

Untersuchungen an Komplexen von H1 mit Mononukleosomen und freier DNA

Diplomarbeit

vorgelegt der Fakultät für Biologie
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Jochen Felix Kepert

2001

Die vorliegende Arbeit wurde im Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg in der Abteilung Biophysik der Makromoleküle in der Zeit vom 02.04.01 bis 10.12.01 unter Anleitung von PD Dr. Karsten Rippe ausgeführt.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Karsten Rippe für die stets freundliche und hilfreiche Betreuung dieser Arbeit. Seine fachlichen Ratschläge und seine aufmunternde Art haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Jörg Langowski für die wissenschaftliche Unterstützung, die guten Arbeitsbedingungen und die freundliche Übernahme des Koreferats.

Für die hilfreiche Unterstützung bei diversen Laborarbeiten, sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bei Natalie Brun, Dr. Katalin Fejes Tóth und Sabine Vogel bedanken.

Mein besonderer Dank für ihre wertvollen Ratschläge beim Korrekturlesen und der damit verbundenen Arbeit gilt Dr. Alexandra Schulz.

Bei Norbert Mücke möchte ich mich speziell für die Einarbeitung in die Technik der Rasterkraftmikroskopie sowie für die zahlreichen gewinnbringenden Diskussionen bedanken.

Allen ungenannten Mitarbeitern der Abteilung H0500 danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Referent: PD Dr. Karsten Rippe

Institut: Deutsches Krebsforschungszentrum, Abt. Biophysik der Makromoleküle

Korreferent: Prof. Dr. Jörg Langowski

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig unter Anleitung verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

10.12.01

Unterschrift

"It's a long way to the top (if you wanna rock'n roll)"

ACDC (1976)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| I. Einleitung | 5 |
| 1. Das Linker-Histon H1 | 5 |
| 2. Die 30-nm-Chromatinfiber | 8 |
| 3. Histonmodifikationen und Genregulation | 11 |
| 4. Zielsetzung | 13 |
| II. Material und Methoden..... | 15 |
| 1. Probenherstellung und Aufreinigung | 15 |
| 1.1 Herstellung des DNA-Fragmentes mittels PCR | 15 |
| 1.2 HPLC-Aufreinigung der DNA..... | 16 |
| 1.3 Gelextraktion aus Agarosegelen | 17 |
| 1.4 Nukleosomen-Rekonstitution..... | 19 |
| 2. Charakterisierung der Protein- und DNA-Proben | 22 |
| 2.1 Native Polyacrylamidgele | 22 |
| 2.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)..... | 23 |
| 2.3 Western Blot | 24 |
| 3. Analytische Ultrazentrifugation..... | 25 |
| 3.1 Theoretische Grundlagen..... | 25 |
| 3.2 Experimente Gleichgewichtssedimentationslauf | 27 |
| 4. Fluoreszenzanisotropie (FA)..... | 29 |
| 4.1 Theorie..... | 29 |
| 4.2 Fluoreszenzanisotropiemessungen | 32 |
| 5. Rasterkraftmikroskopie (SFM) | 34 |
| 5.1 Probenpräparation: | 37 |
| III. Ergebnisse | 39 |
| 1. Protein- und Probencharakterisierung | 39 |

| | |
|--|----|
| 1.1 DNA-Probencharakterisierung..... | 39 |
| 1.2 SDS-Gelelektrophorese des Linker-Histons H1 | 39 |
| 1.3 Western Blot des Linker-Histons H1..... | 41 |
| 1.4 Charakterisierung der rekonstituierten Nukleosomen | 41 |
| 2. Analytische Ultrazentrifugation | 42 |
| 3. Fluoreszenzanisotropie..... | 47 |
| 3.1 Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindung von Histon H1 an freie DNA..... | 47 |
| 4. Rasterkraftmikroskopie | 49 |
| 4.1 Bestimmung der Länge der freien DNA..... | 50 |
| 4.2 Charakterisierung von rekonstituierten Mononukleosomen | 51 |
| IV. Diskussion | 57 |
| 1. Protein- und Probencharakterisierung..... | 57 |
| 1.1 Analyse von H1 durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot..... | 57 |
| 1.2 Darstellung der rekonstituierten Nukleosomen auf nativen PAA-Gelen..... | 58 |
| 2. Stöchiometrie der H1-DNA-Komplexe | 59 |
| 3. Fluoreszenzanisotropiemessungen der Bindung von H1 an DNA..... | 60 |
| 4. Rasterkraftmikroskopie | 62 |
| 4.1 Konturlänge der freien DNA | 62 |
| 4.2 Strukturparameter der Mononukleosomen..... | 63 |
| 5. Ausblick..... | 68 |
| V. Literaturverzeichnis | 70 |
| VI. Zusammenfassung | 75 |

Verzeichnis der Abbildungen

| | |
|---|----|
| Abb. 1.1: Verschiedene Modelle zur Lage des Linker-Histons am Nukleosom | 6 |
| Abb. 1.2: Die Nukleosom-Linker-Nukleosom Einheit | 8 |
| Abb. 1.3: Verschiedene Chromatindarstellungen nach dem Zick-Zack Modell | 9 |
| Abb. 1.4: Skizze des Solenoidmodell..... | 10 |
| Abb. 2.1: Beobachtung der Fluoreszenzanisotropie..... | 30 |
| Abb. 2.2: Beschreibung der räumlichen Lage des Fluoreszenzdipols im Raum | 31 |
| Abb. 2.3 Aufbau des SLM 8100 von der Firma Aminco (Rochester, N.Y.)..... | 32 |
| Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Laserprojektion im Rasterkraftmikroskop | 34 |
| Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Auflösungsvermögen im Rasterkraftmikroskop .. | 35 |
| Abb. 2.6: Darstellung der Flüssigkeitsmesszelle im Rasterkraftmikroskop | 36 |
| Abb. 3.1: SDS-PAA Gel von H1..... | 40 |
| Abb. 3.2: H1 Western Blot..... | 40 |
| Abb. 3.3: Natives PAA-Gel von rekonstituierten Nukleosomen | 41 |
| Abb. 3.4: Absorptionsprofil einer Probenzelle in der AUZ | 42 |
| Abb. 3.5: Molekulargewicht des H1-DNA Komplexes..... | 44 |
| Abb. 3.6: Anteil der freien DNA im Gleichgewichtssedimentationslauf..... | 44 |
| Abb. 3.7: Konzentrationsverteilung der Probe 3 angepasst mit verschiedenen Modellen ... | 46 |
| Abb. 3.8: Konzentrationsverteilung der Probe 4 angepasst mit verschiedenen Modellen ... | 47 |
| Abb. 3.9: H1 Anisotropie Titration..... | 48 |
| Abb. 3.10: Rasterkraftmikroskopiebilder von Mononukleosomen..... | 49 |
| Abb. 3.11: DNA-Konturlängenverteilung von HPLC aufgereinigten DNA-Fragmenten.... | 50 |
| Abb. 3.12: DNA-Konturlängenverteilung von Gel aufgereinigten DNA-Fragmenten | 51 |
| Abb. 3.13: Position der gebundenen Nukleosomen..... | 53 |
| Abb. 3.14: Verteilung der Konturlängen von Mononukleosomen..... | 54 |
| Abb. 3.15: Ein- und Austrittswinkel an Mononukleosomen | 55 |

I. Einleitung

Die DNA in einer menschlichen Zelle hat eine Gesamtlänge von ca. 2 m. In der Zelle befindet sich die DNA im Zellkern, dem Nukleus, der typischerweise einen Durchmesser von 10 bis 15 μm besitzt. Die DNA kommt im Nukleus in verschiedenen stark kompaktierten Zuständen vor. Diese kondensierte und mit zahlreichen Proteinen assoziierte DNA bezeichnet man als Chromatin. Der erste Schritt der Kompaktierung der DNA wird durch das Binden der Histonproteine erreicht. Die Histonproteine stellen eine in der Evolution hoch konservierte Proteinfamilie dar (van Holde, 1989). Sie sind reich an basischen Aminosäuren, die bei physiologischen pH-Werten Kontakt zu den negativ geladenen Phosphaten der DNA aufnehmen können (van Holde, 1989). Je zwei Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 bilden einen sogenannten Oktamerkomplex, um den sich eine 146 Basenpaar (Bp) lange DNA-Sequenz in etwa zwei Windungen herumwickelt. Der Komplex aus dem Histonoktamer und der DNA wird als Nukleosom bezeichnet. Die Struktur des Nukleosoms ist durch Röntgenstrukturanalysen mit atomarer Auflösung bekannt (Luger *et al.*, 1997). Es hat eine zylindrische Form mit ca. 10 nm Durchmesser und 5 nm Höhe. Einzelne Nukleosomen sind durch Abschnitte freier DNA miteinander verbunden. Die Nukleosomen-Wiederholungslänge variiert von etwa 160 Bp bei Hefen bis zu 212 Bp in Hühnererythrozyten (van Holde, 1989).

1. Das Linker-Histon H1

Komplettiert wird das Nukleosom durch das Linker-Histon H1, das an das Nukleosom bindet. Die Linker-Histone in den verschiedenen Spezies unterscheiden sich stärker als die anderen Histone. Beim Menschen findet man verschiedene Varianten des Histons H1, während in Hühnererythrozyten noch ein zu H1 funktionell ähnliches Histon H5 vorkommt.

Die Lokalisation von H1 sowie die Anzahl der DNA-Bindungsstellen von H1 sind jedoch noch nicht genau bestimmt worden.

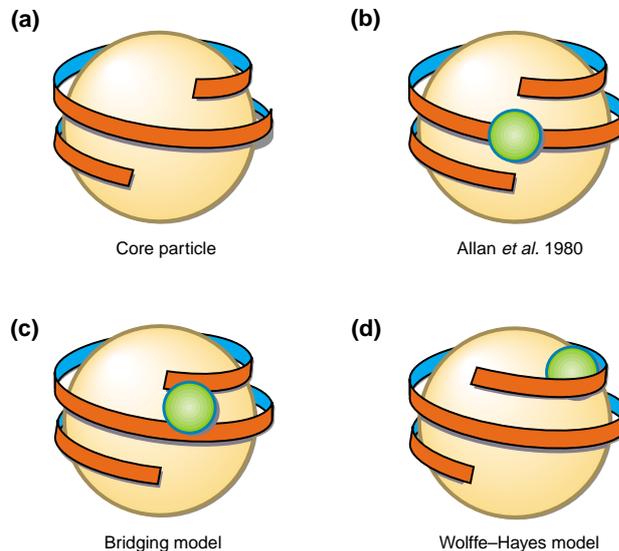


Abb. 1.1: Verschiedene Modelle zur Lage des Linker-Histons am Nukleosom

(A) Der Nukleosomenkernkomplex ist ohne ein Linker-Histon dargestellt. (B) Ein älteres Modell, das eine zentrale Lage der globulären Domäne des Linker-Histons voraussagt. Es wird nur eine DNA-Bindungsstelle angenommen. (C) Das Modell berücksichtigt eine asymmetrische Position im Nukleosom und zwei Bindungsstellen. (D) Das Modell nach Wolffe-Hayes basiert auf Untersuchungen an *Xenopus borealis* 5S rDNA. Es wird eine asymmetrische Lage und nur eine Bindungsstelle vorgeschlagen. Abbildung nach (Travers, 1999).

