletzt die Funktionalität der ZFD. Die überraschende Stabilität der Immobilisierung von MBP - Fusionsproteinen auf einer hydrophoben Oberfläche lässt sich relativ einfach dadurch erklären, dass MBP eine Vielzahl von Kontaktpunkten mit der APTES - beschichteten Oberfläche ausbildet [BRASH & HORBETT 1987] und daher die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche vorgibt.

Um die regioselektive Orientierung über Adsorption von MBP genauer zu kontrollieren, wurde das Protein um acht aufeinanderfolgende Lysine in der N - terminalen Region erweitert (Abschn. III 1.2.2). Die neu generierte Domäne erzielte jedoch keinen günstigen Effekt auf die regioselektive Kopplung und führte letztendlich zur Inaktivierung der ZFD nach der adsorptiver und kovalenter Immobilisierung (Abschn. III 5.1.1 & 5.1.2). Unter neutralen pH - Bedingungen (pH 7) ist die Lysin - Seitenkette positiv geladen und die Silanolgruppen auf der Glasoberfläche deprotoniert, was in einer negativen Nettoladung der Oberfläche resultiert. Offenbar wird die Orientierung des Proteins in dieser Situation über elektrostatische Wechselwirkungen gesteuert, was eine ungünstige Orientierung des Proteins und die einhergehende Inaktivierung der ZFD - Funktionalität zur Folge hat. Alternativ wurde der Glasträger mit APTES modifiziert, was der Oberfläche einen hydrophoben Charakter verleiht. Die Interaktion von Proteinen mit hydrophoben Oberflächen ist stärker, führt aber gleichzeitig zu massiven Konformationsänderungen in der Struktur [BUIJS & HLADY 1997]. Das ist konsistent mit den Ergebnissen zur Immobilisierung von MBP - Sp1 und den Derivaten. Verglichen zur hydrophilen Glasoberfläche wurde mehr Protein adsorptiv auf der hydrophoben Oberfläche immobilisiert, wobei auch unspezifische Interaktionen mit dsDNA beobachtet wurden (Abschn. III 5.1.1).

Aus der Sicht der Langzeitstabilität eines Proteinchips sollte eine kovalente Kopplung immer einer adsorptiven Strategie vorgezogen werden. Die Aminogruppe der Lysin - Seitenkette ist wohl der prominenteste Anknüpfungspunkt für Kopplungsreaktionen, aufgrund der häufig exponierten Position auf der Oberfläche von Proteinen. Unglücklicherweise ist Lysin in Proteinen anteilig stark vertreten, was zu erhöhter Heterogenität und begrenzter konformeller Flexibilität nach der Kopplung führen kann [JONKHEIJM *et al.*, 2008]. Durch die Verwendung von BS³ als Quervernetzer konnte die Immobilisierungseffizienz von MBP - Sp1 und dem Derivat 9×Lys - MBP - Sp1 gegenüber physischer Adsorption deutlich gesteigert werden (Abschn. III 5.1.2). Darüber hinaus wurde die Bindeaktivität zumindest für MBP - Sp1 in Abhängigkeit der initial zur immobilisierten eingesetzten Menge nachgewiesen. Das Derivat 9×Lys - MBP - Sp1 verliert jedoch seine Funktionalität dsDNA zu binden durch den Einsatz des Quervernetzers komplett. Die Immobilisierung über einen homobifunktionalen

Quervernetzer wie BS³ hat den Nachteil, dass ebenfalls benachbarte Gruppen auf der Oberfläche oder dem Protein potentiell vernetzt werden können. Dies führt mitunter zur Blockierung der Kopplung mit funktionellen Gruppen auf der Oberfläche sowie zur unerwünschten Quervernetzung, was die Ursache der Inaktivierung von 9×Lys - MBP - Sp1 durchaus erklären kann. Die N - terminale Lysin - Domäne birgt für kovalente Kopplungsstrategien gewisse Nachteile. Eine Reduzierung der Anzahl von Lysinen innerhalb der Domäne könnte unspezifische Interaktionen minimieren und die Bindeaktivität erhalten.

Das Konzept der gerichteten Immobilisierung über MBP könnte alternativ zu den hier untersuchten Möglichkeiten ebenfalls über dessen biologische Funktion umgesetzt werden. Hierbei wird die Affinität zu Maltose oder deren höheren Homologen, der Amylose, ausgenutzt. Über eine Synthese ließen sich aminofunktionalisierte Derivate herstellen [ADEMOVIC *et al.*, 2006], die über herkömmliche Kopplungsstrategien für die Modifizierung von u.a. Glasoberflächen nützlich sind. Die zielgerichtete Kopplung von MBP - Fusionsproteinen lässt sich ebenso über die Bindung von MBP an den natürlichen Interaktionspartner Maltose realisieren. Mit derivatisierter Aminopropylamylose ließen sich problemlos Oberflächen funktionalisieren, worauf dann MBP - Fusionsproteine gerichtet und reversibel gekoppelt werden können [GONERA *et al.*, 2002]. Um die Bindung zur funktionalisierten Oberfläche zu optimieren, könnte man zudem MBP - Derivate mit erhöhter Affinität zur Maltose verwenden [WALKER *et al.*, 2010]. Ein weiterer Vorteil aus ökonomischer Sicht bei dieser Strategie ist die Reversibilität der Bindung von MBP zum immobilisierten Zucker. Man könnte einen einzelnen Biochip mehrfach verwenden, indem man die Oberfläche nach Protein - Kopplung in den Ausgangszustand regeneriert.

Mit den positiven Eigenschaften von MBP als Expressionstag zur Löslichkeitsverbesserung von z.B. Polypeptiden [KAPUST & WAUGH 1999] in Kombination mit Affinitätsimmobilisierung zur zielgerichteten Immobilisierung auf Glasoberflächen, ist dieses Protein zur Generierung von ZFD - basierten Chips zur ein wertvolles Werkzeug. Aber auch für andere Biochip - Applikationen bietet sich die MBP - basierte Kopplung an. Um das enorme Potential der direkten Detektion von Nukleinsäuren durch Proteinchips zu nutzen, sind zu deren Herstellung zwei Voraussetzungen nötig: regioselektive Immobilisierung und optimierte Herstellung rekombinanter Proteine. Diese beiden Voraussetzungen könnten durch die Verwendung von MBP als Fusionstag und nachfolgende Immobilisierung auf z.B. Amylose - funktionalisierten Oberflächen optimal erfüllt werden.

3 Detektion von PCR - Produkten mit MBP - Sp1 - ZFD - Arrays

Das Konzept der direkten Detektion von dsDNA aus einer PCR - Probe konnte mit rekombinanten MBP - Sp1 in einem Mikrotiterplattenformat umgesetzt werden. Die untere Nachweisgrenze bei optimaler Beladung der PS - Oberfläche mit MBP - Sp1 beträgt 1 nM für dsDNA der Länge 50 bp (Abschn. III 5.1.3). Der dynamische Messbereich des generierten Arrays liegt in der Spanne von 3 nM - 1 μ M. Überdies hinaus wurde ein spezifisches PCR - Amplikon von *S. aureus* in Gegenwart von hundertfachem Überschuss an humaner gDNA amplifiziert und mit dem etablierten ZFD - Array detektiert (Abschn. III 5.1.4). Vergleichbare Sensitivitäten wurden beim ZFD - basierten Array von KIM *et al.* ebenfalls erzielt [KIM *et al.*, 2010]. Die Autoren verwendeten dabei zwei spezifische ZF - Sonden, welche gegen eine 36 bp - Region im *rrsA* - Gen von *E. coli* gerichtet sind. Die ZF sind jeweils mit Split - Reporter gen fusioniert [OOI *et al.*, 2006]. Gelangen die gesplitteten Domänen aufgrund der ZF/ DNA - Interaktion in räumliche Nähe, rekonstituiert sich das Protein wieder zu einem aktiven Enzym. Das hier entwickelte Assay für die Detektion von dsDNA besteht nur aus einer ZF - Komponente, womit der Detektionsprozess sowie der Herstellungsprozess enorm vereinfacht werden. Dennoch beeinflusst eine Vielzahl an Parametern die Sensitivität des MBP - Sp1 - Assays. Die adsorptive ungerichtete Immobilisierung von MBP - Sp1 auf der PS - Oberfläche limitiert die Anzahl der zur Verfügung stehenden Bindestellen für dsDNA und führt daher auch zu einer reduzierten Sensitivität. Dieses Problem könnte für die Zukunft mit der gerichteten Immobilisierung adressiert werden. Die optimale Orientierung von AK mit Hilfe von immobilisiertem Protein A führt zur signifikanten Steigerung der Sensitivität in Immunoassays [ANDERSON *et al.*, 1997]. Prinzipiell binden ZFD in Lösung mehr Analyt, wie es in anderen Arbeiten gezeigt wurde [OOI *et al.*, 2006; STAINS *et al.*, 2006; STAINS *et al.*, 2005]. Eine Immobilisierung hat aber entscheidende Vorteile gegenüber den sogenannten „frei in Lösung“ - Systemen. Ein wichtiger Vorteil besteht in der unkomplizierten Entfernung von schwach oder unspezifisch gebundener DNA durch simple Waschschrte, was bei lösungsbasierten Systemen durchaus ein Problem ist [KIM *et al.*, 2010].

Die 9 bp GC - Box stellt zudem kein optimales Motiv für eine Detektion von bakterieller DNA, vor bspw. komplexem humanen gDNA - Hintergrund, dar. Eine 9 bp - Sequenz tritt im Humangenom theoretisch alle 4^9 bp auf, was wiederum die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Interaktion der ZFD für 9 bp - Motiv stark erhöht. Dennoch konnte das MBP - Sp1 - Assay die generierten PCR - Produkte detektieren. Das Amplikon liegt nach erfolgreicher PCR angereichert in der Lösung vor, was mit einer massiven Kopienzahl von GC - Box - Motiven einhergeht. Dies ist natürlich nur der Fall, wenn die Primer spezifisch sind und die PCR optimal verläuft. Die Bindestellen werden durch das im Überschuss vorliegende GC - Box - Motiv belegt. Ist im entsprechenden bakteriellen Genom z.B. die spezifische GC - Box vertreten, könnte die Region mit entsprechenden Primern flankiert, in der PCR

angereichert und über das ZFD - Array detektiert werden. PCR - Assays für die Detektion des *mecA* - Gens aus *S. aureus* sind gut etabliert und als diagnostische Methode für die Identifizierung von MRSA zugelassen [TENOVER *et al.*, 1999]. Eine Rifampicin - Resistenz in *M. tuberculosis* steht in Verbindung mit Mutationen in einem kurzen Segment des *rpoB* - Gens.

Die Diagnostik von multiplen Mutationen im Zusammenhang mit Resistenzen führt eine gewisse Komplexität in die PCR - basierten Methoden ein [TRAORE *et al.*, 2006]. Dieser Umstand könnte durch die Entwicklung spezifischer ZFD - Arrays adressiert werden, da ZFD für Mutationen in der Erkennungssequenz sehr sensibel sind (Abschn. III 4.3). Das in dieser Arbeit etablierte ZF - Array im Mikrotiterplattenformat mit MBP - Sp1, ist eine simple Methode für Anwendungen im Kontext mit der Nukleinsäure - basierten Detektion von Pathogenen. Die direkte Detektion von PCR - Produkten über ZFD wurde auch schon für *L. pneumophila* gezeigt, wobei die PCR - Produkte nach Amplifikation auf der PS - Oberfläche immobilisiert wurden und Sp1, fusioniert mit GST, als spezifische Sonde diente [OSAWA *et al.*, 2008].

4 Proteasomale Degradierung von EGFP - Sp3

Ein Teilprojekt dieser Arbeit hatte die Herstellung eines artifiziellen DNA - bindenden, fluoreszierenden Proteins in eukaryotischen Zellen zum Ziel. Die ZFD von Sp3 wurde C - terminal mit EGFP fusioniert und führte zu einer Destabilisierung nach Überexpression in HEK293 - Zellen. Der qualitative Nachweis der EGFP - Sp3 - mRNA mittels RT - PCR demonstriert die korrekte Prozessierung des Plasmids nach der liposomalen Transfektion (Abschn. III 2.2). Als eine potentielle Ursache für den unerwartet auftretenden destabilisierenden Effekt der Sp3-ZFD wurde die 26S - Proteasom - vermittelte Degradierung vermutet. Durch Behandlung mit dem reversiblen Proteasominhibitor MG132 nach Transfektion konnte EGFP - Sp3 wieder stabilisiert werden, was die Hypothese der Degradierung durch das 26S - Proteasom unterstützt (Abschn. III 2.3).

Der humane Transkriptionsfaktor Sp3 wird ubiquitär exprimiert und fungiert als Transkriptionsaktivator, sowie als Repressor [SUSKE 1999]. Durch posttranslationale Modifikationen von Sp3 wird die spezifische Funktion reguliert. Die wohl interessanteste Modifikation im Kontext mit 26S - vermittelter Degradierung von Sp3 stellt die SUMOylierung dar. SUMO (*small ubiquitin related modifier*) wird kovalent über eine Isopeptidbindung in einem mehrstufigen Prozess an Lysin - Seitenketten gebunden [MELCHIOR 2000]. Mittels funktioneller Mutationsexperimente wurde als kritische Position das Lysin, innerhalb der inhibitorischen Domäne (ID), im Sequenzmotiv IK551EE als Ziel von SUMO - Modifikation identifiziert [DENNIG *et al.*, 1996; MAJELLO *et al.*, 1997]. Durch die gewählte Klonierungsstrategie steht diese Position jedoch für die SUMOylierung nicht mehr zur Verfügung (Abschn. III 1.1), so dass vermutlich alternative Mechanismen

oder Aminosäuren der Sp3 - ZFD für Modifikationen in Betracht kommen. Durch anschließende *Pull-Down* - Assays in Kombination mit Western Blots könnten die alternativen posttranslationalen Modifikationen der Sp3 - ZFD genauer charakterisiert werden.

Im Grunde genommen ist EGFP als Fusionspartner sehr umgänglich, da es mit einer Halbwertszeit um die 26 h als sehr stabiles Protein gilt [CORISH & TYLER-SMITH 1999]. Diese Stabilität ergibt sich aus der kompakten Struktur des EGFP, welche die Übergabe an die zentrale endoproteasomale 20S - Untereinheit des 26S - Komplexes verhindert [FORSTER & HILL 2003].

Der destabilisierende Faktor kann demnach nur durch die C - terminal fusionierte ZFD eingeführt worden sein. Neben posttranslational modifizierten Proteinen zeigt das 26S - Proteasom interessanterweise eine Präferenz für C - terminale Domänen, wenn diese einen hydrophoben, basischen oder sauren Charakter aufweisen [KISSELEV *et al.*, 2002; SCHMIDTKE *et al.*, 2000]. Lediglich die Interaktion von hydrophoben Effektor - Peptiden mit dem 26S - Proteasom kann dessen proteolytische Aktivität induzieren.

Eine einfache Hydrophobizitätsanalyse mit dem Algorithmus von KYTE und DOOLITTLE verdeutlicht, dass EGFP - Sp3 zwei hydrophobe Regionen aufweist [KYTE & DOOLITTLE 1982]. Die Aminosäurekomposition führt zu einer hydrophoben Region im N - terminalen Bereich, sowie einer hydrophoben Region im C - terminalen Bereich, welche teils EGFP und teils der ZFD zugeordnet werden können. Durch weiterführende Interaktionsstudien mit der 26S - Untereinheit und EGFP - Sp3 könnte hier der Zusammenhang mit der modifikationsunabhängigen Degradierung der ZFD näher untersucht werden.

Über die biologische Relevanz einer DNA - bindenden ZFD im Zytosol ohne Translokationssignal für den Zellkern lässt sich anhand der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten nur spekulativ eine Aussage treffen. Es ist bereits gut bekannt, dass Cys₂His₂ - ZFD sowohl DNA, als auch RNA binden können. Die Relevanz von RNA in vielen biologischen Prozessen hat ein großes Interesse an artifiziellen, sequenzspezifischen RNA - bindenden Molekülen hervorgebracht [CHENG *et al.*, 2001; CORBI *et al.*, 1998; FRIESEN & DARBY 1998]. Neben sequenzspezifischen Aspekten von RNA, bieten diese ein reichhaltiges Repertoire an Tertiärstrukturen, die durchaus zu Interaktionen mit diversen Proteinen neigen. Mit Hilfe von strukturell - basierten Ansätzen wurde von MCCOLL *et al.* ein Cys₂His₂ - Monomer entworfen und charakterisiert, welches spezifisch an ein regulatorisches Element *in vivo* bindet [MCCOLL *et al.*, 1999]. Es wird an dieser Stelle deutlich, dass Cys₂His₂ - ZFD eine gute Plattform für artifizielle RNA - bindende Proteine bieten. Darüber hinaus zeigt sich, dass ZFD bereits im Zytosol das Zn²⁺ - Ion koordinieren und dadurch in die sehr stabile Konformation übergehen. Theoretisch kann die Sp3 - ZFD aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in Kombination mit zytoplasmatischer Lokalisation, obgleich spezifisch oder unspezifisch, RNA binden. Diese Interaktion hat dann mitunter massive Auswirkungen auf RNA - spezifische Prozesse wie alternatives Spleißen und

Translation der mRNA. Durch endogene, proteolytische Mechanismen, wie 26S - vermittelte Degradierung, wird eine Überrepräsentierung der Sp3 - ZFD im Cytosol minimiert.

Bei Entwicklungen für ZFD - basierte, artifizielle RNA - bindende Proteine, welche unterschiedlichste Funktionen ausüben können [MACKAY *et al.*, 2010], würde die hier gezeigte destabilisierende Wirkung der Cys₂His₂ - ZF eine ernst zunehmende Barriere darstellen. Aufgrund der Vielzahl an Cys₂His₂ - ZFD, die sich in der Sequenzspezifität sowie der Anzahl von ZF stark unterscheiden, kann an diesem Punkt keine generelle Aussage über die Stabilität im Zusammenhang mit proteasomalen Degradierungsmechanismen getroffen werden.

5 MBP - gyrA - CTD in der präanalytischen Anreicherung bakterieller DNA

Als Alternative zu den hier untersuchten ZFDs als spezifische dsDNA - bindende Elemente, wurde ein hybrides Protein aus MBP und der gyrA - CTD kloniert, exprimiert und aufgereinigt. MBP - gyrA - CTD zeigt in Gelretardierungsexperimenten die erwartete Bindeaktivität zu einem 52 bp dsDNA - Oligo, sowie eine Spezifität für bakterielle DNA gegenüber humangenomischer DNA (Abschn. III 4.4).

Die limitierenden Faktoren von ZFDs, als spezifische DNA - bindende Peptide für die direkte Detektion von bakterieller dsDNA führten zum Konzept Organismus - spezifische Proteine bzw. deren DNA - bindende Domänen zu verwenden. Die DNA Gyrase ist einzigartig in ihrer enzymatischen Funktion, aktiv negative Windungen (*negative supercoiling*) in DNA einzuführen. Diese wichtige Funktion wird teilweise von der CTD der A - Untereinheit (gyrA) vermittelt, welche für die Interaktion mit der DNA zuständig ist [REECE & MAXWELL 1989; REECE & MAXWELL 1991]. Diese CTD ist markanterweise in eukaryotischen Typ II - Topoisomerasen nicht vorhanden, was höchstwahrscheinlich die bemerkenswerte Selektivität für bakterielle DNA erklärt [MADHUSUDAN *et al.*, 1994].

Strukturelle Untersuchungen zur gyrA - CTD aus *E. coli* ergaben eine ringförmige Anordnung von antiparallelen β - Faltblatt - Domänen, die sich zu einer Spirale formieren. Exponierte, positiv geladene AS rund um die Taille der gyrA - CTD vermitteln die Interaktion mit einem dsDNA - Strang [RUTHENBURG *et al.*, 2005]. Der Vorteil von gyrA - CTD gegenüber bereits bestehenden Systemen ist die Affinität zu zirkulären dsDNA von verschiedenen klinisch relevanten Prokaryoten wie *E. coli* und *S. aureus* (Abschn. III 5.2.2). Die Anwendung ist vor allem aus ökonomischer Sicht sehr attraktiv gegenüber Systemen mit ZFD, die für Affinitätaufreinigung verwendet wurden [MAJKA *et al.*, 1997]. Es müssen hierbei keine ZFD für die spezifischen Sequenzen kostenintensiv entwickelt werden. REPs, die Bindemotive der gyrA - CTD, sind aufgrund der wichtigen physiologischen Bedeutung der DNA - Gyrase sehr häufig in prokaryotischen Genomen vertreten, was die Anreicherung gDNA verschiedenster Prokaryoten ermöglicht.

Die Affinität von DNA Gyrase zu REPs gegenüber unspezifischer DNA ist signifikant höher [YANG & AMES 1988]. Dies ist konsistent mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen, wo eine signifikant erhöhte Affinität zum spezifischen dsDNA - Oligo im Gegensatz zum unspezifischen dsDNA - Oligo gezeigt wurde (Abschn. III 5.2.1).

Die durchgeführten Kompetitionsexperimente demonstrieren die Eignung von gyrA - CTD als Werkzeug für die Anreicherung von bakterieller DNA aus Proben mit einem deutlichen Überschuss an humaner gDNA (Abschn. III 5.2.2). Die Anreicherung bakterieller DNA bzw. Plasmide über Affinität stellt keineswegs eine vollkommen neuartige Methode dar. Für die Anreicherung von Plasmiden wurden im Rahmen anderer Arbeiten Fusionsproteine mit DNA - bindenden Domänen hergestellt und erfolgreich eingesetzt [KOSTAL *et al.*, 2004; WOODGATE *et al.*, 2002]. Der Fokus dieser Arbeiten liegt jedoch mehr auf der Verwendung in Applikationen für die Aufreinigung von Plasmiden. Das entsprechende Plasmid muss zudem das spezifische Bindemotiv beinhalten was letztendlich die Anwendung für die Isolierung oder Anreicherung von bakterieller gDNA stark limitiert. Eine elegantere Lösung für eine proteinbasierte Anreicherung wird in der Arbeit von SACHSE *et al.* vorgestellt [SACHSE *et al.*, 2009]. Die Autoren nutzen den Umstand das unmethylierte CpG - Motive in prokaryotischen Genomen überrepräsentiert sind [COENYE & VANDAMME 2005]. Das CpG - Bindeprotein mit einer CXXC - ZF - Domäne zeigt eine Affinität zu unmethylierten Sequenzmotiven [LEE *et al.*, 2001]. Das System soll in einem präanalytischen Schritt zur Anreicherung bzw. Trennung von bakterieller DNA von kontaminierender humaner gDNA und PCR - Inhibitoren verwendet werden. In einer kürzlich vorgestellten Studie, zeigte dieses System jedoch nicht die erwünschte Verbesserung hinsichtlich der Sensitivität der nachgeschalteten quantitativen PCR für die Diagnose einer invasiven Aspergillose [SPRINGER *et al.*, 2011]. Die selektive Anreicherung bakterieller DNA führte in einer anderen Studie zur Verbesserung der Sensitivität der Multiplex - PCR was letztendlich die Diagnose von spontaner bakterieller Peritonitis optimiert [BRUNS *et al.*, 2009]. Diese Resultate verdeutlichen, dass eine selektive Anreicherung von Nukleinsäuren Pathogen - DNA in einer ausreichenden Menge vorhanden ist. Ob die Sensitivität des gyrA - CTD - Systems für die Anreicherung niedrig konzentrierter bakterieller DNA ausreicht, muss nun in weiterführenden Experimenten festgestellt werden. Parallel dazu sollte auch die Immobilisierungsstrategie von MBP - gyrA - CTD optimiert werden.

Das gyrA - CTD - System ist im Rahmen dieser Arbeit als magnetisches Separationssystem entwickelt worden, was wiederum gewisse Vorteile gegenüber konventionellen chromatographischen oder zentrifugalen Separationstechniken ist. Magnetische Partikel als semifeste Phase in kompetitiven Assays erlauben homogene Reaktionsbedingungen, welche wiederum förderlich für optimale Bindeeigenschaften sind und zudem das Analyt/ Adsorbent - Gleichgewicht nur minimal beeinflussen.

Magnetpartikel - basierte Separation beschleunigt die Trennung von gebundenem von ungebundenem Analyt verglichen zur Zentrifugation. Zudem ist der Geräteaufwand viel geringer und simpler. Initiale Immobilisierungsstrategien, welche eine direkte Kopplung von MBP - gyrA - CTD auf carboxylierten magnetischen Partikeln vorsahen, führten zur Inaktivierung der Bindefähigkeit. Die alternative Lösung der regioselektiven Kopplung durch einen MBP - AK verbesserten die Bindeeigenschaften signifikant (Abschn. III 5.2.1). Durch die Verwendung des AKs zur gerichteten Kopplung wird das System aus ökonomischer Sicht unattraktiv und die Langzeitstabilität ist durch diese Komponente sehr limitiert. Der Verlust der Sekundärstruktur und die damit verbundene Einschränkung der Bindeeigenschaften durch ungerichtete kovalente Kopplung auf Oberflächen könnte beispielsweise durch die Verwendung eines flexiblen Quervernetzers wie BS³ minimiert werden.

Eine alternative Möglichkeit zur gerichteten Immobilisierung von MBP - gyrA - CTD auf magnetischen Partikeln ist die Methode von KWON *et al.*, die ein sehr effektives System vorstellen. Die Autoren nutzen die Protein trans - Splicing Strategie, welche für die Immobilisierung von MBP - Fusionsproteinen und GFP bereits erfolgreich genutzt wurde [KWON *et al.*, 2006]. Bei dieser Technik wird die Intein - Domäne in zwei Fragmente gesplittet. Die C - Intein wird kovalent auf der festen Phase gekoppelt, während das N - Intein C - terminal mit dem zu immobilisierenden Protein fusioniert wird. Sobald die zwei Intein - Fragmente in unmittelbaren Kontakt gebracht werden, wird eine aktive Intein - Domäne ausgebildet, welche das Protein an die Oberfläche bindet, wobei das Split - Intein in Lösung geht.

Die Ergebnisse um die gyrA - CTD in Zusammenhang mit der Aufreinigung von bakteriellen Nukleinsäuren sind sehr vielversprechend. Es ist daher umso wichtiger die nachfolgenden Experimente auf die Anreicherung von bakterieller DNA aus z.B. humanem Vollblut auszudehnen. Parallel dazu sollte die Immobilisierungsstrategie angepasst werden, um rekombinantes MBP - gyrA - CTD direkt auf Oberflächen zu immobilisieren, ohne die Bindeaktivität zu beeinträchtigen. Das neuartige Separationssystem könnte dann ein wertvolles Werkzeug in präanalytischen Schritten der klinischen Probenaufbereitung sein.

6 Schlussfolgerungen

Spezifisch DNA - bindende, rekombinante Proteine könnten sich für die Anwendung in Hochdurchsatzverfahren in der molekularen Diagnostik, sowie der präanalytischen Probenaufbereitung als effektive Komponenten erweisen. In miniaturisierten Assay - Plattformen, wie Proteinchips oder magnetischen Separationssystemen spielt diese Art von Protein in der Zukunft eine zentrale Rolle.

Die hier gezeigten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass zumindest DNA - bindende Proteine, wie rekombinante ZFD durch unkomplizierte Kopplungschemie auf Oberflächen gebunden werden können, ohne ihre Funktionalität zur DNA - Bindung zu verlieren.