Ramakrishnan und Mitarbeiter postulieren aufgrund der Röntgenstrukturanalyse der globulären Domäne von Histon H5 zwei DNA-Bindungsstellen (Ramakrishnan *et al.*, 1993). Gelanalysen mit DNA-Kreuzstrukturen und gezielten Mutationen in den DNA-Bindungsdomänen sprechen für diese Vorhersagen (Duggan & Thomas, 2000; Goytisolo *et al.*, 1996; Varga-Weisz *et al.*, 1994). Röntgenstrukturanalysen mit dem C-terminalen Schwanz des Histons H1 lassen auf eine weitere mögliche DNA-Bindungsdomäne in diesem Bereich schliessen (Vila *et al.*, 2000). Aus DNA-Schutzexperimenten ist bekannt, dass das Linker-Histon 20 Bp zusätzlich zu den 146 Bp bindet, die sich um das Nukleosom wickeln (An *et al.*, 1998). Es existieren verschiedene Modellvorstellungen bezüglich der Position der globulären Domäne des Linker-Histons am Nukleosom (Travers, 1999) (Abb. 1.1). Aufgrund von Vernetzungsexperimenten zwischen der globulären Domäne von Histon H5

und nukleosomaler DNA wird das "Bridging" Modell (Abb 1.1 C) favorisiert (Zhou *et al.*, 1998).

Eine weitere wichtige Eigenschaft des Linker-Histons besteht in der Abschirmung der Ladung der DNA. Wie die übrigen Histone sind die Linker-Histone reich an der basischen Aminosäure Lysin. Diese verleihen dem Protein eine positive Gesamtladung. Für menschliches H1 (Variante H1.0), das 56 Lysine besitzt, erhält man eine Nettoladung von +53 bei physiologischem pH. Die meisten Ladungen befinden sich hierbei an den C- und N-terminalen Schwänzen des Histons. Es ist zu erwarten, dass die 40 negativen Phosphatladungen der ca. 20 Bp, an die H1 bindet, fast vollständig abgeschirmt werden. Neben der Neutralisation der Linker-DNA scheint das Histon den Winkel zwischen ein- und austretender DNA am Nukleosom zu stabilisieren. Kryo-elektronenmikroskopische Messungen an Hühnererythrozyten-Chromatin weisen darauf hin, dass das Linker-Histon zusammen mit einem Abschnitt DNA eine stammförmige Struktur bildet ("*stem motif*") (Bednar *et al.*, 1998). Das Linker-Histon und die aus dem Nukleosomen-Kern auslaufende DNA bilden dabei auf etwa 8 nm Länge eine zusammenhängende Einheit.

Das Linker-Histon scheint eine wesentliche Aufgabe bei der weiteren Kompaktierung der DNA zu haben. Untersuchungen an dem Fadenwurm *Ascolobus immersus* ergaben, dass die Inaktivierung des einzigen Gens für das Linker-Histon H1 zu einer erhöhten Nuklease-Sensitivität des Chromatins führte (Ausio, 2000). Dabei ist das Fehlen des Linker-Histons nicht essentiell für das Überleben des Fadenwurms. Es verkürzt jedoch die Lebensspanne des Wurms. Mit steigenden Salzkonzentrationen verringert sich der Winkel zwischen ein- und austretendem DNA-Strang am Nukleosom. Anhand von kryo-elektronenmikroskopischen Messungen wurden von Bednar *et al.* Winkel von 85 ° bei 5 mM monovalenten Kationen (M^+) und 35 ° bei 80 mM M^+ bestimmt (Bednar *et al.*, 1998). Durch die Erhöhung der Salzkonzentration kompaktiert sich die Chromatinfiber. Die Struktur dieser Fiber, die aufgrund ihres Durchmessers als 30 nm Fiber bezeichnet wird, ist seit längerem Gegenstand der Forschung. Um die Konformation von Chromatinfibern zu untersuchen,

wurden bisher vor allem die Techniken der Elektronenmikroskopie, Lichtstreuung, Rasterkraftmikroskopie und analytischen Ultrazentrifugation eingesetzt. Aus den so gewonnenen Daten lassen sich verschiedene Merkmale der Chromatinfiber bestimmen.

2. Die 30-nm-Chromatinfiber

Neben dem charakteristischen Durchmesser von 30 nm ist auch die Massenbelegungsichte der Fiber eine wichtige Größe. Diese kann mittels der Röntgen-, Neutronen- und Lichtstreuung sowie analytischer Ultrazentrifugation bestimmt werden. Bei physiologischen Salzbedingungen (≈ 0.15 M KCl) findet man Werte im Bereich von sechs Nukleosomen je 11 nm Fiber (Campbell *et al.*, 1978; Gerchman & Ramakrishnan, 1987). Das sogenannte Zick-Zack Modell wurde von Woodcock *et al.* basierend auf den bestehenden Daten entworfen (Woodcock *et al.*, 1993). Die Linker-DNA läuft in etwa durch das Zentrum der Fiber. Da in den mikroskopischen Aufnahmen der 30 nm Fiber neben den geordneten Bereichen stets auch ungeordnete Bereiche sichtbar sind, wurde eine im allgemeinen irreguläre Struktur angenommen. Die Chromatinfiber kann durch drei Größen beschrieben werden (Abb. 1.2). Der Winkel α beschreibt den Winkel zwischen ein- und austretendem Strang am Nukleosom. Der Winkel β beschreibt die Rotation zwischen aufeinanderfolgenden Nukleosomen. β konnte bisher experimentell nicht bestimmt werden. Der dritte Parameter ist die Linker-DNA.



Abb. 1.2: Die Nukleosom-Linker-Nukleosom Einheit

α : Winkel zwischen ein- und austretender DNA. β : Rotationswinkel zwischen zwei aufeinanderfolgenden Nukleosomen. L: Länge der Linker-DNA. Aus (Woodcock *et al.*, 1993).

Mittels der beiden Winkel α und β lassen sich sowohl regelmässige, als auch unregelmässige Strukturen der Fiber beschreiben. Eine Kompaktierung der Fiber geht nach diesem Modell mit einer Verminderung des Ein- und Austrittswinkels der DNA am Nukleosom einher (Abb. 1.3).

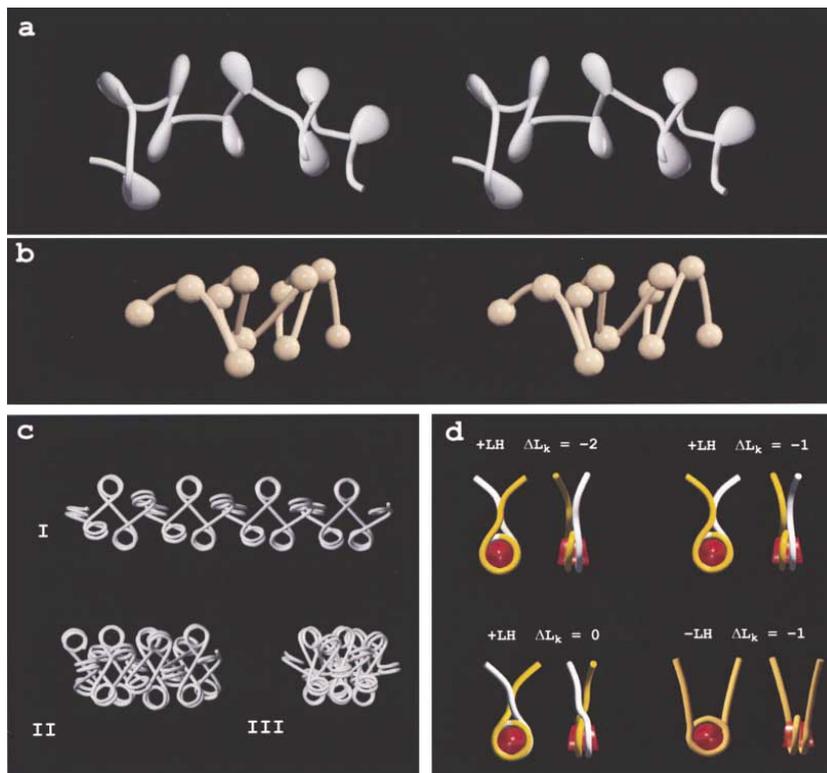


Abb. 1.3: Verschiedene Chromatindarstellungen nach dem Zick-Zack Modell

(A) und (B) 3-D Modelle von Hämerythrozyten-Chromatin in 5 und 80 mM Mg^{2+} . (C) Chromatinstrukturen nach dem Zick-Zack (Woodcock et al. 1993). Ein- und Austrittswinkel von 85°, 45° und 34°. (D) Nukleosomenmodelle in An- und Abwesenheit von Linker-Histon. Aus (Bednar et al., 1998).

Die 30 nm Fiber lässt sich auch mit numerischen Simulationen am Computer berechnen. Die so ermittelten Daten entsprechen dem Zick-Zack Modell (Wedemann & Langowski, eingereicht). Neben diesem in aktuellen Arbeiten favorisierten Modell existiert in vielen Lehrbüchern noch ein älteres Modell, das sogenannte Solenoidmodell (Abb. 1.4) (Finch & Klug, 1976). Dieses Modell beschreibt eine idealisierte Struktur der Fiber. Es wird eine geordnete, regelmässige Helixstruktur angenommen. Aufeinanderfolgende Nukleosomen treten hierbei in Kontakt miteinander. Die Kompaktierung wird durch ein starkes Verbiegen

der Linker-DNA ermöglicht. Wodurch diese starke Verbiegung der kurzen DNA-Abschnitte erreicht wird bleibt unklar. Eine Windung der Superhelix enthält sechs Nucleosomen und besitzt eine Ganghöhe von 11 nm. Wie der Übersichtsartikel von Van Holde und Zlatanova diskutiert, stehen verschiedene experimentelle Daten nicht im Einklang mit dem Solenoidmodell (van Holde & Zlatanova, 1996).

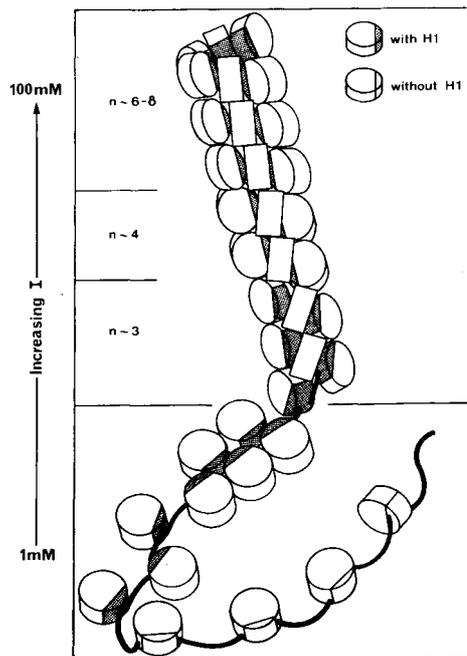


Abb. 1.4: Skizze des Solenoidmodell

Die Zylinder stellen die Nucleosomenkomplexe dar. Angedeutet ist die Kompaktierung unter steigender Salzkonzentration.

Über die Kompaktierung in der 30 nm Fiber hinaus, wird das Chromatin im Zellkern weiter verpackt. Dazu wird die Chromatinfiber in Schleifen aufgewickelt und in Strukturen höherer Ordnung organisiert, die nicht genau bekannt sind. Die Chromatinfiber ist eventuell mit einem festen Proteingerüst, dem sogenannten Chromosomen "Scaffold", im Zellkern verbunden. Von diesen Verankerungspunkten innerhalb des Zellkerns bilden sich Chromatinschleifen, die 100 kBp DNA und mehr enthalten können. Den höchst möglichen Kompaktierungsgrad findet das Chromatin während der Mitose, der Zellkernteilung. Die zuvor duplizierte DNA wird in den sogenannten Metaphasechromosomen, nach

entsprechender Färbung, bereits im Lichtmikroskop sichtbar. Der Kompaktierungsgrad, der hier erreicht wird, ist für die richtige Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen wichtig.

3. Histonmodifikationen und Genregulation

Neben den Histonen sind noch zahlreiche andere Proteine mit der DNA verbunden. Zusätzliche Faktoren, die die negativen Ladungen der DNA abschirmen sind kleine polyvalente Kationen wie Spermin, Spermidin und Putreszin (van Holde, 1989). Diese gehören zu der Stoffklasse der Polyamine und tragen bei physiologischem pH-Wert positive Ladungen. Sie sind für die Struktur des Chromatins wichtig. Neben diesen Faktoren bestimmen auch chemische Modifikationen an den Histonen selbst die Kompaktierung des Chromatins. Die Histone können methyliert, acetyliert sowie phosphoryliert werden (Strahl & Allis, 2000). Diese Modifikationen werden durch Enzymkomplexe (Histonacetylasen bzw. Histondeacetylasen) reguliert. Die Acetylierung der Histonproteine kann die Genexpression steuern (Kadonaga, 1998). Das Chromatin im Zellkern kommt in einer kondensierten Form vor. Die Transkription, der Prozess bei dem die Geninformation durch die RNA-Polymerase abgelesen wird, bedingt eine offeneren Konformation. Eingeleitet wird die Transkription durch zahlreiche Proteinfaktoren. Diese müssen ihre Zielorte auf der DNA erkennen und binden können. Dazu muss die Chromatinstruktur geöffnet werden. Dies kann wahrscheinlich durch die Acetylierung der Histonproteine ausgelöst werden, indem die positive Ladung der Histone neutralisiert wird und sich die DNA teilweise von den Nukleosomen löst. So werden Bereiche auf der DNA für andere Proteine erreichbar. Die Acetylierung ist ein reversibler Prozess und Deacetylierungsenzyme katalysieren die Rückreaktion. Zahlreiche Transkriptionsfaktoren sind mit den Acetylierungs- und Deacetylierungsenzymen verbunden und dirigieren diese an die Bereiche der DNA, die transkribiert oder reprimiert werden sollen. Durch das Zusammenspiel dieser beiden Systeme kann die Transkription effektiv reguliert werden. Dabei hat sich gezeigt, dass das

Linker-Histon H1 ein effektiver Inhibitor der Acetylierung der Histone ist (Herrera *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass das Linker-Histon die Bindung der Acetyltransferase an die DNA verhindert und so die eigentliche Reaktion blockiert. Da diese Blockierung der Enzymaktivität durch sterische Hindernisse am Nukleosom selbst bedingt zu sein scheint, ist es wichtig, die genaue Position des Linker-Histons am Nukleosom zu kennen.

Neben der Acetylierung hat die Methylierung der Kernhistone ebenfalls wichtige regulatorische Auswirkungen. Die DNA wird bevorzugt an sogenannten CpG-Sequenzen methyliert. Unmethylierte Sequenzen zeigen eine Nuklease sensitive Chromatinstruktur, die sich vom Grossteil des Chromatins unterscheidet (Tazi & Bird, 1990). Diese unmethylierten Sequenzen findet man oft im Bereich von Promotoren. Die Methylierung geht mit einer Repression der Transkription einher (Bird & Wolffe, 1999). Über das Protein MeCP2, das an die methylierte DNA binden kann, kann eine assoziierte Histondeacetylase an die DNA binden (Nan *et al.*, 1998). So kommt es über ein Zusammenspiel der Methylierung und Deacetylierung zur Genrepression. Es ist aber noch nicht völlig klar, ob die DNA-Methylierung die primäre Ursache für die Repression oder nur eine Konsequenz der Genrepression ist. Die hier erwähnten Modifikationen der Histonproteine haben also eine weitreichende Konsequenz auf die Genregulation. Da sich die chemischen Modifikationen der Histone direkt auf die Struktur der DNA auswirken, ist es wichtig deren Struktur und die sich aus den Modifikationen der Histonproteine ergebenden Veränderungen zu bestimmen. Defekte, die die Prozesse der Genregulation beeinträchtigen, können zu schweren Krankheiten führen. Der Verlust der Regulation wichtiger, den Zellzyklus bestimmender Proteine, kann diesen ausser Kontrolle geraten lassen (Kouzarides, 1999). Die Folge einer solchen Fehlentwicklung kann die Entstehung eines Tumorgewebes sein (Archer & Hodin, 1999; Mahlknecht *et al.*, 2000).

4. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten wichtige Strukturparameter an Mononukleosomen und die Bindung des Linker-Histons H1 an Nukleosomen und an freie DNA untersucht werden. Die Nukleosomen wurden aus rekombinanten *Xenopus laevis* Histonen H2A, H2B, H3 und H4 hergestellt. Diese in *E. coli* überexprimierten Histone tragen zunächst keine der zuvor erwähnten Modifikationen. Die Effekte des Linker-Histons H1 konnten so zunächst in Abwesenheit posttranslationaler Modifikationen ermittelt werden. Auf einer 614 Bp langen DNA-Sequenz sollten in dieser Arbeit mit den rekombinanten Histonen Nukleosomenkomplexe rekonstituiert werden, um diese dann durch Rasterkraftmikroskopie zu untersuchen. Dies geschah mit dem Ziel, wichtige Parameter wie den Winkel zwischen ein- und austretendem DNA-Strang am Nukleosom messen zu können. Auch sollten die Längen der DNA-Fragmente bestimmt werden, die ein Nukleosom gebunden hatten. Unter Berücksichtigung der Längen freier DNA-Fragmente kann auf die Länge der DNA, die sich um das Nukleosom wickelt, geschlossen werden. Da diese Messungen auch in physiologischen Pufferlösungen vorgenommen werden können, stellen sie eine Erweiterung der bisherigen Strukturuntersuchungen mittels der Elektronenmikroskopie dar. Unter Verwendung einer aufgereinigten H1-Fraktion aus Kalbsthymus sollte ausserdem der Effekt des Linker-Histons auf diese Parameter bestimmt werden.

Ein weiteres Ziel der hier beschriebenen Experimente war es, die Bindung des Linker-Histons H1 an freie DNA-Fragmente zu bestimmen. Hierfür wurden die Methoden der analytischen Ultrazentrifugation und der Fluoreszenzanisotropie verwendet. Beide Messmethoden untersuchen biologische Makromoleküle frei in Lösung. Im Gegensatz zur Rasterkraftmikroskopie werden die Messungen im chemischen Gleichgewicht und ohne Präparationsartefakte, die durch die Bindung an eine Oberfläche entstehen können, durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es, die Bindungsaffinität sowie die Anzahl der Bindungsstellen des Linker-Histons H1 an freie DNA-Fragmente zu bestimmen.

II. Material und Methoden

1. Probenherstellung und Aufreinigung

1.1 Herstellung des DNA-Fragmentes mittels PCR

Die Methode der PCR (*“Polymerase Chain Reaction”*) eignet sich sehr gut, um ein DNA-Fragment *in vitro* zu vervielfältigen. Durch Verwendung synthetischer Primer und einer hitzestabilen Polymerase kann eine sehr geringe Menge an Template amplifiziert werden, so dass genügend Material für weitere analytische Experimente vorhanden ist (Knippers).

Verwendete Materialien:

| | |
|-------------|---|
| Template: | Plasmid pXP10 |
| Primer: | 614-A (5'-gcgcccaataacgcaaaccgcc-3'; Thermo Hybaid, Heidelberg, Deutschland) 614-B (5'-gtccttagaacggggctacaa-3'; Thermo Hybaid, Heidelberg, Deutschland) |
| Polymerase: | AGS-Gold (PCR Kit, Thermo Hybaid, Heidelberg, Deutschland) |
| Puffer: | 10 x Puffer (750 mM Tris/HCl pH 9, 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 % Tween-20), MgCl ₂ (25 mM) Mix dNTP (25 mM) |

Reaktionsansatz:

| | | |
|--------------|---------------------------|--------|
| 1 ml Ansatz: | 10 x Puffer | 100 µl |
| | Mix dNTP (25 mM) | 20 µl |
| | 614-A (0.5478 µg/µl) | 3.8 µl |
| | 614-B (0.3861 µg/µl) | 5.2 µl |
| | AGS-Gold (1U/µl) | 20 µl |
| | pXP 10 (1ng/µl) | 40 µl |
| | MgCl ₂ (25 mM) | 120 µl |
| | H ₂ O | 691 µl |

PCR-Zyklus:

- | | | |
|----|--------|-------|
| 1) | 3 min | 96 °C |
| 2) | 30 sec | 96 °C |
| 3) | 30 sec | 50 °C |
| 4) | 30 sec | 72 °C |
| 5) | 10 min | 72 °C |

Schritte 2-5 wurden 29 mal wiederholt.

Die Syntheseprodukte wurden anschliessend auf einem 8%igen Polyacrylamidgel (PAA-Gel, Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, s. Kapitel 2.1) überprüft. Die insgesamt 4 ml des PCR-Ansatzes wurden einer Ethanol-fällung unterzogen, um das Volumen zu verringern. Hierzu wurde mit etwa der dreifachen Menge kaltem 100% Ethanol gemischt und 30 min in der Tischzentrifuge mit maximaler Umdrehung zentrifugiert. Das Pellet wurde in 160 µl 1x TE (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA) plus 5 mM NaCl aufgenommen.