Eine durchaus bemerkenswerte Entwicklung, da die Glasoberfläche planar ist und ungerichtet immobilisierte Proteine tendenziell ihre Aktivität unter diesen Bedingungen verlieren. Eine Vielzahl von pathogenen Mikroorganismen in verschiedensten Umgebungen müssen heutzutage schnell und kostengünstig detektiert werden. Üblicherweise werden diese Organismen aus ihrer mitunter komplexen Umgebung isoliert, angezogen und durch eine Vielzahl von biochemischen Tests identifiziert. Daher ist es nur allzu wichtig, neuartige Assays zu entwickeln, welche eine rapide, sensitive und spezifische Detektion bzw. Separation von Pathogenen bieten. Nur durch anwenderfreundliche und vor allem schnelle Prozesse der Aufbereitung und Detektion kann eine effektive Behandlung erfolgen. Sogenannte „*Point of Care*“ (POC) - Systeme sollen diese wichtigen Parameter der schnellen Detektion, auch durch Bedienung von einer untrainierten Person, erfüllen [KAITTANIS *et al.*, 2010].

ZFD - Arrays, wie hier für die Detektion von PCR - Produkten gezeigt, erfüllen einige dieser Anforderungen. Eine Vielzahl von rekombinanten ZFD würden eine geeignete Plattform für Multiplex - Analysen bieten. Das MBP - Sp1 - Array detektiert PCR - Produkte innerhalb von 30 min. Zudem benötigt ein ZFD - Array keine DNA - interkalierenden Moleküle; Hybridisierung oder spezialisierte Detektionsinstrumente [CLEVEN *et al.*, 2006; DERVAN 2001; KANG *et al.*, 2010; LAGALLY *et al.*, 2004; PALKA-SANTINI *et al.*, 2009]. Auf der Grundlage der Eigenschaften von dem hier vorgestellten ZFD - Array bieten diese sich für eine Weiterentwicklung in POC - Komponenten an.

Das Konzept, Organismus - spezifische DNA - bindende Proteine für die Separation aufzuarbeiten, ist mit der *gyrA* - CTD erfolgreich gezeigt worden. Durch eine entsprechende Weiterentwicklung hinsichtlich der Immobilisierung auf Magnetpartikeln, wäre das ein anwenderfreundliches, kostensparendes Werkzeug in der Aufbereitung von Nukleinsäuren, nicht nur für nachfolgende PCR - basierte Assays sondern auch für die Vorbereitung von Sequenzierproben. Es ist das erste Protein - basierte magnetische Separationssystem für bakterielle Nukleinsäuren. Natürlich finden rekombinante DNA - bindende Proteine auch in anderen Bereichen Anwendung, wo Nukleinsäure - Analysen bzw. Manipulationen von Vorteil sind. Insbesondere die pharmakologische Entwicklung [JAMIESON *et al.*, 2003] und synthetische Biologie [STEGE *et al.*, 2002] sind für artifizielle, spezifische DNA - bindende Proteine ein ideales Anwendungsfeld.

V LITERATUR

- ADEMOVIC, Z., GONERA, A., MISCHNICK, P. und KLEE, D. (2006). Biocompatible surface preparation using amino-functionalized amylose. *Biomacromolecules* **7** (5): 1429-32.
- AKANE, A., MATSUBARA, K., NAKAMURA, H., TAKAHASHI, S. und KIMURA, K. (1994a). Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Forensic. Sci.* **39** (2): 362-72.
- AKANE, A., MATSUBARA, K., NAKAMURA, H., TAKAHASHI, S. und KIMURA, K. (1994b). Purification of highly degraded DNA by gel filtration for PCR. *Biotechniques* **16** (2): 235-8.
- AKDUMAN, D., EHRET, J. M., MESSINA, K., RAGSDALE, S. und JUDSON, F. N. (2002). Evaluation of a strand displacement amplification assay (BD ProbeTec-SDA) for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens. *J. Clin. Microbiol.* **40** (1): 281-3.
- AL-SOUD, W. A., JONSSON, L. J. und RADSTROM, P. (2000). Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38** (1): 345-50.
- AL-SOUD, W. A. und RADSTRÖM, P. (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* **39** (2): 485-93.
- ALBER, T. (1992). Structure of the leucine zipper. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2** (2): 205-10.
- ALLEN, M. D., YAMASAKI, K., OHME-TAKAGI, M., TATENO, M. und SUZUKI, M. (1998). A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J.* **17** (18): 5484-96.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. und LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215** (3): 403-10.
- AMANN, E., BROSIUS, J. und PTASHNE, M. (1983). Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **25** (2-3): 167-78.
- ANDERSON, G. P., JACOBY, M. A., LIGLER, F. S. und KING, K. D. (1997). Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **12** (4): 329-36.
- ARAVIND, L., ANANTHARAMAN, V., BALAJI, S., BABU, M. M. und IYER, L. M. (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* **29** (2): 231-62.
- ATKINS, S. D. und CLARK, I. M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet.* **45** (1): 3-15.
- AUSTIN, C. A. und MARSH, K. L. (1998). Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays* **20** (3): 215-26.
- BARBER, R. D., HARMER, D. W., COLEMAN, R. A. und CLARK, B. J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol. Genomics* **21** (3): 389-95.
- BATES, A. D., O'DEA, M. H. und GELLERT, M. (1996). Energy coupling in *Escherichia coli* DNA gyrase: the relationship between nucleotide binding, strand passage, and DNA supercoiling. *Biochemistry* **35** (5): 1408-16.
- BEEKMANN, S. E., DIEKEMA, D. J., CHAPIN, K. C. und DOERN, G. V. (2003). Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *J. Clin. Microbiol.* **41** (7): 3119-25.

- BEERLI, R. R. und BARBAS, C. F., 3RD (2002). Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nature Biotechnol.* **20** (2): 135-41.
- BEWLEY, C. A., GRONENBORN, A. M. und CLORE, G. M. (1998). Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**: 105-31.
- BI, L. J., ZHOU, Y. F., ZHANG, X. E., DENG, J. Y., WEN, J. K. und ZHANG, Z. P. (2005). Construction and characterization of different MutS fusion proteins as recognition elements of DNA chip for detection of DNA mutations. *Biosens. Bioelectron.* **21** (1): 135-44.
- BIRNBOIM, H. C. und DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1513-23.
- BONDESON, K., FROSTELL-KARLSSON, A., FAGERSTAM, L. und MAGNUSSON, G. (1993). Lactose repressor-operator DNA interactions: kinetic analysis by a surface plasmon resonance biosensor. *Anal. Biochem.* **214** (1): 245-51.
- BOUTONNET, N., HUI, X. und ZAKRZEWSKA, K. (1993). Looking into the grooves of DNA. *Biopolymers* **33** (3): 479-90.
- BRASH, J. L. und HORBETT, T. L. (1987). *Proteins at Interfaces*, ACS Publications, Symposium Series.
- BRAUN, H., KOOP, R., ERTMER, A., NACHT, S. und SUSKE, G. (2001). Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acids Res.* **29** (24): 4994-5000.
- BROWN, R. S., SANDER, C. und ARGOS, P. (1985). The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Lett.* **186** (2): 271-4.
- BRUNS, T., SACHSE, S., STRAUBE, E., ASSEFA, S., HERRMANN, A., HAGEL, S., LEHMANN, M. und STALLMACH, A. (2009). Identification of bacterial DNA in neutrocytic and non-neutrocytic cirrhotic ascites by means of a multiplex polymerase chain reaction. *Liver Int.* **29** (8): 1206-14.
- BUIJS, J. und HLADY, V. V. (1997). Adsorption Kinetics, Conformation, and Mobility of the Growth Hormone and Lysozyme on Solid Surfaces, Studied with TIRF. *J. Colloid Interface Sci.* **190** (1): 171-81.
- BULL, H. B. (1956). Adsorption of bovine serum albumin on glass. *Biochim. Biophys. Acta.* **19** (3): 464-71.
- CAMARERO, J. A. (2007). Recent Developments in the Site-Specific Immobilization of Proteins onto Solid Supports. *Biopolymers*: 1-27.
- CAMARERO, J. A. (2008). Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports. *Biopolymers* **90** (3): 450-8.
- CARON, P. R. und WANG, J. C. (1994a). Appendix. II: Alignment of primary sequences of DNA topoisomerases. *Adv. Pharmacol.* **29B**: 271-97.
- CARON, P. R., WATT, P. und WANG, J. C. (1994b). The C-terminal domain of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. *Mol. Cell Biol.* **14** (5): 3197-207.
- CARROLL, D. (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* **188** (4): 773-82.
- CHA, T., GUO, A. und ZHU, X. Y. (2005). Enzymatic activity on a chip: the critical role of protein orientation. *Proteomics* **5** (2): 416-9.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W. W. und PRASHER, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263** (5148): 802-5.

- CHAMPOUX, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 369-413.
- CHAN, P. P. und GLAZER, P. M. (1997). Triplex DNA: fundamentals, advances, and potential applications for gene therapy. *J. Mol. Med.* **75** (4): 267-82.
- CHENG, A. C., CALABRO, V. und FRANKEL, A. D. (2001). Design of RNA-binding proteins and ligands. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11** (4): 478-84.
- CHEUNG, V. G., MORLEY, M., AGUILAR, F., MASSIMI, A., KUCHERLAPATI, R. und CHILDS, G. (1999). Making and reading microarrays. *Nature Genet.* **21** (1 Suppl): 15-9.
- CHOO, Y. und KLUG, A. (1997). Physical basis of a protein-DNA recognition code. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7** (1): 117-25.
- CHUN, R. F., SEMMES, O. J., NEUVEUT, C. und JEANG, K. T. (1998). Modulation of Sp1 phosphorylation by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J. Virol.* **72** (4): 2615-29.
- CLEVEN, B. E., PALKA-SANTINI, M., GIELEN, J., MEEMBOR, S., KRONKE, M. und KRUT, O. (2006). Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.* **44** (7): 2389-97.
- COENYE, T. und VANDAMME, P. (2005). Overrepresentation of immunostimulatory CpG motifs in Burkholderia genomes. *J. Cyst. Fibros.* **4** (3): 193-6.
- COGSWELL, F. B., BANTAR, C. E., HUGHES, T. G., GU, Y. und PHILIPP, M. T. (1996). Host DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **34** (4): 980-2.
- CORBI, N., LIBRI, V., FANCIULLI, M. und PASSANANTI, C. (1998). Binding properties of the artificial zinc fingers coding gene Sint1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253** (3): 686-92.
- CORISH, P. und TYLER-SMITH, C. (1999). Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng.* **12** (12): 1035-40.
- CORNU, T. I., THIBODEAU-BEGANNY, S., GUHL, E., ALWIN, S., EICHTINGER, M., JOUNG, J. K. und CATHOMEN, T. (2008). DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Mol. Ther.* **16** (2): 352-8.
- COULOCHERI, S. A., PIGIS, D. G., PAPAVALASSIOU, K. A. und PAPAVALASSIOU, A. G. (2007). Hydrogen bonds in protein-DNA complexes: where geometry meets plasticity. *Biochimie* **89** (11): 1291-303.
- COUX, O., TANAKA, K. und GOLDBERG, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 801-47.
- DE LA VEGA, F. M., LAZARUK, K. D., RHODES, M. D. und WENZ, M. H. (2005). Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. *Mutat. Res.* **573** (1-2): 111-35.
- DENNIG, J., BEATO, M. und SUSKE, G. (1996). An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *EMBO J.* **15** (20): 5659-67.
- DERVAN, P. B. (2001). Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg. Med. Chem.* **9** (9): 2215-35.
- DERVAN, P. B. und EDELSON, B. S. (2003). Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13** (3): 284-99.
- DI GUAN, C., LI, P., RIGGS, P. D. und INOUE, H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67** (1): 21-30.

- DUBURCQ, X., OLIVIER, C., MALINGUE, F., DESMET, R., BOUZIDI, A., ZHOU, F., AURIAULT, C., GRAS-MASSE, H. und MELNYK, O. (2004). Peptide-protein microarrays for the simultaneous detection of pathogen infections. *Bioconjug. Chem.* **15** (2): 307-16.
- DUNLOP, E. H., FEILER, W. A. und MATTIONE, M. J. (1984). Magnetic separation in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* **2** (1): 63-74.
- EISENSTEIN, B. I. (1990). The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N. Engl. J. Med.* **322** (3): 178-83.
- ELROD-ERICKSON, M., BENSON, T. E. und PABO, C. O. (1998). High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger-DNA recognition. *Structure* **6** (4): 451-64.
- ELROD-ERICKSON, M., ROULD, M. A., NEKLUDOVA, L. und PABO, C. O. (1996). Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions. *Structure* **4** (10): 1171-80.
- ESPELI, O. und BOCCARD, F. (1997). In vivo cleavage of Escherichia coli BIME-2 repeats by DNA gyrase: genetic characterization of the target and identification of the cut site. *Mol. Microbiol.* **26** (4): 767-77.
- FELICIONI, R., GARZELLI, B., VACCARI, L., MELFI, D. und BALESTRERI, E. (1997). Activity staining of protein inhibitors of proteases on gelatin-containing polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **244** (1): 176-9.
- FORSTER, A. und HILL, C. P. (2003). Proteasome degradation: enter the substrate. *Trends Cell Biol.* **13** (11): 550-3.
- FRANKEL, A. D., BERG, J. M. und PABO, C. O. (1987). Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84** (14): 4841-5.
- FRIESEN, W. J. und DARBY, M. K. (1998). Specific RNA binding proteins constructed from zinc fingers. *Nat. Struct. Biol.* **5** (7): 543-6.
- GAJIWALA, K. S. und BURLEY, S. K. (2000). Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** (1): 110-6.
- GAJIWALA, K. S., CHEN, H., CORNILLE, F., ROQUES, B. P., REITH, W., MACH, B. und BURLEY, S. K. (2000). Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature* **403** (6772): 916-21.
- GARVIE, C. W. und WOLBERGER, C. (2001). Recognition of specific DNA sequences. *Mol Cell* **8** (5): 937-46.
- GEHRING, W. J., QIAN, Y. Q., BILLETER, M., FURUKUBO-TOKUNAGA, K., SCHIER, A. F., RESENDEZ-PEREZ, D., AFFOLTER, M., OTTING, G. und WUTHRICH, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* **78** (2): 211-23.
- GELLERT, M., MIZUUCHI, K., O'DEA, M. H. und NASH, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **73** (11): 3872-6.
- GHOSH, I., STAINS, C. I., OOI, A. T. und SEGAL, D. J. (2006). Direct detection of double-stranded DNA: Molecular methods and applications for DNA diagnostics. *Mol. Biosyst.* **2** (11): 551-60.
- GIDONI, D., DYNAN, W. S. und TJIAN, R. (1984). Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature* **312** (5993): 409-13.
- GILBERT, E. J. und MAXWELL, A. (1994). The 24 kDa N-terminal sub-domain of the DNA gyrase B protein binds coumarin drugs. *Mol. Microbiol.* **12** (3): 365-73.