1.2 HPLC-Aufreinigung der DNA

Mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), die zusammen mit Frau N. Brun durchgeführt wurde, sollte das 614 Basenpaar (Bp) lange PCR-Produkt aufgereinigt werden. Die in Puffer gelöste DNA wurde auf eine Gen-Pak Fax Säule (Millipore, MA, USA) gebracht. Verwendet wurden folgende Pufferlösungen: Puffer A (25 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.5), Puffer B (25 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.5, 1 M NaCl). Die DNA wurde mit folgendem Gradient eluiert:

- 5 min in 5 % B
- 5 min in 5-50 % B
- 10 min in 50-55 % B
- 20 min in 55-60 % B
- 30 min in 60-100 % B

Der Fluss betrug 0.5 ml/min. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Nach der Überprüfung auf einem 8%igen PAA-Gel wurden die Fraktionen, die die DNA enthielten, vereinigt und in einer Speed-Vac Vakuumentrifuge auf ca. 2 ml eingengt. Um die DNA weiter von Verunreinigungen und Salz zu befreien, wurde die Probe auf eine NAP-25 Säule (2.5 ml Volumen, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) gereinigt. Diese wurde zunächst mit 20 ml H₂O gewaschen, die Probe geladen und mit H₂O auf ein Volumen von 2.5 ml ergänzt. Dann wurden 3 ml H₂O aufgebracht und drei 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Probenfraktionen konnten in der Speed-Vac Vakuumentrifuge auf ein Endvolumen von 0.38 ml konzentriert werden. Die vereinigten Proben wurden auf einer NAP-15 Säule (1.5 ml Volumen, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) weiter aufgereinigt. Hierzu musste die Säule zunächst mit H₂O und dann mit 0.1x TE, 5 mM NaCl, pH 7.5 gewaschen werden. Anschliessend wurde die Probe aufgetragen, die mit 0.1x TE, 5 mM NaCl, pH 7.5 auf ein Volumen von 0.5 ml ergänzt wurde. Danach wurde mit 1 ml 0.1x TE, 5 mM NaCl, pH 7.5 eluiert und in der Speed-Vac Vakuumentrifuge auf 50 µl Endvolumen eingengt. Die eingengte Probe wurde mit 50 µl H₂O und 100 µl 1x TE 5 mM, NaCl, pH 7.5 verdünnt und die Konzentration durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Mit einem Extinktionskoeffizienten ϵ von 6500 M⁻¹·cm⁻¹ pro Nukleotid ergab sich eine DNA Konzentration von etwa 1 µM.

1.3 Gelextraktion aus Agarosegelen

Da nach der Aufreinigung der PCR-Produkte über HPLC noch kleinere Fragmente vorhanden waren, sollte ein erneuter PCR-Ansatz über ein Agarosegel aufgereinigt werden. Hierfür wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Der Kit besteht aus einer Silikagelmembran, die in einer kleinen Säule gepackt ist und mit den verschiedenen mitgelieferten Puffern (QG-, PE- und EB-Puffer) für die Auftrennung und Aufreinigung der DNA von Agarose und Verunreinigungen verwendet wird. In Gegenwart des Hochsalzpuffers (pH 7.5) bindet die DNA an die Silikagelmembran. Die

Verunreinigungen werden durch Waschvorgänge abgetrennt. Die DNA kann schliesslich mit einem Tris-Puffer oder H₂O (pH 8.5) von der Säule eluiert werden. Mittels dieser Aufreinigungsmethode wird maximal 50 % der eingesetzten DNA-Menge wieder zurückgewonnen.

Zunächst wurde hierzu ein 1 % Agarosegel hergestellt. Hierfür mussten 1 g Agarose mit 1 ml 10x TBE (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA) in 100 ml H₂O gelöst werden. Davon wurden 50 ml entnommen und mit 50 µl Ethidiumbromid (EtBr) (1 mg/ml) versetzt. Das Gel wurde in eine kleine horizontale Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer diente 200 ml 1x TBE mit 200 µl EtBr (1 mg/ml). Die geladene Probe setzte sich aus 160 µl DNA + 40 µl 5x DNA Blue Run Ladepuffer (Hybaid, Heidelberg, Deutschland) und 2 µl EtBr (10 mg/ml) zusammen. Das Gel lief bei 60 V und 9 mA solange, bis sich die durch die eingesetzte EtBr-Menge gut sichtbare DNA-Bande von der blauen Markerbande abge sondert hatte. Zum Ausschneiden der Bande unter dem UV-Schirm wurde das Gel auf dem Gelschlitten aus Plexiglas belassen, um eine für die DNA schädliche Bestrahlung mit UV-Licht möglichst gering zu halten.

Extraktion von DNA aus Agarosegelen

- Ausschneiden der gewünschten Bande mit einer frischen Skalpellklinge und Überführung von etwa 200 mg schweren Gelstücken in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäss.
- Pro 100 mg Gelstück 4 Volumen des gelben QG-Puffers (pH 7.5) dazugeben.
- 20 min Inkubation bei 50° C. Während der Inkubation alle 5 Minuten gut schütteln.
- Nach der vollständigen Auflösung der Gelstücke muss die Farbe immer noch gelb sein.
- Zugabe von 1.5 Gelvolumen Isopropanol und gutes Vermischen.
- Die Proben auf die Säulen geben (ein Auftrag sollte nicht mehr als 700 µl betragen), 1 min in der Tischzentrifuge bei max. Umdrehung zentrifugieren.
- Zugabe von 600 µl QG-Puffer und 1 min zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.
- Zum Waschen 750 µl PE-Puffer zugeben, 3 min warten, 1 Minute zentrifugieren, Durchfluss verwerfen und Arbeitsschritt wiederholen.
- Zusätzliches Zentrifugieren für eine Minute zur vollständigen Beseitigung der Restflüssigkeit.
- Überführen der Säule in ein frisches 1.5 ml Eppendorfreaktionsgefäss.
- Zur Elution 50 µl vorgewärmten EB-Puffer in die Mitte der Säule pipettieren ohne die Oberfläche zu verletzen, 1 min stehen lassen und anschliessend 1 min zentrifugieren.
- Proben einer Extraktion vereinigen.

Nach der Extraktion ergab sich ein Endvolumen von 500 μl . Die Konzentration der DNA wurde im Photometer bei 260 nm gemessen. Mit $\epsilon_{260} = 6500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pro Nukleotid ergab sich eine DNA-Konzentration von etwa 280 nM.

1.4 Nukleosomen-Rekonstitution

Bei der Rekonstitution der Nukleosomen wurde als DNA-Template das oben erwähnte 614 Bp lange Fragment verwendet. Dieses trägt in der Mitte eine sogenannte Nukleosomenbindungsstelle. Es können sich jedoch die Nukleosomen auch abseits dieser starken Bindungsstelle auf der DNA assemblieren. Die verwendeten Histone sind rekombinante Proteine, die in *E. coli* überexprimiert und aus den Bakterien aufgereinigt wurden (von Dr. Katalin Fejes Tóth freundlicherweise zur Verfügung gestellt). Das Linker-Histon H1 ist eine aufgereinigte Fraktion aus Kalbsthymus, die von Roche (Mannheim, Deutschland) gekauft und nochmals von Frau Nathalie Brun chromatographisch aufgereinigt wurde. Das Histonoktamer bildet bei einer Salzkonzentration von 2 M KCl oder 2 M NaCl einen stabilen Komplex. Bei abnehmender Salzkonzentration und Gegenwart von DNA bindet bei etwa 1 M KCl oder 1 M NaCl ein H3-H4 Tetramer an die DNA, bei etwa 0.8 M KCl oder 0.8 M NaCl bindet ein H2A-H2B Dimer an den vorassemblierten H3/H4-DNA Komplex. Bei einer Salzkonzentration von etwa 0.6 M NaCl oder 0.6 M KCl bindet ein zweites H2A-H2B Dimer und das Nukleosom ist vollständig rekonstituiert (Becker). Für die Rekonstitution kamen 2 verschiedene Methoden zur Anwendung, die beide gleich gute Ergebnisse lieferten. Bei der kontinuierlichen Dialyse wurde mit zwei FPLC-Pumpen ein Gradient von einem Puffer mit 10 mM Tris/HCl pH 7.5 und 2 M KCl zu einem 20 mM Tris/HCl pH 7.5 Puffer angelegt. Der Fluss betrug 1.5 ml/min. Ausserdem lief dieses Rekonstitutionsverfahren unter Eiskühlung. Bei dem anderen Verfahren wurde in verschiedenen Stufen die Salzkonzentration erniedrigt. Die schrittweise Dialyse lief bei Raumtemperatur. Die verwendeten Kollodiumhülsen wurden mit einer 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA-Lösung gefüllt und über Nacht gegen einen 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 M NaCl Puffer

dialysiert, um die Membran zu beschichten. Dies sollte spätere Proteinaggregationen an der Kollodiummembran verhindern. Kollodium ist für Salze durchlässig, so dass sich innerhalb der Kollodienhülle beim Wechsel in einen höher oder niedrigeren Salzpuffer die Salzkonzentration allmählich ändert. Für Nukleosomen, die H1 enthielten, wurde im Anschluss an die Rekonstitution eine zur eingesetzten DNA-Menge äquimolare Menge an H1 zugegeben. Überprüft wurde die Rekonstitution auf einem 8 %igen PAA-Gel.

Protokoll für die kontinuierliche Dialyse:

Der Reaktionsansatz für die Rekonstitution wurde wie folgt pipettiert:

25 µl 4 M KCl
25 µl DNA (280 nM)
0.5-1 µl Histon-Oktamer (5 µg/µl; M=108 kDa)

Die angesetzte Probe wurde zunächst für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann in eine Kollodiumhülle pipettiert, welche in einem Eis gekühlten Becherglas mit Hochsalzpuffer stand. Sodann wurde die Dialyse durch Starten des FPLC-Gerätes begonnen. Etwa 1.8 Liter des Niedrigsalzpuffers wurden mit einem Fluss von 1.5 ml/min gegen etwa 300 ml des Hochsalzpuffers dialysiert.