- GOLDBERG, H. J., WHITESIDE, C. I., HART, G. W. und FANTUS, I. G. (2006). Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology* **147** (1): 222-31.
- GONERA, A., GOCLIK, V., BAUM, M. und MISCHNICK, P. (2002). Preparation and structural characterisation of O-aminopropyl starch and amylose. *Carbohydr. Res.* **337** (21-23): 2263-72.
- GRIFFITH, K. L. und WOLF, R. E., JR. (2002). Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290** (1): 397-402.
- GROLL, J., AMIRGOULOVA, E. V., AMERINGER, T., HEYES, C. D., ROCKER, C., NIENHAUS, G. U. und MOLLER, M. (2004). Biofunctionalized, ultrathin coatings of cross-linked star-shaped poly(ethylene oxide) allow reversible folding of immobilized proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **126** (13): 4234-9.
- HAGEN, G., MULLER, S., BEATO, M. und SUSKE, G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res.* **20** (21): 5519-25.
- HAN, M., PARK, I. S., KIM, S. H. und KIM, B. S. (2009). Design and characterization of a maltose binding protein-linked growth factor for matrix engineering. *Biotechnol. Lett.* **31** (11): 1677-84.
- HANSEN, W. L., BRUGGEMAN, C. A. und WOLFFS, P. F. (2009). Evaluation of new preanalysis sample treatment tools and DNA isolation protocols to improve bacterial pathogen detection in whole blood. *J. Clin. Microbiol.* **47** (8): 2629-31.
- HARRINGTON, M. A., JONES, P. A., IMAGAWA, M. und KARIN, M. (1988). Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85** (7): 2066-70.
- HARRISON, S. C. und AGGARWAL, A. K. (1990). DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 933-69.
- HERMANSON, G. T. (2008). *Bioconjugate Techniques, 2nd Edition*, Academic Press.
- HERSHKO, A. und CIECHANOVER, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425-79.
- HEWITT, S. N., CHOI, R., KELLEY, A., CROWTHER, G. J., NAPULI, A. J. und VAN VOORHIS, W. C. (2011). Expression of proteins in Escherichia coli as fusions with maltose-binding protein to rescue non-expressed targets in a high-throughput protein-expression and purification pipeline. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67** (Pt 9): 1006-9.
- HOEISEL, J. D. (2006). Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat. Rev. Genet.* **7** (3): 200-10.
- HOLLOWAY, A. J., VAN LAAR, R. K., TOTHILL, R. W. und BOWTELL, D. D. (2002). Options available--from start to finish--for obtaining data from DNA microarrays II. *Nature Genet.* **32** Suppl: 481-9.
- HORZ, H. P., SCHEER, S., VIANNA, M. E. und CONRADS, G. (2010). New methods for selective isolation of bacterial DNA from human clinical specimens. *Anaerobe* **16** (1): 47-53.
- HUANG, W., WANG, J., BHATTACHARYYA, D. und BACHAS, L. G. (1997). Improving the activity of immobilized subtilisin by site-specific attachment to surfaces. *Anal. Chem.* **69** (22): 4601-7.
- INOUE, S. (1973). Nonspecific adsorption of proteins to microplates. *Appl. Microbiol.* **25** (2): 279-83.
- IUCHI, S. (2001). Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **58** (4): 625-35.
- IUCHI, S. und KULDELL, N. (2005). *Zinc finger proteins : from atomic contact to cellular function*. Georgetown, Tex. New York, Landes Bioscience ; Kluwer Academic/Plenum Publishers.

- JAMIESON, A. C., MILLER, J. C. und PABO, C. O. (2003). Drug discovery with engineered zinc-finger proteins. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2** (5): 361-8.
- JANIN, J., RODIER, F., CHAKRABARTI, P. und BAHADUR, R. P. (2007). Macromolecular recognition in the Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **63** (Pt 1): 1-8.
- JAWORSKI, A., HSIEH, W. T., BLAHO, J. A., LARSON, J. E. und WELLS, R. D. (1987). Left-handed DNA in vivo. *Science* **238** (4828): 773-7.
- JOHANSSON, A., IBRAHIM, A., GORANSSON, I., ERIKSSON, U., GURYCOVA, D., CLARRIDGE, J. E., 3RD und SJOSTEDT, A. (2000). Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Clin. Microbiol.* **38** (11): 4180-5.
- JONES, K. A., KADONAGA, J. T., LUCIW, P. A. und TJIAN, R. (1986). Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* **232** (4751): 755-9.
- JONKHEIJM, P., WEINRICH, D., SCHRODER, H., NIEMEYER, C. M. und WALDMANN, H. (2008). Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47** (50): 9618-47.
- KAITTANIS, C., SANTRA, S. und PEREZ, J. M. (2010). Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **62** (4-5): 408-23.
- KANG, T., YOO, S. M., YOON, I., LEE, S. Y. und KIM, B. (2010). Patterned multiplex pathogen DNA detection by Au particle-on-wire SERS sensor. *Nano Lett.* **10** (4): 1189-93.
- KAPPEL, S., MATTHESS, Y., KAUFMANN, M. und STREBHARDT, K. (2007). Silencing of mammalian genes by tetracycline-inducible shRNA expression. *Nature Protocols* **2** (12): 3257-69.
- KAPUST, R. B. und WAUGH, D. S. (1999). Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* **8** (8): 1668-74.
- KIM, M. S., STYBAYEVA, G., LEE, J. Y., REVZIN, A. und SEGAL, D. J. (2010). A zinc finger protein array for the visual detection of specific DNA sequences for diagnostic applications. *Nucleic Acids Res.*
- KISSELEV, A. F., KAGANOVICH, D. und GOLDBERG, A. L. (2002). Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings. *J. Biol. Chem.* **277** (25): 22260-70.
- KLOSE, R. J. und BIRD, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* **31** (2): 89-97.
- KNIGHT, S. W. und SAMUELS, D. S. (1999). Natural synthesis of a DNA-binding protein from the C-terminal domain of DNA gyrase A in *Borrelia burgdorferi*. *EMBO J.* **18** (17): 4875-81.
- KÖNIG, P. und RICHMOND, T. J. (1993). The X-ray structure of the GCN4-bZIP bound to ATF/CREB site DNA shows the complex depends on DNA flexibility. *J Mol Biol* **233** (1): 139-54.
- KORTT, A. A., ODDIE, G. W., ILIADES, P., GRUEN, L. C. und HUDSON, P. J. (1997). Nonspecific amine immobilization of ligand can be a potential source of error in BIAcore binding experiments and may reduce binding affinities. *Anal. Biochem.* **253** (1): 103-11.
- KOSTAL, J., MULCHANDANI, A. und CHEN, W. (2004). Affinity purification of plasmid DNA by temperature-triggered precipitation. *Biotechnol. Bioeng.* **85** (3): 293-7.
- KREADER, C. A. (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (3): 1102-6.

- KRIWACKI, R. W., SCHULTZ, S. C., STEITZ, T. A. und CARADONNA, J. P. (1992). Sequence-specific recognition of DNA by zinc-finger peptides derived from the transcription factor Sp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89** (20): 9759-63.
- KUSNEZOW, W. und HOHEISEL, J. D. (2003a). Solid supports for microarray immunoassays. *J. Mol. Recognit.* **16** (4): 165-76.
- KUSNEZOW, W., JACOB, A., WALIJEW, A., DIEHL, F. und HOHEISEL, J. D. (2003b). Antibody microarrays: an evaluation of production parameters. *Proteomics* **3** (3): 254-64.
- KWON, Y., COLEMAN, M. A. und CAMARERO, J. A. (2006). Selective immobilization of proteins onto solid supports through split-intein-mediated protein trans-splicing. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45** (11): 1726-9.
- KYTE, J. und DOOLITTLE, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157** (1): 105-32.
- LACHENMANN, M. J., LADBURY, J. E., PHILLIPS, N. B., NARAYANA, N., QIAN, X. und WEISS, M. A. (2002). The hidden thermodynamics of a zinc finger. *J. Mol. Biol.* **316** (4): 969-89.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259): 680-5.
- LAGALLY, E. T., SCHERER, J. R., BLAZEJ, R. G., TORIELLO, N. M., DIEP, B. A., RAMCHANDANI, M., SENSABAUGH, G. F., RILEY, L. W. und MATHIES, R. A. (2004). Integrated portable genetic analysis microsystem for pathogen/infectious disease detection. *Anal. Chem.* **76** (11): 3162-70.
- LANE, W. J. und DARST, S. A. (2006). The structural basis for promoter -35 element recognition by the group IV sigma factors. *PLoS Biology* **4** (9): e269.
- LARSEN, F., GUNDERSEN, G., LOPEZ, R. und PRYDZ, H. (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* **13** (4): 1095-107.
- LEE, H. J., YAN, Y., MARRIOTT, G. und CORN, R. M. (2005). Quantitative functional analysis of protein complexes on surfaces. *J. Physiol* **563** (Pt 1): 61-71.
- LEE, J. H., VOO, K. S. und SKALNIK, D. G. (2001). Identification and characterization of the DNA binding domain of CpG-binding protein. *J. Biol. Chem.* **276** (48): 44669-76.
- LEE, M. S., GIPPERT, G. P., SOMAN, K. V., CASE, D. A. und WRIGHT, P. E. (1989). Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science* **245** (4918): 635-7.
- LEVSKY, J. M. und SINGER, R. H. (2003). Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J. Cell Sci.* **116** (Pt 14): 2833-8.
- LEWIS, M. (1996). Response: DNA Looping and Lac Repressor--CAP Interaction. *Science* **274** (5294): 1931-2.
- LEWIS, M., CHANG, G., HORTON, N. C., KERCHER, M. A., PACE, H. C., SCHUMACHER, M. A., BRENNAN, R. G. und LU, P. (1996). Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* **271** (5253): 1247-54.
- LI, X., ZHAO, X., FANG, Y., JIANG, X., DUONG, T., FAN, C., HUANG, C. C. und KAIN, S. R. (1998). Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J. Biol. Chem.* **273** (52): 34970-5.
- LIN, P. C., UENG, S. H., TSENG, M. C., KO, J. L., HUANG, K. T., YU, S. C., ADAK, A. K., CHEN, Y. J. und LIN, C. C. (2006). Site-specific protein modification through Cu(I)-catalyzed 1,2,3-triazole formation and its implementation in protein microarray fabrication. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45** (26): 4286-90.

- LIU, Q., XIA, Z., ZHONG, X. und CASE, C. C. (2002). Validated zinc finger protein designs for all 16 GNN DNA triplet targets. *J. Biol. Chem.* **277** (6): 3850-6.
- LOCASALE, J. W., NAPOLI, A. A., CHEN, S., BERMAN, H. M. und LAWSON, C. L. (2009). Signatures of protein-DNA recognition in free DNA binding sites. *J. Mol. Biol.* **386** (4): 1054-65.
- LODISH, H. F. (2003). *Molecular Cell Biology*. New York, W.H. Freeman and Company.
- LOPEZ, M. M., BERTOLINI, E., OLMOS, A., CARUSO, P., GORRIS, M. T., LLOP, P., PENYALVER, R. und CAMBRA, M. (2003). Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *Int. Microbiol.* **6** (4): 233-43.
- LUEKING, A., CAHILL, D. J. und MÜLLNER, S. (2005). Protein biochips: A new and versatile platform technology for molecular medicine. *Drug Discov. Today* **10** (11): 789-94.
- LUK, Y. Y., TINGEY, M. L., DICKSON, K. A., RAINES, R. T. und ABBOTT, N. L. (2004). Imaging the binding ability of proteins immobilized on surfaces with different orientations by using liquid crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **126** (29): 9024-32.
- MACKAY, J. P., FONT, J. und SEGAL, D. J. (2010). The prospects for designer single-stranded RNA-binding proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18** (3): 256-61.
- MADHUSUDAN, K., RAMESH, V. und NAGARAJA, V. (1994). Molecular cloning of *gyrA* and *gyrB* genes of *Mycobacterium tuberculosis*: analysis of nucleotide sequence. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **33** (4): 651-60.
- MAJELLO, B., DE LUCA, P. und LANIA, L. (1997). Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *J. Biol. Chem.* **272** (7): 4021-6.
- MAJKA, J., JAKIMOWICZ, D., ZARKO-POSTAWKA, M. und ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J. (1997). Glutathione S-transferase fusion proteins as an affinity reagent for rapid isolation of specific sequence directly from genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **25** (12): 2537-8.
- MARTZEN, M. R., MCCRAITH, S. M., SPINELLI, S. L., TORRES, F. M., FIELDS, S., GRAYHACK, E. J. und PHIZICKY, E. M. (1999). A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* **286** (5442): 1153-5.
- MATEO, C., TORRES, R., FERNANDEZ-LORENTE, G., ORTIZ, C., FUENTES, M., HIDALGO, A., LOPEZ-GALLEGO, F., ABIAN, O., PALOMO, J. M., BETANCOR, L., PESSELA, B. C., GUIBAN, J. M. und FERNANDEZ-LAFUENTE, R. (2003). Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules* **4** (3): 772-7.
- MATSUSHITA, K. und SUGIURA, Y. (2001). Effect of arginine mutation of alanine-556 on DNA recognition of zinc finger protein Sp1. *Bioorg. Med. Chem.* **9** (9): 2259-67.
- MCCOLL, D. J., HONCHELL, C. D. und FRANKEL, A. D. (1999). Structure-based design of an RNA-binding zinc finger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96** (17): 9521-6.
- MELCHIOR, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 591-626.
- MELNYK, O., DUBURCQ, X., OLIVIER, C., URBES, F., AURIAULT, C. und GRAS-MASSE, H. (2002). Peptide arrays for highly sensitive and specific antibody-binding fluorescence assays. *Bioconjug. Chem.* **13** (4): 713-20.
- MENDOZA, L. G., MCQUARY, P., MONGAN, A., GANGADHARAN, R., BRIGNAC, S. und EGGERS, M. (1999). High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biotechniques* **27** (4): 778-80, 782-6, 788.