Hochsalzpuffer: 2 M KCl
 10 mM Tris/HCl, pH 7.5
 0.1 mM EDTA
 0.1 mM DTT

Niedrigsalzpuffer: 20 mM, Tris/HCl, pH 7.5
 0.1 mM EDTA
 0.1 mM DTT

Stufenweise Rekonstitution:

| | |
|----------|--|
| Puffer 1 | 10 mM Tris/HCl, pH 7.5 1 M NaCl 0.1 mM EDTA |
| Puffer 2 | 10 mM Tris/HCl, pH 7.5 0.8 M NaCl 0.1 mM EDTA |
| Puffer 3 | 10 mM Tris/HCl, pH 7.5 0.67 M NaCl 0.1 mM EDTA |
| Puffer 4 | 10 mM Tris/HCl, pH 7.5 0.2 M NaCl 0.1 mM EDTA |
| Puffer 5 | 10 mM Tris/HCl, pH 7.5 0.1 mM EDTA |

Zunächst musste wieder ein Reaktionsansatz wie oben beschrieben pipettiert und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden. Dann wurde in den Puffern 1 – 5 für jeweils eine Stunde inkubiert. Anschliessend folgte eine Inkubation bei 37° Celsius im Wärmeblock, um die Nukleosomen überwiegend in der Mitte des DNA-Fragments zu positionieren (Gottesfeld *et al.*, 2001). Eine erste Überprüfung der assemblierten Nukleosomen fand auf einem 8%igen nicht denaturierenden PAA-Gel statt. Für die weiteren rasterkraftmikroskopischen Messungen wurden die Proben bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt.

2. Charakterisierung der Protein- und DNA-Proben

2.1 Native Polyacrylamidgele

Mit Hilfe von nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen kann man kleine DNA-Fragmente voneinander trennen. Polyacrylamidgele bestehen aus Acryl- und Bisacrylamid in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen. Das Verhältnis bestimmt den Vernetzungsgrad und somit auch die Porengröße des Geles. Da die DNA negativ geladen ist, wandert sie zum Pluspol, wenn man an das Gel eine genügend hohe Spannung anlegt. Verschieden große DNA-Fragmente wandern unterschiedlich schnell durch die Poren des Geles, so dass eine Trennung der Größe nach erfolgt. In dieser Arbeit wurden verschieden prozentige Polyacrylamidgele verwendet. Ausgangslösungen waren wässrige Acryl-Bisacrylamidlösungen verschiedener Prozentigkeit und Mischungsverhältnisse (Acryl- zu Bisacrylamid) der Firma Carl Roth GMBH (Nürnberg, Deutschland). Für die kleinen Gele (8 x 10 cm) ergaben sich folgende Ansätze:

Ansatz für ein 8 %iges PAA-GEL (29:1)

2 ml Acryl-Bisacrylamid 30% (29:1)
100 µl APS (10%)
10 µl TEMED
7 ml H₂O
1 ml 10x TBE Puffer

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von APS und TEMED gestartet. Nach Färben in einer EtBr-haltigen Lösung, können die Fragmente auf einem UV-Leuchttisch visualisiert werden. Das EtBr interkaliert zwischen den Basen der DNA und wird durch UV-Licht (260 nm) zum Leuchten angeregt.

2.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Durch SDS-Page werden Proteine denaturiert und gemäß ihrer Größe aufgetrennt. Die Denaturierung der Proteine erfolgt mit dem Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat). Dieses entfaltet die Proteinkette und bindet an die Aminosäureseitenketten über hydrophobe Wechselwirkungen. Jedes SDS-Molekül trägt eine negativ geladene Sulfatkopfgruppe, so dass das Protein pro Aminosäurerest eine negative Ladung erhält. Durch die Entfaltung entstehen Proteine, die eine hydrodynamische äquivalente Konformation haben und gleiche Ladungsdichte pro Längeneinheit besitzen, d. h. ein ungefähr gleiches Verhältnis von Masse zu Ladung. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine diskontinuierliche Elektrophorese. Zunächst wird in einem grossporigen Sammelgel mit niedrigem pH-Wert die Probe gesammelt (fokussiert) und anschliessend in einem kleinporigen Gel mit höherem pH Wert getrennt. Durch eine anschliessende Färbung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R 250 sowie Entfärbung in 7% Essigsäure können Proteine im Gel sichtbar gemacht werden. Hierzu wird das Gel in der Farbstofflösung für etwa 20 min geschwenkt und anschliessend für mehrere Stunden oder über Nacht in Essigsäure wieder entfärbt.

SDS-Page

| | |
|-------------------|---|
| 12 %iges Trenngel | 4 ml Acryl-Bisacrylamid (30%, 29:1) 2.5 ml 1 M Tris pH 9 3.3 ml H ₂ O 0.1 ml APS (10 %) 0.1 ml SDS (10 %) 0.01 ml TEMED |
| 4 %iges Sammelgel | 0.65 ml Acryl-Bisacrylamid (30 % 29:1) 0.625 1 M Tris pH 6.8 0.05 ml APS (10%) 0.05 ml SDS (10%) 3.65 ml H ₂ O |

Laufpuffer: 1x SDS Laufpuffer, 180 V, 25 mA

Coomassie Färbung 0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
 42.5% (w/v) Ethanol
 5% (w/v) Methanol
 10% (w/v) Essigsäure

Entfärbelösung 7% (w/v) Essigsäure

2.3 Western Blot

Mit einem Western Blot lassen sich einzelne Proteine durch einen Antikörper spezifisch nachweisen. Die hierbei detektierbare Proteinmenge ist wesentlich geringer als in normalen SDS-Page Proteingelen. Zunächst fertigt man ein herkömmliches SDS-Gel wie beschrieben an (Kapitel 2.2). Nach der Gelelektrophorese wird es in eine Blotapparatur überführt. Hierbei wird von dem Laufpuffer des Geles zu einem Transferpuffer gewechselt und die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die Proteine binden über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Diese werden dann mit einem Milchpulver enthaltenden Puffer inkubiert, um die noch freien Stellen auf der Membran abzudecken ("blocken"). Dann inkubiert man mit dem ersten Antikörper, der das zu untersuchende Protein spezifisch erkennt. Mittels eines zweiten Antikörpers, der den ersten Antikörper erkennt und eine Peroxidase kovalent gebunden trägt, wird der erste Antikörper sichtbar gemacht. Durch Zugabe eines chemolumineszenten Stoffes kommt es an den Stellen, an denen sich die Peroxidase befindet zu einer Reaktion, die die Chemolumineszenz freisetzt. Diese Stellen sind identisch mit den Banden des Proteins gegen das der erste Antikörper gerichtet ist. Die Chemolumineszenz kann anschliessend auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Verwendete Chemikalien:

10x TBS: 24.2 g Tris, 80 g NaCl, pH 7.6, Endvolumen 1 Liter

Waschpuffer: 1x TBS; 0.1 % Tween-20

Blockingpuffer: 1x TBS, 0.1 % Tween-20, 5 % (w/v) *Non-fat dry milk*

Chemolumineszente Substrate:

Reagent A: 20x LumiGlo chemoluminescent reagent

Reagent B: 20x Peroxide

Transferpuffer: 25 mM Tris, 0.2 M Glycine, 20 % Methanol, pH 8.5

Antikörper (AK): Anti H1 AK, α -Anti Maus AK, Anti Biotin AK

Blotting:

Beschichtung der Anode (von unten nach oben) mit drei Whatmanfilterpapier (in Transferpuffer getränkt), eine H-bond Membran (in Transferpuffer getränkt), Gel, drei Whatmanfilterpapier (in Transferpuffer getränkt)

Zusammenbau der Blottapparatur und Anlegen einer Stromstärke von 225 mA für eine Stunde.

Überführen der Membran in 25 ml Blockingpuffer für 45 min.

Inkubation mit 1. AK: Membran in 4 ml Blockingpuffer mit Anti-H1 AK (1 μ g/ml) über Nacht im Kühlraum inkubieren.

Waschen der Membran mit drei mal 15 ml Waschpuffer für je 5 min.

Inkubation mit 2. AK: Membran in 2 ml Blockingpuffer mit α -Anti Maus AK (0.6 μ l) für eine Stunde bei RT inkubieren.

Waschen der Membran mit drei mal 15 ml Waschpuffer für je 5 min.

Chemolumineszenzreaktion: Membran in 9 ml H₂O + 0.5 ml Reagenz A + 0.5 ml Reagenz B für 1 min inkubieren.

Visualisierung auf Röntgenfilm: Membran in Frischehaltefolie wickeln, für 30 sec einen Röntgenfilm belichten und anschliessend Film entwickeln.

3. Analytische Ultrazentrifugation

3.1 Theoretische Grundlagen

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) kann das Molekulargewicht von Makromolekülen oder Molekülkomplexen präzise bestimmt werden. Hierzu wird die zu untersuchende Probe in eine sektorförmige Zelle gebracht und bei mehreren Drehzahlen

zentrifugiert (Gleichgewichtslauf 3000-48000 Umdrehungen pro Minute). Die Absorption kann bei verschiedenen Wellenlängen innerhalb der Zelle gemessen werden. Das Absorptionsprofil entspricht in verdünnten Lösungen der Konzentrationsverteilung der Teilchen. In dieser Arbeit sollte mit der AUZ die Bindung des Linker-Histons H1 an eine 20 Bp lange DNA-Sequenz bestimmt werden. Mit dem Gleichgewichtssedimentationslauf lassen sich formunabhängige Molekulargewichte bestimmen. Diese geben Aufschluss über die in der Probe enthaltenen Komplexe.

Im Gleichgewichtssedimentationslauf wird die Umdrehungszahl so gewählt, dass sich innerhalb der Zelle ein Konzentrationsgleichgewicht einstellen kann. Aufgrund der Zentrifugalbeschleunigung werden die Teilchen zunächst absedimentieren. Wenn daraufhin die Konzentration der Teilchen am Zellenende zunimmt, wird der Prozess der Diffusion für diese Teilchen stärker und wirkt entgegengesetzt der Sedimentation. Dies führt im Gleichgewichtssedimentationslauf zu einer dem Molekulargewicht entsprechenden Konzentrationsverteilung innerhalb der Zelle. Im Gleichgewicht ändert sich diese Verteilung mit der Zeit nicht mehr. Aus der Konzentrationsverteilung innerhalb der Zelle lässt sich auf das Molekulargewicht zurückschließen. Im Gleichgewichtszustand nimmt die Konzentration der Teilchen mit dem Abstand r vom Rotormittelpunkt zu. Dabei nehmen die Teilchen an den verschiedenen Punkten innerhalb der Zelle verschiedene energetische Zustände ein. Nach Boltzmann gilt die Wahrscheinlichkeit P_i ein Molekül mit der Energie E_i zu finden wie folgt:

$$P_i \propto g_i \cdot \exp\left(\frac{-E_i}{kT}\right) \quad (1)$$

In Gleichung 1 ist g_i die Anzahl der verschiedenen Zustände mit der Energie E_i , k die Boltzmann Konstante und T die Temperatur. Für das Verhältnis von zwei Wahrscheinlichkeiten oder äquivalent dazu zweier Konzentrationen in mol/l gilt dann:

$$\frac{c_j}{c_i} = \exp\left(-\frac{E_j - E_i}{RT}\right) \quad (2)$$

Die Energiedifferenzen an verschiedenen Punkten i und j in der Zelle ergibt sich aus der Arbeit, die verrichtet werden muss, um ein Teilchen zwischen diesen beiden Punkten zu verschieben. Diese Arbeit ergibt sich aus dem Integral über Kraft mal Weg. So kann man die Energiedifferenzen an den verschiedenen Punkten innerhalb der Zelle berechnen. Dafür muss die effektive Masse M_{eff} des Teilchens berücksichtigt werden. Sie berechnet sich mit $M_{\text{eff}} = M \cdot (1 - \bar{V} \cdot \rho)$, wobei \bar{V} das partialspezifische Volumen des Teilchens, M die Masse des Teilchens und ρ die Dichte des Lösungsmittels ist. Man erhält folgenden Zusammenhang zwischen Konzentration und Abstand r :

$$A = A_0 \cdot \exp\left(\frac{M \cdot (1 - \bar{V} \cdot \rho) \cdot \omega^2 \cdot (r^2 - r_0^2)}{2 \cdot RT}\right) + E \quad (3)$$