- MICHAEL, S. F., KILFOIL, V. J., SCHMIDT, M. H., AMANN, B. T. und BERG, J. M. (1992). Metal binding and folding properties of a minimalist Cys2His2 zinc finger peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89** (11): 4796-800.
- MILLER, J., MCLACHLAN, A. D. und KLUG, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4** (6): 1609-14.
- MIZUUCHI, K., MIZUUCHI, M., O'DEA, M. H. und GELLERT, M. (1984). Cloning and simplified purification of *Escherichia coli* DNA gyrase A and B proteins. *J. Biol. Chem.* **259** (14): 9199-201.
- MORAIS CABRAL, J. H., JACKSON, A. P., SMITH, C. V., SHIKOTRA, N., MAXWELL, A. und LIDDINGTON, R. C. (1997). Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* **388** (6645): 903-6.
- MORATA, P., QUEIPO-ORTUNO, M. I. und DE DIOS COLMENERO, J. (1998). Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* **36** (9): 2443-6.
- MOTHERSHED, E. A. und WHITNEY, A. M. (2006). Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clin. Chim. Acta* **363** (1-2): 206-20.
- MUIR, T. W. (2003). Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 249-89.
- NAGAOKA, M., KAJI, T., IMANISHI, M., HORI, Y., NOMURA, W. und SUGIURA, Y. (2001). Multiconnection of identical zinc finger: implication for DNA binding affinity and unit modulation of the three zinc finger domain. *Biochemistry* **40** (9): 2932-41.
- NAKANISHI, K., SAKIYAMA, T. und IMAMURA, K. (2001). On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J. Biosci. Bioeng.* **91** (3): 233-44.
- NEDVED, M. L. und MOE, G. R. (1994). Cooperative, non-specific binding of a zinc finger peptide to DNA. *Nucleic Acids Res.* **22** (22): 4705-11.
- NEKLUDOVA, L. und PABO, C. O. (1994). Distinctive DNA conformation with enlarged major groove is found in Zn-finger-DNA and other protein-DNA complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91** (15): 6948-52.
- NIELSEN, P. E. (2001). Peptide nucleic acid targeting of double-stranded DNA. *Methods Enzymol* **340**: 329-40.
- NIEMEYER, C. M. (2002). The developments of semisynthetic DNA-protein conjugates. *Trends Biotechnology* **20** (9): 395-401.
- NIKOLOV, D. B. und BURLEY, S. K. (1994). 2.1 Å resolution refined structure of a TATA box-binding protein (TBP). *Nat. Struct. Biol.* **1** (9): 621-37.
- OGUEY, C., FOLOPPE, N. und HARTMANN, B. (2010). Understanding the sequence-dependence of DNA groove dimensions: implications for DNA interactions. *PLoS One* **5** (12): e15931.
- OMICHIANSKI, J. G., PEDONE, P. V., FELSENFELD, G., GRONENBORN, A. M. und CLORE, G. M. (1997). The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode. *Nature Struct. Biol.* **4** (2): 122-32.
- OOI, A. T., STAINS, C. I., GHOSH, I. und SEGAL, D. J. (2006). Sequence-enabled reassembly of beta-lactamase (SEER-LAC): a sensitive method for the detection of double-stranded DNA. *Biochemistry* **45** (11): 3620-5.
- OSAWA, Y., IKEBUKURO, K., MOTOKI, H., MATSUO, T., HORIUCHI, M. und SODE, K. (2008). The simple and rapid detection of specific PCR products from bacterial genomes using Zn finger proteins. *Nucleic Acids Res.* **36** (11): e68.

- OTWINOWSKI, Z., SCHEVITZ, R. W., ZHANG, R. G., LAWSON, C. L., JOACHIMIAK, A., MARMORSTEIN, R. Q., LUISI, B. F. und SIGLER, P. B. (1988). Crystal structure of trp repressor/operator complex at atomic resolution. *Nature* **335** (6188): 321-9.
- PALKA-SANTINI, M., CLEVEN, B. E., EICHINGER, L., KRONKE, M. und KRUT, O. (2009). Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC Microbiol.* **9**: 1.
- PARRAGA, G., HORVATH, S. J., EISEN, A., TAYLOR, W. E., HOOD, L., YOUNG, E. T. und KLEVIT, R. E. (1988). Zinc-dependent structure of a single-finger domain of yeast ADR1. *Science* **241** (4872): 1489-92.
- PAULING, L. und COREY, R. B. (1951b). The structure of hair, muscle, and related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **37** (5): 261-71.
- PAULING, L. und COREY, R. B. (1951c). The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **37** (5): 251-6.
- PAULING, L., COREY, R. B. und BRANSON, H. R. (1951a). The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **37** (4): 205-11.
- PAVLETICH, N. P. und PABO, C. O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252** (5007): 809-17.
- PEPLIES, J., LAU, S. C., PERNTHALER, J., AMANN, R. und GLOCKNER, F. O. (2004). Application and validation of DNA microarrays for the 16S rRNA-based analysis of marine bacterioplankton. *Environ. Microbiol.* **6** (6): 638-45.
- PHIZICKY, E., BASTIAENS, P. I., ZHU, H., SNYDER, M. und FIELDS, S. (2003). Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* **422** (6928): 208-15.
- PREDKI, P. F. (2004). Functional protein microarrays: ripe for discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8** (1): 8-13.
- PREDKI, P. F. (2007). *Functional protein microarrays in drug discovery*. Boca Raton, FL, CRC Press.
- RADSTRÖM, P., LOFSTRÖM, C., LOVENKLEV, M., KNUTSSON, R. und WOLFFS, P. (2008). Strategies for overcoming PCR inhibition. *CSH Protocols* **2008**: pdb top20.
- RAUMANN, B. E., ROULD, M. A., PABO, C. O. und SAUER, R. T. (1994). DNA recognition by beta-sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature* **367** (6465): 754-7.
- REECE, R. J. und MAXWELL, A. (1989). Tryptic fragments of the Escherichia coli DNA gyrase A protein. *J. Biol. Chem.* **264** (33): 19648-53.
- REECE, R. J. und MAXWELL, A. (1991). The C-terminal domain of the Escherichia coli DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* **19** (7): 1399-405.
- REECE, R. J. und MAXWELL, A. (1991). DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26** (3-4): 335-75.
- RIGGS, P. (2000). Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein. *Mol. Biotechnol.* **15** (1): 51-63.
- ROHS, R., JIN, X., WEST, S. M., JOSHI, R., HONIG, B. und MANN, R. S. (2010). Origins of specificity in protein-DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **79**: 233-69.
- ROHS, R., WEST, S. M., LIU, P. und HONIG, B. (2009). Nuance in the double-helix and its role in protein-DNA recognition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19** (2): 171-7.

- ROHS, R., WEST, S. M., SOSINSKY, A., LIU, P., MANN, R. S. und HONIG, B. (2009). The role of DNA shape in protein-DNA recognition. *Nature* **461** (7268): 1248-53.
- ROMUALDI, A., FELDER, M., ROSE, D., GAUSMANN, U., SCHILHABEL, M., GLOCKNER, G., PLATZER, M. und SUHNEL, J. (2007). GenColors: annotation and comparative genomics of prokaryotes made easy. *Methods Mol. Biol.* **395**: 75-96.
- RUSMINI, F., ZHONG, Z. und FEIJEN, J. (2007). Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **8** (6): 1775-89.
- RUTHENBURG, A. J., GRAYBOSCH, D. M., HUETSCH, J. C. und VERDINE, G. L. (2005). A superhelical spiral in the Escherichia coli DNA gyrase A C-terminal domain imparts unidirectional supercoiling bias. *J. Biol. Chem.* **280** (28): 26177-84.
- SACHSE, S., STRAUBE, E., LEHMANN, M., BAUER, M., RUSSWURM, S. und SCHMIDT, K. H. (2009). Truncated human cytidylate-phosphate-deoxyguanylate-binding protein for improved nucleic acid amplification technique-based detection of bacterial species in human samples. *J. Clin. Microbiol.* **47** (4): 1050-7.
- SAFSTEN, P. (2009). Epitope mapping by surface plasmon resonance. *Methods Mol. Biol.* **524**: 67-76.
- SANDER, J. D., ZABACK, P., JOUNG, J. K., VOYTAS, D. F. und DOBBS, D. (2009). An affinity-based scoring scheme for predicting DNA-binding activities of modularly assembled zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res.* **37** (2): 506-15.
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS USA* **74** (12): 5463-7.
- SAPETSCHNIG, A., RISCHITOR, G., BRAUN, H., DOLL, A., SCHERGAUT, M., MELCHIOR, F. und SUSKE, G. (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J.* **21** (19): 5206-15.
- SCHMIDTKE, G., EMCH, S., GROETTRUP, M. und HOLZHUTTER, H. G. (2000). Evidence for the existence of a non-catalytic modifier site of peptide hydrolysis by the 20 S proteasome. *J. Biol. Chem.* **275** (29): 22056-63.
- SCHMITT, J., HESS, H. und STUNNENBERG, H. G. (1993). Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Rep.* **18** (3): 223-30.
- SCHULTZ, S. C., SHIELDS, G. C. und STEITZ, T. A. (1991). Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science* **253** (5023): 1001-7.
- SCHUMACHER, M. A., CHOI, K. Y., ZALKIN, H. und BRENNAN, R. G. (1994). Crystal structure of LacI member, PurR, bound to DNA: minor groove binding by alpha helices. *Science* **266** (5186): 763-70.
- SEEMAN, N. C., ROSENBERG, J. M. und RICH, A. (1976). Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *PNAS USA* **73** (3): 804-8.
- SEGAL, D. J. und BARBAS, C. F., 3RD (2001). Custom DNA-binding proteins come of age: polydactyl zinc-finger proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12** (6): 632-7.
- SEGAL, D. J., BEERLI, R. R., BLANCAFORT, P., DREIER, B., EFFERTZ, K., HUBER, A., KOKSCH, B., LUND, C. V., MAGNENAT, L., VALENTE, D. und BARBAS, C. F., 3RD (2003). Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. *Biochemistry* **42** (7): 2137-48.
- SHARP, P. A., SUGDEN, B. und SAMBROOK, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12** (16): 3055-63.

- SISTA, R., HUA, Z., THWAR, P., SUDARSAN, A., SRINIVASAN, V., ECKHARDT, A., POLLACK, M. und PAMULA, V. (2008). Development of a digital microfluidic platform for point of care testing. *Lab Chip* **8** (12): 2091-104.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. und KLENK, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150** (1): 76-85.
- SO, H. C., KWAN, J. S., CHERNY, S. S. und SHAM, P. C. (2011). Risk prediction of complex diseases from family history and known susceptibility loci, with applications for cancer screening. *Am. J. Hum. Genet.* **88** (5): 548-65.
- SOMERS, W. S. und PHILLIPS, S. E. (1992). Crystal structure of the met repressor-operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by beta-strands. *Nature* **359** (6394): 387-93.
- SOUTHERN, E., MIR, K. und SHCHEPINOV, M. (1999). Molecular interactions on microarrays. *Nature Genet.* **21** (1 Suppl): 5-9.
- SPRINGER, J., LOEFFLER, J., HEINZ, W., SCHLOSSNAGEL, H., LEHMANN, M., MORTON, O., ROGERS, T. R., SCHMITT, C., FROSCH, M., EINSELE, H. und KURZAI, O. (2011). Pathogen-specific DNA enrichment does not increase sensitivity of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients. *J. Clin. Microbiol.* **49** (4): 1267-73.
- SPRONK, C. A., SLIJPER, M., VAN BOOM, J. H., KAPTEIN, R. und BOELENS, R. (1996). Formation of the hinge helix in the lac repressor is induced upon binding to the lac operator. *Nat. Struct. Biol.* **3** (11): 916-9.
- STAINS, C. I., FURMAN, J. L., SEGAL, D. J. und GHOSH, I. (2006). Site-specific detection of DNA methylation utilizing mCpG-SEER. *J. Am. Chem. Soc.* **128** (30): 9761-5.
- STAINS, C. I., PORTER, J. R., OOI, A. T., SEGAL, D. J. und GHOSH, I. (2005). DNA sequence-enabled reassembly of the green fluorescent protein. *J. Am. Chem. Soc.* **127** (31): 10782-3.
- STEGE, J. T., GUAN, X., HO, T., BEACHY, R. N. und BARBAS, C. F., 3RD (2002). Controlling gene expression in plants using synthetic zinc finger transcription factors. *Plant J.* **32** (6): 1077-86.
- STENDER, H. (2003). PNA FISH: an intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **3** (5): 649-55.
- STERN, M. J., AMES, G. F., SMITH, N. H., ROBINSON, E. C. und HIGGINS, C. F. (1984). Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **37** (3): 1015-26.
- STITOU, S., DIAZ DE LA GUARDIA, R., JIMENEZ, R. und BURGOS, M. (1999). Isolation of a species-specific satellite DNA with a novel CENP-B-like box from the North African rodent *Lemniscomys barbarus*. *Exp. Cell Res.* **250** (2): 381-6.
- SUSKE, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* **238** (2): 291-300.
- SUZUKI, M. und GERSTEIN, M. (1995). Binding geometry of alpha-helices that recognize DNA. *Proteins* **23** (4): 525-35.
- TENOVER, F. C., JONES, R. N., SWENSON, J. M., ZIMMER, B., MCALLISTER, S. und JORGENSEN, J. H. (1999). Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* **37** (12): 4051-8.
- TOLSTRUP, N., NIELSEN, P. S., KOLBERG, J. G., FRANKEL, A. M., VISSING, H. und KAUPPINEN, S. (2003). OligoDesign: Optimal design of LNA (locked nucleic acid) oligonucleotide capture probes for gene expression profiling. *Nucleic Acids Res.* **31** (13): 3758-62.