A_r ist die Absorption am Punkt r , A_0 die Absorption des Punkt 0, M das Molekulargewicht der Probe, ω die Winkelbeschleunigung und E die Absorption der Basislinie. Liegen 2 Komponenten vor, erweitert sich die Gleichung wie folgt:

$$A = A_{0,1} \cdot \exp\left(\frac{M_1 \cdot (1 - \bar{V}_1 \cdot \rho) \cdot \omega^2 \cdot (r^2 - r_0^2)}{2 \cdot RT}\right) + A_{0,2} \cdot \exp\left(\frac{M_2 \cdot (1 - \bar{V}_2 \cdot \rho) \cdot \omega^2 \cdot (r^2 - r_0^2)}{2 \cdot RT}\right) + E \quad (4)$$

3.2 Experimente Gleichgewichtssedimentationslauf

Im Gleichgewichtssedimentationslauf wurde die Bindung des Proteins H1 an eine 20 Bp lange DNA mit der Zufallssequenz (5'-gctgcaggatctgatggacg-3') untersucht. Die DNA wurde von der Firma Hybaid (Heidelberg, Deutschland) synthetisiert und mittels Reversed Phase HPLC aufgereinigt. Die Konzentrationen der Einzelstränge wurden im Photometer bestimmt. Hierzu wurde zunächst die Absorption bei 260 und 320 nm (Basislinie)

gemessen. Der Extinktionskoeffizient der Einzelstränge wurde über die Sequenz mittels eines Computerprogramms berechnet (Puglisi & Tinoco, 1989). Es ergab sich für den Einzelstrang JFK-1 ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{\text{JFK-1}} = 198.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$) eine Konzentration von $129 \mu\text{M}$. Für den Einzelstrang JFK-2 wurde $\epsilon_{\text{JFK-2}} = 186 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und eine Konzentration von $111 \mu\text{M}$ bestimmt. Um die beiden Einzelstränge zu hybridisieren wurden $161 \mu\text{l}$ JFK-2 und $139 \mu\text{l}$ JFK-1 gemischt. Es folgte eine Inkubation von 5 Minuten bei $75 \text{ }^\circ\text{C}$ und allmählichem Abkühlen im Wärmeblock bis auf Raumtemperatur. Um die Konzentration des Duplexes zu bestimmen, wurde wieder die Absorption im Photometer bei 260 nm gemessen. Für den Absorptionskoeffizienten des Duplexes wurden die Werte für die Einzelstränge addiert und 30% dieses Wertes wieder abgezogen, um die Hypochromie bei der Duplexbildung zu berücksichtigen, so dass sich $\epsilon_{\text{JFK Duplex}} = 269 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und eine Konzentration von $68.2 \mu\text{M}$ ergab. Für den Gleichgewichtssedimentationslauf wurden folgende neun Proben pipettiert mit einem Gesamtvolumen von $120 \mu\text{l}$ (Tabelle 1). Als Puffer wurde 20 mM Tris /HCl pH 7.5, 25 mM KCl, 0.01 mM EDTA verwendet.

| Probe | DNA (μl) | H1 (μl) | Puffer (μl) | DNA (μM) | H1 (μM) |
|-------|-----------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|
| P2 | 6.5 | 4.6 | 118 | 3.5 | 1 |
| P3 | 6.5 | 8.1 | 115 | 3.5 | 1.7 |
| P4 | 6.5 | 11.6 | 112 | 3.5 | 2.5 |
| P5 | 6.5 | 16.2 | 97.3 | 3.5 | 3.5 |
| P6 | 6.5 | 23.2 | 90.3 | 3.5 | 5 |
| P7 | 6.5 | 32.5 | 81 | 3.5 | 7 |
| P8 | 6.5 | 40.6 | 72.9 | 3.5 | 8.7 |
| P9 | 6.5 | 48.75 | 64.75 | 3.5 | 10.5 |

Tabelle 1: Probenzusammensetzung AUZ Gleichgewichtssedimentationslauf

Als Referenz wurde für jede Probe 130 µl Puffer geladen und mit 10000, 15000 und 20000 Umdrehungen je Minute zentrifugiert, bis sich ein stabiles Gleichgewicht eingestellt hatte. Hierzu wurden bei den verschiedenen Drehzahlen jeweils die Zellen vier mal zu unterschiedlichen Zeiten durchgemessen, und so ein Absorptionsprofil bei 260 nm aufgenommen. Bei dieser Wellenlänge absorbiert hauptsächlich die DNA. Nach Aufnahme des letzten Scans wurden die Proben mit einer Umdrehungszahl von 48000 abzentrifugiert, so dass die Basislinie E (s. Gl. 3) für die einzelnen Proben im Bereich des Meniskus ermittelt werden konnte. Die gemessenen Absorptionsgradienten konnten dann in dem Programm Origin v.3.78 (MicroCal Software, Inc. MA, USA) an die Gleichung 3 bzw. 4 angepasst werden. Dabei wurden folgende Parameter verwendet:

| | |
|--|--|
| Dichte des Puffer: | 1.01 g/ml |
| Molekulargewicht DNA: | 13 kDa |
| Molekulargewicht H1: | 21 kDa |
| Partialspezifisches Volumen DNA: | 0.538 cm ³ /g |
| Partialspezifisches Volumen H1: | 0.762 cm ³ /g |
| Partialspezifisches Volumen 1 DNA: 1 H1: | $0.538 \cdot 13/34 + 0.762 \cdot 21/34 = 0.676$ cm ³ /g |
| Partialspezifisches Volumen 3 DNA: 1 H1: | $0.538 \cdot 39/60 + 0.762 \cdot 21/60 = 0.617$ cm ³ /g |
| Partialspezifisches Volumen 2 DNA: 1 H1: | $0.538 \cdot 26/47 + 0.762 \cdot 21/47 = 0.638$ cm ³ /g |

4. Fluoreszenzanisotropie (FA)

4.1 Theorie

Die Fluoreszenzanisotropie gibt das Verhältnis der Fluoreszenzintensität in einer bestimmten Polarisationsrichtung zur Gesamtfluoreszenzintensität an. Bei Messungen der Fluoreszenzanisotropie macht man sich zu Nutze, dass die Rotationsdiffusionszeit einer kurzen mit Farbstoff markierten DNA-Sequenz zunimmt, wenn ein Protein an die DNA bindet. Durch die Bindung des Proteins und der Entstehung eines größeren Komplexes

verringert sich die Drehbeweglichkeit der DNA und die Anisotropie steigt, wie folgend erklärt, an. Mit der Fluoreszenzanisotropie lassen sich daher Bindungskonstanten und Kinetiken messen. In dieser Arbeit wurde die Bindung des Histons H1 an eine 20 Bp lange DNA untersucht.

Bei den FA-Messungen wurde ein fluoreszierendes Teilchen mit linearem in z-Richtung polarisiertem Licht angeregt. Durch die Verwendung von Polarisatoren können die Fluoreszenzintensitäten vertikal und horizontal zur Anregungspolarisationsrichtung separat gemessen werden. Die Fluoreszenzanisotropie r ergibt sich dann wie folgt (Gl. 5):

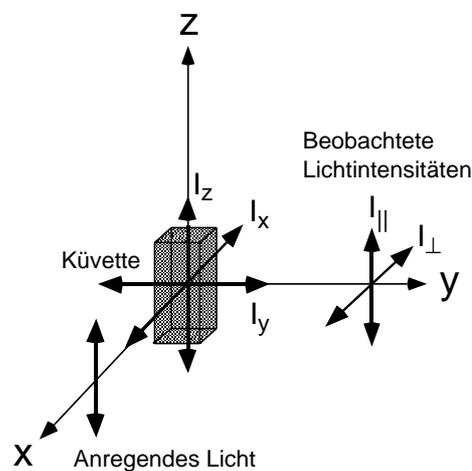


Abb. 2.1: Beobachtung der Fluoreszenzanisotropie

Die Doppelpfeile geben die Richtung des E-Feldes der Lichtwellen wieder.

$$r = \frac{I_z - I_y}{I_x + I_y + I_z} \quad \text{bzw.} \quad r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (5)$$

Die räumliche Position des Dipols eines einzelnen Fluorophors kann durch die Winkel ϕ und θ beschrieben werden (siehe Abb. 2.2). Regt man mit in z-Richtung polarisiertem Licht an, ist die Anregungswahrscheinlichkeit der verschieden im Raum orientierten Fluorophore der Projektion des Dipolvektors auf die z-Achse proportional. Hierbei unterscheiden sich Fluorophore verschiedener ϕ -Winkel nicht voneinander. Die Abhängigkeit der

Anregungswahrscheinlichkeit von der räumlichen Orientierung des Anregungsdipols nennt man PhotoSelektion.

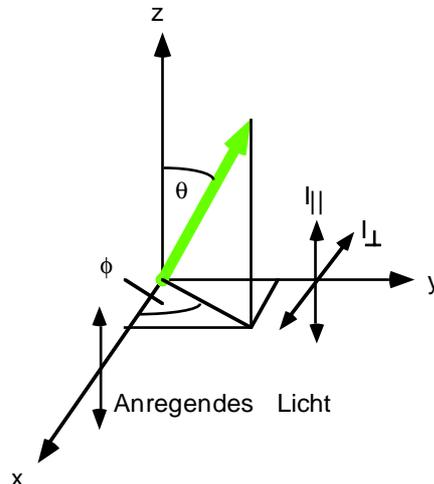


Abb. 2.2: Beschreibung der räumlichen Lage des Fluoreszenzdipols im Raum

Das Fluorophor emittiert nach Anregung Licht bei höherer Wellenlänge. Fluorophore, die eine schnelle Rotationsdiffusionszeit haben, depolarisieren das Anregungslicht. Aufgrund der hohen Drehbeweglichkeit ändert sich die Richtung des Dipolmoments des Fluorophors während der Fluoreszenzlebensdauer. Dies führt dazu, dass das emittierte Fluoreszenzlicht nicht mehr die Anregungspolarisationsrichtung beibehält. Bindet das Histon H1 an die DNA, verlängert sich die Rotationsdiffusionszeit des Fluorophors, der mit der DNA kovalent verbunden ist. Der Anteil an depolarisiertem Licht wird geringer und die Fluoreszenzanisotropie steigt. Die statistische Verteilung der Fluorophordipole im Raum und die Tatsache, dass nur die Projektion des Dipolvektors in z-Richtung angeregt werden kann, bedingt einen Wert für die Anisotropie in freier Lösung von maximal 0.4. Dies setzt voraus, dass Anregungs- und Emissionsdipol des Fluorophors in die gleiche Richtung zeigen und sich während der Fluoreszenzlebensdauer nicht bewegen. Für Moleküle, bei denen diese Annahme nicht gilt werden Werte kleiner als 0.4 erreicht.