- TRAORE, H., VAN DEUN, A., SHAMPUTA, I. C., RIGOUTS, L. und PORTAELS, F. (2006). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA and rifampin resistance in clinical specimens from tuberculosis patients by line probe assay. *J. Clin. Microbiol.* **44** (12): 4384-8.
- TRAVERS, A. A. (1989). DNA conformation and protein binding. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 427-52.
- VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., SUTTON, G. G., SMITH, H. O., YANDELL, M., EVANS, C. A., HOLT, R. A., GOCAYNE, J. D., AMANATIDES, P., BALLEW, R. M., HUSON, D. H., WORTMAN, J. R., ZHANG, Q., KODIRA, C. D., ZHENG, X. H., CHEN, L., SKUPSKI, M., SUBRAMANIAN, G., THOMAS, P. D., ZHANG, J., GABOR MIKLOS, G. L., NELSON, C., BRODER, S., CLARK, A. G., NADEAU, J., MCKUSICK, V. A., ZINDER, N., LEVINE, A. J., ROBERTS, R. J., SIMON, M., SLAYMAN, C., HUNKAPILLER, M., BOLANOS, R., DELCHER, A., DEW, I., FASULO, D., FLANIGAN, M., FLOREA, L., HALPERN, A., HANNENHALLI, S., KRAVITZ, S., LEVY, S., MOBARRY, C., REINERT, K., REMINGTON, K., ABU-THREIDEH, J., BEASLEY, E., BIDDICK, K., BONAZZI, V., BRANDON, R., CARGILL, M., CHANDRAMOULISWARAN, I., CHARLAB, R., CHATURVEDI, K., DENG, Z., DI FRANCESCO, V., DUNN, P., EILBECK, K., EVANGELISTA, C., GABRIELIAN, A. E., GAN, W., GE, W., GONG, F., GU, Z., GUAN, P., HEIMAN, T. J., HIGGINS, M. E., JI, R. R., KE, Z., KETCHUM, K. A., LAI, Z., LEI, Y., LI, Z., LI, J., LIANG, Y., LIN, X., LU, F., MERKULOV, G. V., MILSHINA, N., MOORE, H. M., NAIK, A. K., NARAYAN, V. A., NEELAM, B., NUSSKERN, D., RUSCH, D. B., SALZBERG, S., SHAO, W., SHUE, B., SUN, J., WANG, Z., WANG, A., WANG, X., WANG, J., WEI, M., WIDES, R., XIAO, C., YAN, C., YAO, A., YE, J., ZHAN, M., ZHANG, W., ZHANG, H., ZHAO, Q., ZHENG, L., ZHONG, F., ZHONG, W., ZHU, S., ZHAO, S., GILBERT, D., BAUMHUETER, S., SPIER, G., CARTER, C., CRAVCHIK, A., WOODAGE, T., ALI, F., AN, H., AWE, A., BALDWIN, D., BADEN, H., BARNSTEAD, M., BARROW, I., BEESON, K., BUSAM, D., CARVER, A., CENTER, A., CHENG, M. L., CURRY, L., DANAHER, S., DAVENPORT, L., DESILETS, R., DIETZ, S., DODSON, K., DOUP, L., FERRIERA, S., GARG, N., GLUECKSMANN, A., HART, B., HAYNES, J., HAYNES, C., HEINER, C., HLADUN, S., HOSTIN, D., HOUCK, J., HOWLAND, T., IBEGWAM, C., JOHNSON, J., KALUSH, F., KLINE, L., KODURU, S., LOVE, A., MANN, F., MAY, D., MCCAWLEY, S., MCINTOSH, T., MCMULLEN, I., MOY, M., MOY, L., MURPHY, B., NELSON, K., PFANNKOCH, C., PRATTS, E., PURI, V., QURESHI, H., REARDON, M., RODRIGUEZ, R., ROGERS, Y. H., ROMBLAD, D., RUHFEL, B., SCOTT, R., SITTER, C., SMALLWOOD, M., STEWART, E., STRONG, R., SUH, E., THOMAS, R., TINT, N. N., TSE, S., VECH, C., WANG, G., WETTER, J., WILLIAMS, S., WILLIAMS, M., WINDSOR, S., WINN-DEEN, E., WOLFE, K., ZAVERI, J., ZAVERI, K., ABRIL, J. F., GUIGO, R., CAMPBELL, M. J., SJOLANDER, K. V., KARLAK, B., KEJARIWAL, A., MI, H., LAZAREVA, B., HATTON, T., NARECHANIA, A., DIEMER, K., MURUGANUJAN, A., GUO, N., SATO, S., BAFNA, V., ISTRAIL, S., LIPPERT, R., SCHWARTZ, R., WALENZ, B., YOOSEPH, S., ALLEN, D., BASU, A., BAXENDALE, J., BLICK, L., CAMINHA, M., CARNES-STINE, J., CAULK, P., CHIANG, Y. H., COYNE, M., DAHLKE, C., MAYS, A., DOMBROSKI, M., DONNELLY, M., ELY, D., ESPARHAM, S., FOSLER, C., GIRE, H., GLANOWSKI, S., GLASSER, K., GLODEK, A., GOROKHOV, M., GRAHAM, K., GROPMAN, B., HARRIS, M., HEIL, J., HENDERSON, S., HOOVER, J., JENNINGS, D., JORDAN, C., JORDAN, J., KASHA, J., KAGAN, L., KRAFT, C., LEVITSKY, A., LEWIS, M., LIU, X., LOPEZ, J., MA, D., MAJOROS, W., MCDANIEL, J., MURPHY, S., NEWMAN, M., NGUYEN, T., NGUYEN, N., NODELL, M., PAN, S., PECK, J., PETERSON, M., ROWE, W., SANDERS, R., SCOTT, J., SIMPSON, M., SMITH, T., SPRAGUE, A., STOCKWELL, T., TURNER, R., VENTER, E., WANG, M., WEN, M., WU, D., WU, M., XIA, A., ZANDIEH, A. und ZHU, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291** (5507): 1304-51.
- VOO, K. S., CARLONE, D. L., JACOBSEN, B. M., FLODIN, A. und SKALNIK, D. G. (2000). Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1. *Mol. Cell Biol.* **20** (6): 2108-21.
- WALKER, G. T., LINN, C. P. und NADEAU, J. G. (1996). DNA detection by strand displacement amplification and fluorescence polarization with signal enhancement using a DNA binding protein. *Nucleic Acids Res.* **24** (2): 348-53.
- WALKER, I. H., HSIEH, P. C. und RIGGS, P. D. (2010). Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88** (1): 187-97.

- WARSEN, A. E., KRUG, M. J., LAFRENTZ, S., STANEK, D. R., LOGE, F. J. und CALL, D. R. (2004). Simultaneous discrimination between 15 fish pathogens by using 16S ribosomal DNA PCR and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (7): 4216-21.
- WATSON, J. D. und CRICK, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171** (4356): 737-8.
- WEBER, K. und OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244** (16): 4406-12.
- WEISS, M. A., ELLENBERGER, T., WOBBE, C. R., LEE, J. P., HARRISON, S. C. und STRUHL, K. (1990). Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA. *Nature* **347** (6293): 575-8.
- WIGLEY, D. B., DAVIES, G. J., DODSON, E. J., MAXWELL, A. und DODSON, G. (1991). Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* **351** (6328): 624-9.
- WITTIG, B., DORBIC, T. und RICH, A. (1991). Transcription is associated with Z-DNA formation in metabolically active permeabilized mammalian cell nuclei. *PNAS U S A* **88** (6): 2259-63.
- WOLFE, S. A., GREISMAN, H. A., RAMM, E. I. und PABO, C. O. (1999). Analysis of zinc fingers optimized via phage display: evaluating the utility of a recognition code. *J. Mol. Biol.* **285** (5): 1917-34.
- WOLFE, S. A., NEKLUDOVA, L. und PABO, C. O. (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**: 183-212.
- WOODGATE, J., PALFREY, D., NAGEL, D. A., HINE, A. V. und SLATER, N. K. (2002). Protein-mediated isolation of plasmid DNA by a zinc finger-glutathione S-transferase affinity linker. *Biotechnol. Bioeng.* **79** (4): 450-6.
- WORCEL, A. und BURGI, E. (1972). On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **71** (2): 127-47.
- WRIGHT, C., WILLAN, K. J., SJODAHL, J., BURTON, D. R. und DWEK, R. A. (1977). The interaction of protein A and Fc fragment of rabbit immunoglobulin G as probed by complement-fixation and nuclear-magnetic-resonance studies. *Biochem J.* **167** (3): 661-8.
- WU, H., YANG, W. P. und BARBAS, C. F., 3RD (1995). Building zinc fingers by selection: toward a therapeutic application. *PNAS U S A* **92** (2): 344-8.
- YAM, C. M., DELUGE, M., TANG, D., KUMAR, A. und CAI, C. (2006). Preparation, characterization, resistance to protein adsorption, and specific avidin-biotin binding of poly(amidoamine) dendrimers functionalized with oligo(ethylene glycol) on gold. *J. Colloid Interface Sci.* **296** (1): 118-30.
- YANG, W. P., WU, H. und BARBAS, C. F., 3RD (1995). Surface plasmon resonance based kinetic studies of zinc finger-DNA interactions. *J. Immunol. Methods* **183** (1): 175-82.
- YANG, Y. und AMES, G. F. (1988). DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. *PNAS U S A* **85** (23): 8850-4.
- YAO, S., BARLOW, W. E., ALBAIN, K. S., CHOI, J. Y., ZHAO, H., LIVINGSTON, R. B., DAVIS, W., RAE, J. M., YEH, I. T., HUTCHINS, L. F., RAVDIN, P. M., MARTINO, S., LYSS, A. P., OSBORNE, C. K., ABELOFF, M., HORTOBAGYI, G. N., HAYES, D. F. und AMBROSONE, C. B. (2010). Gene polymorphisms in cyclophosphamide metabolism pathway, treatment-related toxicity, and disease-free survival in SWOG 8897 clinical trial for breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16** (24): 6169-76.
- YOKONO, M., SAEGUSA, N., MATSUSHITA, K. und SUGIURA, Y. (1998). Unique DNA binding mode of the N-terminal zinc finger of transcription factor Sp1. *Biochemistry* **37** (19): 6824-32.
- ZHANG, X. E. und BI, L. J. (2007). Protein chip for detection of DNA mutations. *Methods Mol. Biol.* **382**: 163-76.

-
- ZHAO, W., ALI, M. M., BROOK, M. A. und LI, Y. (2008). Rolling circle amplification: applications in nanotechnology and biodetection with functional nucleic acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47** (34): 6330-7.
- ZHOU, J., NAGARKATTI, P. S., ZHONG, Y., ZHANG, J. und NAGARKATTI, M. (2011). Implications of single nucleotide polymorphisms in CD44 exon 2 for risk of breast cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* **20** (5): 396-402.

VI ANHANG

A Zusammenfassung

Methoden zur direkten Detektion oder Anreicherung von doppelsträngiger DNA (dsDNA) bieten ein hohes Potential zum Einsatz in der molekularen Diagnostik. Bereits etablierte Methoden für die Nukleinsäure - Detektion (NAD) basieren in der Regel auf der Hybridisierung des komplementären Stranges gefolgt von der optischen Detektion oder enzymatischer Amplifikation. DNA - bindende oder organisierende Proteine (z.B. endogene Transkriptionsfaktoren) bieten im Kontrast zu den Hybridisierungsreaktionen eine überaus interessante Alternative um dsDNA direkt und zugleich spezifisch zu detektieren oder diese aus einem komplexen Gemisch heraus anzureichern.

Im Rahmen der Entwicklung von neuartigen NAD - Assays zur direkten Detektion oder Anreicherung von Nukleinsäuren wurden vier DNA - bindende Proteine kloniert und in HEK293 und *E. coli* exprimiert. Der Cys₂His₂ - Zinkfinger (ZFD) vom humanen Transkriptionsfaktor Sp1 wurde mit MBP und 9×Lys - MBP fusioniert. Das MBP - Derivat 9×Lys - MBP ist eine erweiterte Variante mit neun aufeinanderfolgenden Lysinen im N - terminalen Bereich, welche eine regioselektive Immobilisierung ermöglichen soll. Der humane Sp3 - ZFD wurde mit EGFP fusioniert. Die Mitglieder der Sp - Familie binden spezifisch die Konsensussequenz 5' - GGG GCG GGG - 3' (GC - Box). Zusätzlich wurde die C - terminale DNA - bindende Domäne der *E. coli* DNA - Gyrase Untereinheit A (*gyrA* - CTD) ebenfalls mit MBP fusioniert. Die Domäne bindet spezifisch repetitive extragene Palindrome (REP), welche bislang nur auf bakteriellen Chromosomen vorkommen. Sämtliche MBP - Fusionsproteine liegen nach der Expression löslich vor und konnten über eine native Strategie aufgereinigt werden.

Transiente Transfektionsexperimente in HEK293 zeigten einen destabilisierenden Effekt der Sp3 - ZFD und eine massive einhergehende Degradierung des EGFP - Fusionsproteins nach 120 h. Die Analyse der mRNA - Integrität nach Transfektion des Expressionsplasmids, sowie zellbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen mit Durchflusszytometrie bzw. Western Blots deuten auf eine posttranslationale Modulation von EGFP - Sp3 hin. Um die Hypothese der proteasomalen Degradierung von EGFP - Sp3 zu belegen, wurden transfizierte HEK293 mit dem reversiblen Proteasominhibitor MG132 behandelt. In Gegenwart von 1 µM MG132 konnte das zytosolische Fusionsprotein stabilisiert werden. Die hier präsentierten Daten offenbaren die humane Sp3 - ZFD als ein neues Substrat für das 26S - Proteasom. Lediglich die SUMOylierung von Wildtyp - Sp3 im Bereich der inhibitorischen Domäne (ID) ist bislang beschrieben worden.

Die Funktionalität, Affinität und kinetische Parameter der mit MBP fusionierten Sp1 - ZFD und *gyrA* - CTD wurden anhand von Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore) bzw. EMSAs analysiert. Sämtliche gewonnenen MBP - Fusionsproteine sind funktionell und interagieren mit dsDNA. Fusionsproteine mit Sp1 - Domäne zeigten in EMSAs ebenso eine Bindung an unspezifische dsDNA. In sensitiveren BIAcore - Assays mit immobilisierter dsDNA wurden (um den Faktor 2) geringere Assoziations (k_a) - und Dissoziationsraten (k_d) von MBP - Sp1 ermittelt, wenn bestimmte Basen innerhalb der GC - Box ausgetauscht wurden. Die Affinität (K_d) von MBP - Sp1 mit 4×10^{-9} M zur GC - Box und deren Derivate ist vergleichbar mit der K_d von nativem Sp1. Die EMSA - Experimente für MBP - *gyrA* zeigen eine deutliche Präferenz zum spezifischen dsDNA - Oligo in Gegenwart von humaner gDNA, eine interessante Eigenschaft die durchaus zur Anwendung in einem Assay zur Anreicherung von bakterieller DNA dienen kann.

Nach der vorausgehenden Charakterisierung der MBP - Fusionsproteine wurden diese auf verschiedenen gängigen festen und semifesten Substraten über physische Adsorption, kovalent oder Affinität immobilisiert um das Konzept der direkten Detektion von dsDNA mit funktionellen Proteinen als neuartige Komponente in NAD - Assays umzusetzen. Lediglich MBP - Sp1 zeigte auf Glas und Polystyren - Mikrotiterplatten nach kovalenter oder adsorptiver Immobilisierung eine ausgeprägte Funktionalität hinsichtlich der Bindung von dsDNA. Die Immobilisierung von 9×Lys - MBP - Sp1 über identische Strategien führten zum massiven Verlust der ZFD - Funktion. Aus dieser Datenlage heraus wurde erfolgreich ein simples Lumineszenz - basiertes Mikrotiterplatten - Assay mit MBP - Sp1 entwickelt um PCR - Amplikons direkt aus einer analytischen PCR auf gDNA von *S. aureus*, welche die GC - Box beinhalten, nachzuweisen. Das spezifische Amplikon konnte mittels des simplen Assays in Gegenwart von 100fachem Überschuss an humaner gDNA nachgewiesen werden. Mit einem höheren Anteil an humaner gDNA wurde die PCR massiv inhibiert, ein negativer Effekt der bislang im Bereich der diagnostischen NAD - Assays nicht optimal adressiert wurde.

Die magnetische Separation von bakterieller und humaner gDNA wurde dazu mit MBP - *gyrA* umgesetzt. Zunächst erfolgte die regioselektive Immobilisierung von MBP - *gyrA* auf Protein A - funktionalisierte magnetische Nanopartikel mittels MBP - Antikörper, wodurch die Funktionalität hinsichtlich der Bindung von dsDNA gewährleistet werden konnte. Dieses System eignet sich insbesondere für die Separation von bakterieller DNA (*E. coli* oder *S. aureus*) aus einem komplexen Gemisch mit bis zu 100fachem Überschuss an humaner gDNA. Die Kombination von MBP - *gyrA* - basierter magnetischer Separation mit NAD - Assays könnte deren Sensitivität signifikant erhöhen. Durch simple Verfahrensweise bietet das System einen wesentlichen Beitrag zur Verringerung des zeitlichen Aufwands für die Generierung therapierelevanter Resultate.

B Abstract

Methods for direct detection or enrichment of double - stranded DNA (dsDNA) possess tremendous potential for use in molecular diagnostics. Already established methods for nucleic acid detection (NAD) are generally based on the hybridization of two complementary strands followed by optical detection or enzymatic amplification. In contrast, DNA - binding or organizing proteins (e.g. endogenous transcriptions factors) are able to read the sequence information directly from dsDNA without prior denaturation of the double strand and subsequent hybridization.

In order to develop novel NAD assays or assays for sample preparation, four artificial DNA - binding proteins were cloned, expressed and purified in HEK293 cells or *E. coli*. The Cys₂His₂ zinc finger domains (ZFD) from human Sp1 were fused to maltose binding protein (MBP) and its derivate 9×Lys - MBP, an extended variant with nine successive lysine residues in the N - terminal region of the protein to facilitate site - directed immobilization. The human Sp3 - ZFD was fused to green fluorescent protein (EGFP). The family of Sp - transcription factors was known to bind specifically the consensus sequence 5' - GGG GCG GGG - 3 '(GC - box). Moreover, the C - terminal DNA - binding domain of *E. coli* DNA Gyrase subunit A (*gyrA* - CTD) was fused to MBP. The CTD binds specifically repetitive extragenic palindromes (REP), which were only found on prokaryotic chromosomes. All MBP fusion proteins were soluble after expression and could be purified to homogeneity.

Surprisingly, transient transfection experiments in HEK293 revealed a destabilizing effect of the Sp3 - ZFD accompanied by massive degradation of the EGFP fusion protein after 120 h post transfection. Analysis of mRNA integrity in combination with western blots indicates a posttranslational modulation of EGFP - Sp3. To confirm the hypothesis of proteasomal degradation of EGFP - Sp3, transfected cells were treated with the reversible proteasome inhibitor MG132. In the presence of 1μM MG132 the fusion protein could be stabilized. Taken together, the data presented here identified the human Sp3 - CTD as a new substrate for the 26S proteasome. Only SUMOylation of wild type human Sp3 within the inhibitory domain (ID) has been described so far.

Initial EMSA experiments showed that purified MBP - ZFD fusion proteins were functional in terms of interacting with dsDNA containing the specific sequence motif. However, all proteins bound to unspecific dsDNA as well. Therefore MBP - Sp1 was subjected to BIAcore analysis to determine the rate constants for association k_a , dissociation k_d and the dissociation constant K_d of the GC - Box - Protein complex as well as mutants of the GC - Box. The determined K_d (4×10^{-9} M) for MBP - Sp1 associated with GC - box or its derivatives were found to be comparable with the K_d of native Sp1, however the rate constants were reduced 2 fold in presence of the modified GC - boxes. EMSA experiments with MBP - *gyrA* revealed functionality and a clear preference for specific dsDNA in the presence of unspecific human genomic DNA (gDNA).

After preliminary functional characterization, MBP fusion proteins were immobilized by physical adsorption, covalent or by affinity on various solid substrates or nanoscaled magnetic beads to implement the concept of direct detection of dsDNA or specific enrichment of bacterial DNA, respectively. MBP - Sp1 remains functional after adsorptive or covalent immobilization on different chemical modified glass surfaces. 9×Lys - MBP - Sp1 shows significantly reduced functionality after immobilization on the same glass substrates by similar strategies. Moreover, a simple NAD - assay with adsorptive immobilized MBP - Sp1 on polystyrene in microtiter format was established for direct detection of GC - boxes within PCR - products from *S. aureus* gDNA. By using the assay, specific PCR - products could be detected in presence up to 100 - fold excess of human gDNA in relation to 10 ng bacterial DNA.

Separation of bacterial DNA from human DNA from clinical samples may have an important impact on downstream applications, involving NAD assays. To address this often underestimated technical problem, a new functional protein MBP - *gyrA* was introduced to overcome some limitations of already established methods. MBP - *gyrA* was site - directed coupled on nanoscaled magnetic beads by affinity. This system enabled the fast and specific separation of gDNA of *E. coli* or *S.aureus* from a huge background of human gDNA. The combination of MBP - *gyrA* - based magnetic separation with NAD assays could significantly increase the sensitivity and shorten the time for initiation of effective treatment.

C Ergänzende Daten

C1 Proteinsequenzen

MBP - Sp1 (488 AS; $M_w = 54,18$ kDa; theoretischer pI 8,68)

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MKIEEGKLV	WINGDKGYNG	LAEVGGKFEK	DTGIKVTVEH	PDKLEEKFPQ	VAATGDGPDI
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
IFWAHDRFGG	YAQSGLLAEI	TPDKAFQDKL	YPFTWDAVRY	NGKLIAYPIA	VEALSLIYNK
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
DLLPNPPKTW	EEIPALDKEL	KAKGKSALMF	NLQEPYFTWP	LIAADGGYAF	KYENGGYDIK
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
DVGVDNAGAK	AGLTFVLVDLI	KNKHMNADTD	YSIAEAAFNK	GETAMTINGP	WAWSNIDTSK
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
VNYGVTVLPT	FKGQSPKPFV	GVLSAGINAA	SPNKELAKEF	LENYLLTDEG	LEAVNKDKPL
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
GAVALKSYEE	ELAKDPRIAA	TMENAQKGEI	MPNIPQMSAF	WYAVRTAVIN	AASGRQTVDE
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
ALKDAQTNSS	SNNNNNNNNN	NLGIEGRGDP	GKKKQHICHI	QGCGKVVYKGT	SHLRAHLRWH
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	<u>480</u>
TGERPFMCTW	SYCGKRFTRS	DELQRHKRTH	TGEKKFACPE	CPKRFMRSDH	LSKHIKTHQN

KKGGPGVA *

9xLys - MBP - Sp1 (496 AS; $M_w = 55,19$ kDa; theoretischer pI 9,16)

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MKKKKKKKKK	IEEGKLVIIWI	NGDKGYNGLA	EVGKKFEKDT	GIKVTVEHPD	KLEEKFPQVA
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
ATGDGPDIIF	WAHDRFGGYA	QSGLLAEITP	DKAFQDKLYP	FTWDAVRYNG	KLIAYPIAVE
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
ALSLIYNKDL	LPNPPKTWEE	IPALDKELKA	KGKSALMFNL	QEPYFTWPLI	AADGGYAFKY
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
ENGYDIKDV	GVDNAGAKAG	LTFLVDLIKN	KHMNADTDYS	IAEAAFNKGE	TAMTINGPWA
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
WSNIDTSKVN	YGVTVLPTFK	GQPSKPFVGV	LSAGINAASP	NKELAKEFLE	NYLLTDEGLE
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
AVNKDKPLGA	VALKSYEEEL	AKDPRIAAATM	ENAQKGEIMP	NIPQMSAFWY	AVRTAVINAA
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
SGRQTVDEAL	KDAQTNSSSN	NNNNNNNNNL	GIEGRGDPGK	KKQHICHIQG	CGKVVYKGTSH
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	<u>480</u>
LRAHLRWH TG	ERPFMCTWSY	CGKRFTRSDE	LQRHKRTH TG	EKKFACPECP	KRFMRSDHLS
<u>490</u>					

KHIKTHQNKK GGPGVA *

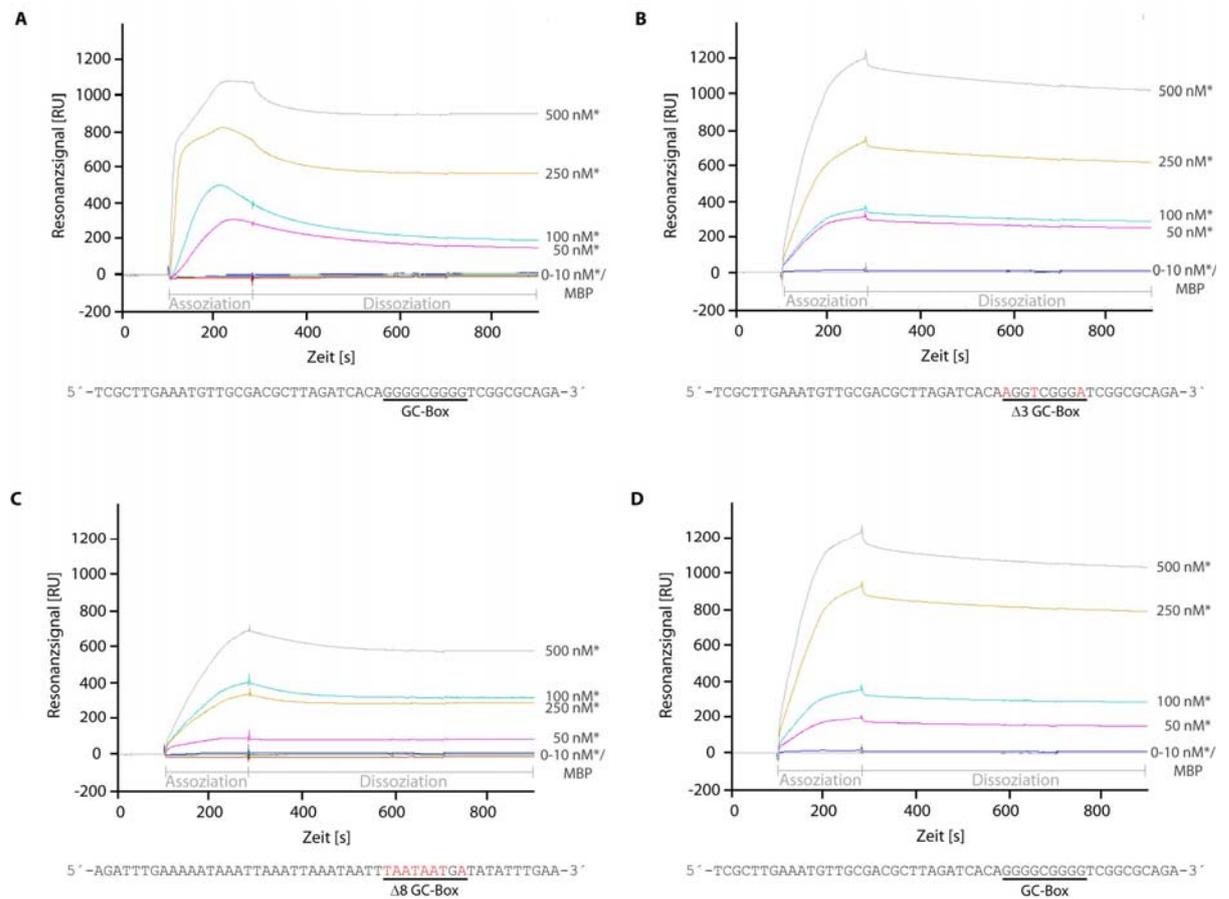
EGFP - Sp3 (343 AS; $M_w = 39,53$ kDa; theoretischer pI 9,73)