4.2 Fluoreszenzanisotropiemessungen

Die Fluoreszenzanisotropiemessungen wurden mit dem Fluorimeter SLM 8100 von der Firma SLM Aminco (Rochester, N.Y.) durchgeführt, das dem in Abb. 2.3 dargestellten Aufbau entsprach aber mit Doppel-Gitter-Monochromatoren ausgestattet war.

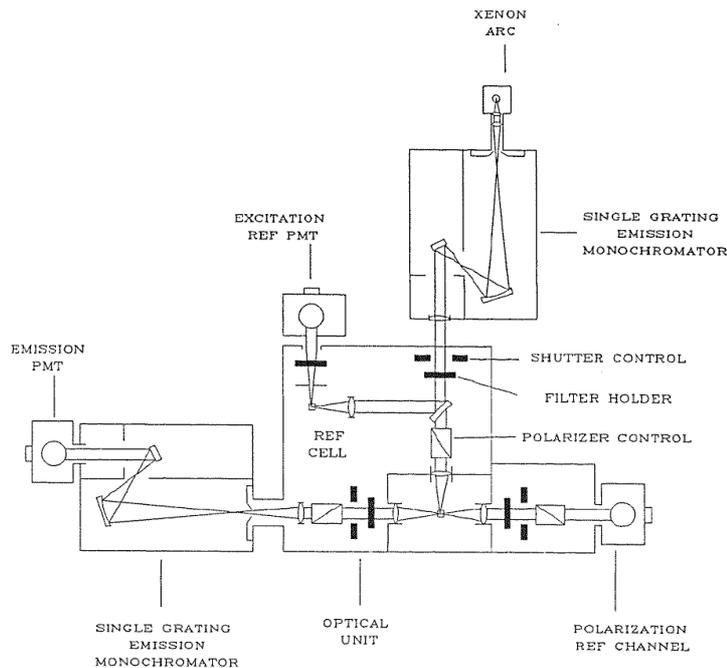


Abb. 2.3 Aufbau des SLM 8100 von der Firma Aminco (Rochester, N.Y.)

Als Lichtquelle diente eine Xenonlampe, die ein breites Spektrum an Lichtwellenlängen emittiert. Über ein Monochromator wird eine spezielle Anregungswellenlänge selektiert und in dem Anregungspolarisator in der gewünschten Raumrichtung polarisiert. Durch eine Linse wird der Lichtstrahl in einer Küvette fokussiert. Nach Durchgang durch einen weiteren Polarisator und Monochromator kann dann das aus der Küvette emittierte Fluoreszenzlicht parallel und senkrecht zur Anregungspolarisationsrichtung gemessen werden. Bei dem hierbei verwendeten L-Format misst man die Intensitäten der beiden verschiedenen Polarisationsrichtungen hintereinander. Gleichzeitig wird ein Teil des anregenden Lichtes in eine Referenzküvette umgeleitet, in der sich eine 3 g/l Rhodamin B Lösung in Ethylenglykol

befindet. Normiert man das Messsignal auf dieses Referenzsignal, mitteln sich Intensitätsschwankungen der Lichtquelle heraus. Die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes ermöglicht ein Photomultiplier, der das Signal verstärkt. Die eingestrahlte Lichtintensität in die Küvette kann auch zusätzlich durch verschieden große Spalten (Slits) reguliert werden. Bei der Messung wurden jeweils 8 nm Slits verwendet. Zusätzlich befindet sich noch ein Thermostat an dem Gerät, das die Temperatur der Küvette auf 25 ° C einstellen kann.

Titration der DNA mit Histon H1

Eine 20 Bp lange DNA, die mit den Farbstoffen Rhodamin-X und Alexa-488 markiert war und freundlicherweise von Frau Dr. Katalin Tóth bereitgestellt wurde, konnte mit steigenden Proteinkonzentrationen titriert und die Bindung des Histons H1 an die DNA untersucht werden. Dazu wurde zunächst folgender Ansatz pipettiert:

| | |
|----------|---|
| 7.5 µl | 4x HS Puffer (5mM Hepes/KOH, pH 7.5, 5mM Mg-Acetat, 50 mM K-Acetat) |
| 2 µl | DNA (20 Bp, 140 nM) |
| 9.45 µl | 1x TE, 5 mM NaCl, pH 7.5 |
| 41.05 µl | Aqua dest. |

Diese Lösung wurde mit verschiedenen konzentrierten H1-Lösungen (10, 100, 250, 500, 1000, 5000, 28000 nM) bis zu einer H1-Endkonzentration von etwa 1800 nM titriert und die Anisotropie im L-Format gemessen. Nach Zugabe des Proteins wurde so lange gemessen, bis die Anisotropie annähernd konstant blieb. Jeder Messwert stellte den Mittelwert von 20 Einzelmessungen dar. Der Fehler ergibt sich aus der Standardabweichung von diesem Mittelwert

Geräteparameter:

Emissionswellenlänge: 620 nm

Excitationswellenlänge: 580 nm

Verwendeter Filter: long pass filter 610 nm

User: Felix, Setup: L-AN

Sensitivity: EMR: 840 Volt, Gain: 10

EMR: 10440

Ref: 18323

5. Rasterkraftmikroskopie (SFM)

Bei der Rasterkraftmikroskopie (SFM = *scanning force microscopy* oder auch AFM = *atomic force microscopy*) lässt sich ein topographisches Bild durch Abtasten einer Oberfläche erzeugen. Im Gegensatz zu herkömmlichen Mikroskopen werden weder Licht noch Elektronenstrahlen benutzt, um ein Abbild der zu untersuchenden Probe zu erhalten. Durch Verwendung sehr spitzer Nadeln und Piezokristallen zur Steuerung kann eine Auflösung im Nanometerbereich erreicht werden

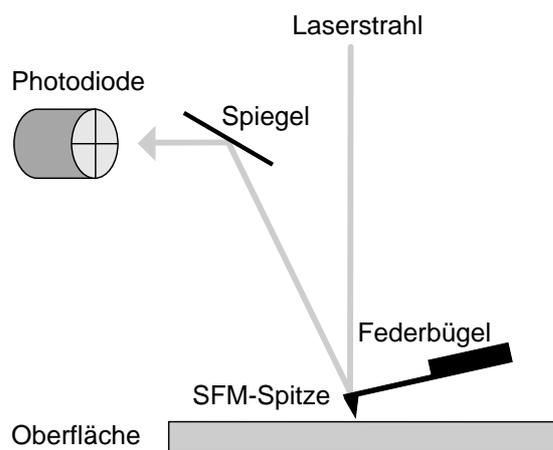


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Laserprojektion im Rasterkraftmikroskop

Die Abtastspitze, die aus Silizium oder Siliziumnitrid besteht, wird durch ein piezoelektrisches Element zur Schwingung angeregt. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes werden in den Piezokristallen die äusseren Elektronenhüllen gegenüber dem Atomrumpf verschoben und so eine mechanische Schwingung des Kristalls erzeugt. Da diese Schwingung von der Stärke des angelegten Feldes abhängt, kann eine Schwingung mit

definierter Frequenz erreicht werden. Der Federbügel wird bei seiner Eigenfrequenz zum Schwingen angeregt. Ein Laserstrahl wird auf den Federbügel fokussiert und von diesem über einen Spiegel in eine 4-Quadranten Photodiode weitergeleitet (Abb. 2.4).

Bei freier Schwingung des Federbügels schwingt dieser Laserstrahl mit gleicher Amplitude auf der Photodiode. Kommt die Spitze in Kontakt mit einer Oberfläche, so wird die Schwingung des Federbügels gedämpft. Dies verursacht eine Ablenkung des Laserstrahls aus der Mitte der Photodiode, sowie einer Dämpfung der Laserschwingung. Dies führt zu einer Spannungsänderung an der Photodiode. Mittels eines elektronischen Regelkreises und eines piezoelektrischen Röhren-Scanners, der sich unterhalb des Probenhalters befindet, kann dieser in z-Richtung nach oben und unten verschoben werden, so dass die Amplitude der Ausgangsschwingung und die ursprüngliche Stellung an der Photodiode erreicht wird. Eine Bewegung in x- und y-Richtung ist ebenfalls möglich, so dass die Probe in der x-y-Ebene abgetastet werden kann. Durch Nachregulierung der z-Achse wird die Schwingungsamplitude konstant gehalten und aus der Bewegung des Scanners in z-Richtung ergibt sich ein topographisches Bild der abgetasteten Oberfläche.

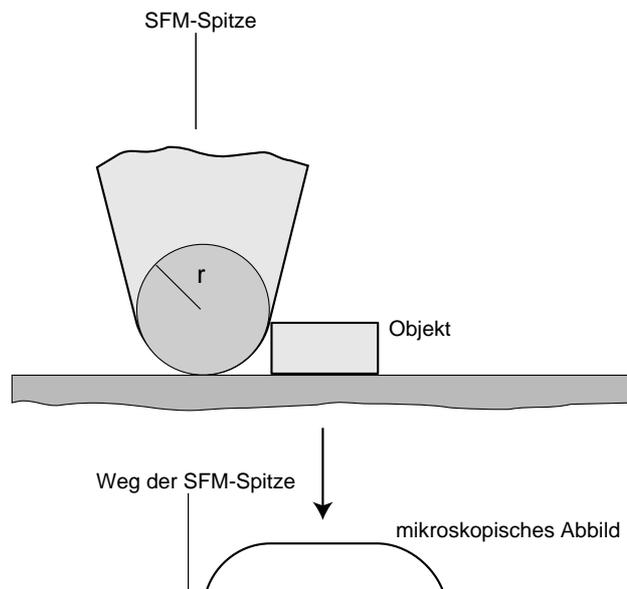


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Auflösungsvermögens im Rasterkraftmikroskop

Die Kräfte, die beim Annähern an die abzutastende Oberfläche zur Schwingungsdämpfung des Federbügels führen, sind neben elektrostatischen und van-der-Waals-Kräften, Kapillarkräfte zwischen der Spitze und dem Flüssigkeitsfilm, der die getrocknete Probe umgibt. Die Auflösung, die im Rasterkraftmikroskop erreicht werden kann, hängt von der Geometrie der Spitze ab. Die Auflösung wird vom Endradius der Spitze bestimmt. Für die laterale Auflösung der Probe gilt annähernd, dass sich Objekte um den Spitzendurchmesser verbreitern (Abb. 2.5). Abhängig von der verwendeten Spitze kann eine Auflösung von 5-10 nm erreicht werden.