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MVSKGEELEFT	GVVPGRRRKR	PQVQRRRGR	ASWSSGDATY	GKLTCLKFICT	TGKLPVPWPT
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
LVTTLTYGVQ	CFSRYPDHMK	QHDFPKSAMP	EGYVQERTIF	FKDDGNYKTR	AEVKFEGDTL
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
VNRIELKGID	FKEDGNILGH	KLEYNYNESH	VYIMADKQKN	GIKVNFKIRH	NIEDGSVQLA
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
DHYQQNTPIG	DGPVLLPDNH	YLSTQSALSK	DPNEKRDH MV	LLEFVTAAGI	TLGMDELYKS
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
GLRSRGTNLG	KKKQHICHIP	GCGKVVYKTS	HLRAHLRWHS	GERPFVCNWM	YCGKRFTRSD
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>		
ELQRHRRHTH	GEKKFVCEPC	SKRFMRSDHL	AKHIKTHQNK	KGI *	

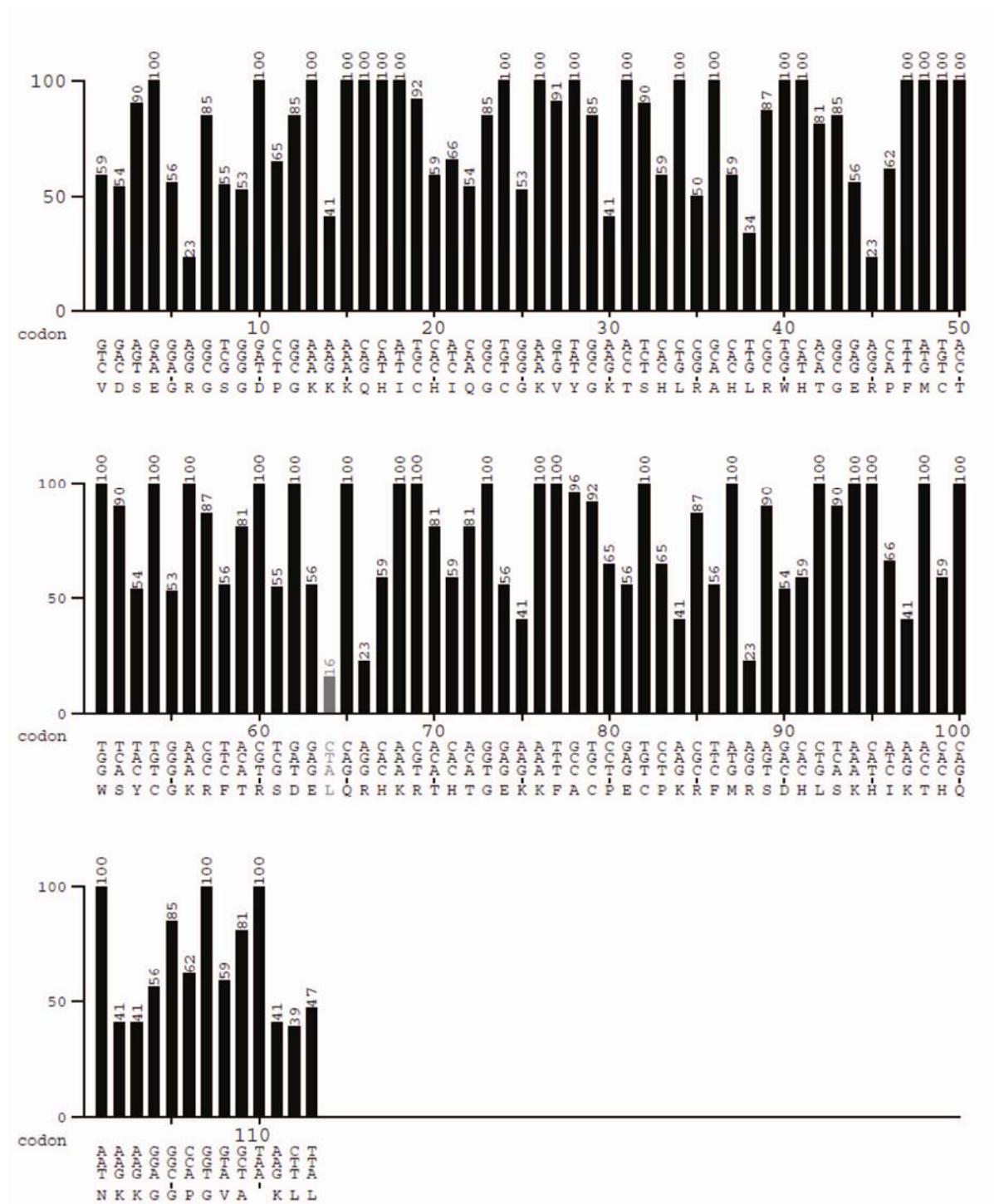
MBP - *gryA* (688 AS; $M_w=75,15$ kDa); theoretischer pI 4,87)

10	20	30	40	50	60
MKIEEGKLV	WINGDKGYNG	LAEVGKKFEK	DTGIKVTVEH	PDKLEEKFPQ	VAATGDGPDI
70	80	90	100	110	120
IFWAHDFRFG	YAQSGLLAEI	TPDKAFQDKL	YPFTWDAVR	NGKLIAYPIA	VEALSIIYNK
130	140	150	160	170	180
DLLPNPKTW	EEIPALDKEL	KAKGKSALMF	NLQEPYFTWP	LIAADGGYAF	KYENGYDIK
190	200	210	220	230	240
DVGVDNAGAK	AGLTFVLVDLI	KNKHMNADTD	YSIAEAAFNK	GETAMTINGP	WAWSNIDTSK
250	260	270	280	290	300
VNYGVTVLPT	FKGQPSKPFV	GVLSAGINAA	SPNKELAKEF	LENYLLTDEG	LEAVNKDKPL
310	320	330	340	350	360
GAVALKSYYE	ELAKDPRIAA	TMENAQKGEI	MPNIPQMSAF	WYAVRTAVIN	AASGRQTVDE
370	380	390	400	410	420
ALKDAQTNSS	SNNNNNNNMN	NLGRIKEEDF	IDRLLVANTH	DHILCFSSRG	RVYSMKVYQL
430	440	450	460	470	480
PEATRGARGR	PIVNLPLEQ	DERITAILPV	TEFEEGVKVF	MATANGTVKK	TVLTFEFNRLR
490	500	510	520	530	540
TAGKVAIKLV	DGDELIGVDL	TSGEDEVMLF	SAEGKVVRFK	ESSVRAMGCN	TTGVRGIRLG
550	560	570	580	590	600
EGDKVVSLIV	PRGDGAILTA	TQNGYGKRTA	VAEYPTKSRA	TKGVISIKVT	ERNGLVVGAV
610	620	630	640	650	660
QVDDCDQIMM	ITDAGTLVRT	RVSEISIVGR	NTQGVILIRT	AEDENVVGLQ	RVAEPVDEED
670	680				
LDTIDGSAAE	GDDEIAPEVD	VDDEPEEE*			

C2 Sensogramme der SPR - Assays zu MBP - Sp1



C3 Übersicht der Codon - Präferenz von *E. coli* K12 für Sp1 - ZFD



D Abkürzungsverzeichnis

Akronym	Bedeutung
AK	Antikörper
APTES	3 - Aminopropyltriethoxysilan
AS	Aminosäure
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BS ³	<i>Bis</i> (sulfosuccinimidyl)suberat
Btn	Biotin
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> , immortalisierte Zelllinie aus den Ovarien des Hamsters
CMD5	Carboxymethyl-dextran, Höhe 50 nm
CTD	C - terminale Domäne
Cys	Cystein
DEPC	Diethyl-dicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double - stranded DNA</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Disuccinimidylsuberat
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1 - Ethyl - 3 - (3 - dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Rinderserum)
FM	<i>full match</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd - 3 - phosphat - Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA (<i>genomic DNA</i>)
GST	Gluthation-S-Transferase
gyrA	<i>E. coli</i> DNA - Gyrase, Untereinheit A
HEK293	<i>human embryonic kidney</i> , immortalisierte humane Nieren - Zelllinie
HEPES	2 - (4 - (2 - Hydroxyethyl) - 1 - piperazinyl)ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettich - Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
ID	Inhibitorische Domäne, Sequenzabschnitt für posttranslationale Modifikationen
IgG	Immunglobulin G
Lys	Lysin
MBP	Maltose - bindendes Protein (<i>maltose - binding protein</i>)
MES	2 - (N - Morpholino) ethansulfonsäure
NHS	N - Hydroxysuccinimid
n.d.	nicht detektierbar
NFAT	<i>Nuclear Factor of activated T - cells</i>
NM	<i>no match</i>
NTD	N - terminale Domäne
PBS	Phosphat - gepufferte Salzlösung (<i>phosphate - buffered saline</i>)
PCR	Polymerase - Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
POC	<i>point of care</i>
PS	Polystyren
REP	repetitive extragene Palindrome (<i>repetitive extragenic palindrome</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single - stranded DNA</i>)
TMB	3,3',5,5' - Tetramethylbenzidin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phospin-HCl
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pen/ Strep	Penicillin/ Streptomycin
SA	Streptavidin
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium laureth sulphate</i>)
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz)
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure (<i>single stranded ribonucleic acid</i>)
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SUMO	<i>small Ubiquitin like modifier</i>
TAE - Puffer	Tris/Acetat/EDTA/Puffer
<i>Taq</i> - Polymerase	DNA - Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
Tn5	bakterielles Transposon 5
TTBS	Tris - gepufferte Salzlösung mit Tween20 (<i>Tris - buffered saline with Tween20</i>)
wt	Wildtyp (<i>wild type</i>)
ZF	Zinkfinger vom Typ Cys ₂ His ₂ (<i>zinc finger</i>)
ZFD	Zinkfinger - Domäne (<i>zinc finger domain</i>)

E Symbole und Einheiten

Symbol oder Einheit	Bedeutung
bp	Basenpaare (1 bp entspricht $M_r = 654 \text{ g mol}^{-1}$)
v/ v	Volumenverhältnis
w/ v	Verhältnis Masse zu Volumen
Da	Dalton (Molekulargewicht von Proteinen)
kDa	Kilo - Dalton
OD	Optische Dichte
U/ min	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (22 °C)
k_a	Assoziationsgeschwindigkeit ($M^{-1} s^{-1}$)
k_d	Dissoziationsgeschwindigkeit (s^{-1})
K_d	Dissoziationskonstante (M)
RU	<i>resonance unit</i> (dimensionslose Einheit für SPR - Signale)
Δ	griech. delta, Änderung einer physikalischen Messgröße

F Danksagung

Die Seite 111 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

G Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Einzelexperimente der BIAcore – Messungen, Detektion der PCR-Produkte mit ZF und des Gyrase-Assays wurden im Rahmen von Bachelor und Diplomarbeiten durchgeführt die durch mich betreut wurden. Im Falle einer Ablehnung werde ich meine Dissertation nur unter Hinweis auf diese Ablehnung für ein anderes Examen verwenden.

Andreas Naumann

Leipzig, Oktober 2013

H Publikationen

Zeitschriftenartikel

LINDNER I., HEMDAN N.Y., BUCHOLD M., HUSE K., BIGL M., OERLECKE I., RICKEN A., GAUNITZ F., SACK U., **NAUMANN A.**, HOLLBORN M., THAL D., GEBHARDT R., BIRKENMEIER G. Alpha2 - Macroglobulin inhibits the malignant properties of astrocytoma cells by impeding beta-Catenin signaling. *Cancer Research*, v. 70 (2010), no. 1, p. 277-287.

ALLELEIN A., KUHLMEIER D., and **NAUMANN A.** The use of zinc finger in the molecular diagnostic of Staphylococcus aureus. *Manuscript in preparation*

SCHNEIDER H., SEDAGHATI B., **NAUMANN A.**, HACKER M. C., SCHULZ-SIEGMUND M. Gene silencing of Chordin improves BMP-2 effects on osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Engineering, Part A* (2013)

Posterbeiträge

ALLELEIN S., KUHLMEIER D., **NAUMANN A.**

The use of zinc fingers in molecular diagnostics

45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik (DGBMT), Freiburg 2011

ALLELEIN S., KUHLMEIER D., **NAUMANN A.**

The use of zinc fingers in molecular diagnostics

World Congress of Regenerative Medicine, Leipzig 2011

Patentanmeldungen

KUHLMEIER D., **NAUMANN A.**, SANDETSKAYA N., HENNIG K.,

Erfindungsmeldung 11F52468

"Methode zur Isolation von Nukleinsäuren" *patent pending*

I Curriculum Vitae

Die Seite 114 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.