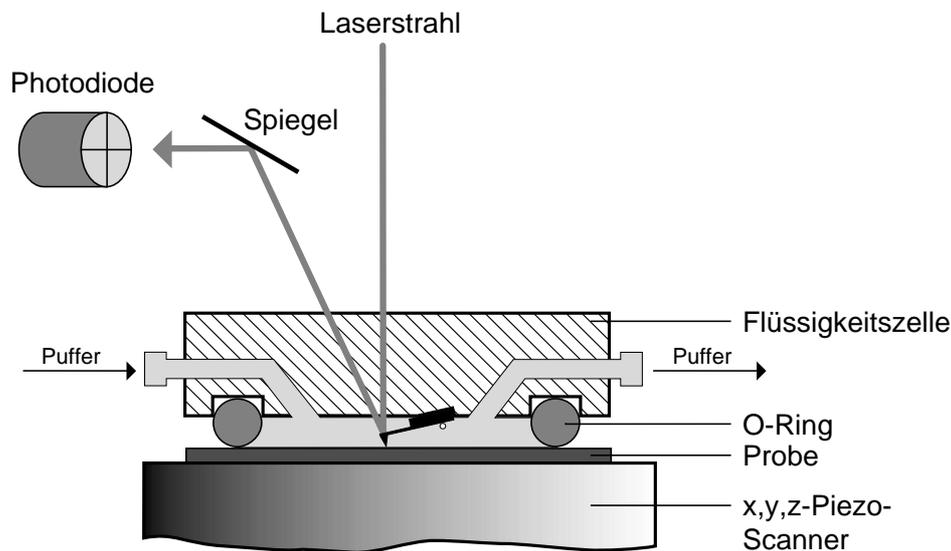


Abb. 2.6: Darstellung der Flüssigkeitsmesszelle im Rasterkraftmikroskop

Eine weitere Beeinträchtigung ergibt sich aus dem Umstand, dass bei Messungen in Luft die Proben getrocknet werden. Dies ist besonders für Proteinproben problematisch. Mit einer Flüssigkeitszelle (Abb. 2.6) lassen sich jedoch auch Proben ungetrocknet, also in physiologischen Pufferlösungen untersuchen. Durch zwei Kanäle kann während einer Messung die Pufferlösung ausgetauscht werden. Bei der Messung in Flüssigkeit umgeht man auch mögliche Trocknungsartefakte. Verwendet werden für Messungen in Flüssigkeit

etwas weichere Federbügel. Die Federbügel für die Messungen in Luft haben eine Federkonstante zwischen 10 und 60 N/m, wohingegen die Federn für Flüssigkeitsmessungen lediglich eine Federkonstante von etwa 2.5 N/m haben. Die Frequenzen, bei denen man die Federbügel zur Schwingung anregt, liegen in Luft bei etwa 250-270 kHz und in Flüssigkeit bei etwa 20 kHz.

Die Probe wird auf einer Glimmerscheibe abgetastet. Diese kann durch Abzug eines Tesafilmstreifens so gespalten werden, dass eine atomar glatte und reine Oberfläche entsteht. Diese Oberfläche ist negativ geladen. In Gegenwart von zweifach positiv geladenen Ionen kann die DNA, die durch ihr Desoxyribosephosphatrückgrat ebenfalls negativ geladen ist, auf dem Glimmer fixiert werden. Für Messungen in Luft wurden hierfür Puffer mit Mg^{2+} -Ionen verwendet, bei Flüssigkeitsmessungen wurden noch zusätzlich Ni^{2+} -Ionen verwendet, um die DNA noch stärker zu binden. Folgende Protokolle wurden verwendet:

5.1 Probenpräparation:

In den Rasterkraftmikroskopieexperimenten wurden die, mittels Salzdialyse hergestellten, Mononukleosomen untersucht (Kapitel 1.3). In Luft konnten Mononukleosomen mit und ohne H1 gemessen werden. In Flüssigkeit wurden Mononukleosomen ohne H1 untersucht. Zur Datenanalyse wurden die aufgenommenen Bilder mit dem Programm NIH Image v. 1.58 (National Institute of Health, Bethesda, MD) an einem Macintosh Computer ausgewertet. Es konnten die DNA-Konturlängen von freien DNA-Fragmenten und von Mononukleosomen gemessen werden. Die Position der assemblierten Nukleosomen wurde bestimmt, indem die Länge von einem Ende des Fragmentes bis zur Mitte des Proteinkomplexes durch die Gesamtlänge des Fragmentes geteilt wurde. Der Winkel zwischen ein- und austretendem Strang am Nukleosom wurde so bestimmt, dass die Richtungen der DNA-Stränge am Nukleosom als Schenkel des angelegten Winkels dienten. Die Messergebnisse wurden in dem Programm Kaleidagraph version 3.08 (Synergy software, PA) dargestellt. Für die Probenpräparationen kamen die folgenden 2 Protokolle zur Anwendung:

Protokoll 1 (Luft)

Der 0.5x HS Puffer (5 mM Hepes/KOH pH 7.5, 10 mM Mg-Acetat, 50 mM K-Acetat) wurde zu Beginn eines Messtages für mindestens 30 min auf 70 °C erhitzt. Die untersuchten Mononukleosomen wurden auf eine Konzentration von etwa 4 nM in dem 0.5x HS-Puffer verdünnt. Auf eine frisch gespaltene Glimmerscheibe wurden 10 µl einer solchen Lösung pipettiert und mit rund 30–50 ml Aqua dest. gewaschen. Anschliessend wurden die Probe mit Stickstoff für 4-5 min getrocknet. Die verwendeten Spitzen waren geätzte Silizium-Spitzen (Typ NCH, Nanosensors, Wetzlar, Deutschland)

Protokoll 2 (Flüssigkeit)

Es wurden 3 verschiedene Puffer verwendet:

Puffer 1: 1x NMDB (10 mM Hepes/KOH pH 8, 10 mM MgCl₂, 30 mM NaCl)

Puffer 2: 190 µl 1x NMDB + 10 µl 0.2 M NiSO₄

Puffer 3: 160 µl 1x NMDB + 40 µl 0.2 M NiSO₄

Die Mononukleosomen wurden in einem Volumen von 200 µl in 1x NMDB-Puffer zu einer Konzentration von 1.4 nM verdünnt. Puffer 1, 2 und 3 wurden für eine Stunde bei 70 °C erhitzt. Die verwendeten Spitzen (sss-FM, Nanosensors, Wetzlar, Deutschland) wurden eine Stunde unter UV-Licht bestrahlt, um diese zu härten. Die durch den O-Ring abgedichtete Flüssigkeitszelle wurde in einem ersten Schritt mit 1x NMDB-Puffer gefüllt. Dann wurden 70 µl der Nukleosomenlösung zugespritzt, einige Minuten inkubiert und dann wieder 70 µl von Puffer 2 zugegeben. Anschliessend wurde nach kurzer Inkubation nochmals 70 µl von Puffer 3 zugegeben. Danach erfolgte die Aufnahme der Bilder.

definierter Frequenz erreicht werden. Der Federbügel wird bei seiner Eigenfrequenz zum Schwingen angeregt. Ein Laserstrahl wird auf den Federbügel fokussiert und von diesem über einen Spiegel in eine 4-Quadranten Photodiode weitergeleitet (Abb. 2.4).

Bei freier Schwingung des Federbügels schwinkt dieser Laserstrahl mit gleicher Amplitude auf der Photodiode. Kommt die Spitze in Kontakt mit einer Oberfläche, so wird die Schwingung des Federbügels gedämpft. Dies verursacht eine Ablenkung des Laserstrahls aus der Mitte der Photodiode, sowie einer Dämpfung der Laserschwingung. Dies führt zu einer Spannungsänderung an der Photodiode. Mittels eines elektronischen Regelkreises und eines piezoelektrischen Röhren-Scanners, der sich unterhalb des Probenhalters befindet, kann dieser in z-Richtung nach oben und unten verschoben werden, so dass die Amplitude der Ausgangsschwingung und die ursprüngliche Stellung an der Photodiode erreicht wird. Eine Bewegung in x- und y-Richtung ist ebenfalls möglich, so dass die Probe in der x-y-Ebene abgetastet werden kann. Durch Nachregulierung der z-Achse wird die Schwingungsamplitude konstant gehalten und aus der Bewegung des Scanners in z-Richtung ergibt sich ein topographisches Bild der abgetasteten Oberfläche.

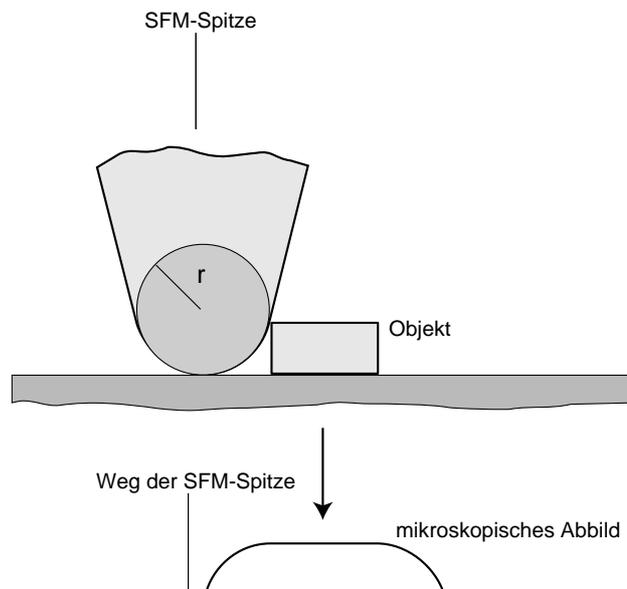


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Auflösungsvermögens im Rasterkraftmikroskop

Die Kräfte, die beim Annähern an die abzutastende Oberfläche zur Schwingungsdämpfung des Federbügels führen, sind neben elektrostatischen und van-der-Waals-Kräften, Kapillarkräfte zwischen der Spitze und dem Flüssigkeitsfilm, der die getrocknete Probe umgibt. Die Auflösung, die im Rasterkraftmikroskop erreicht werden kann, hängt von der Geometrie der Spitze ab. Die Auflösung wird vom Endradius der Spitze bestimmt. Für die laterale Auflösung der Probe gilt annähernd, dass sich Objekte um den Spitzendurchmesser verbreitern (Abb. 2.5). Abhängig von der verwendeten Spitze kann eine Auflösung von 5-10 nm erreicht werden.

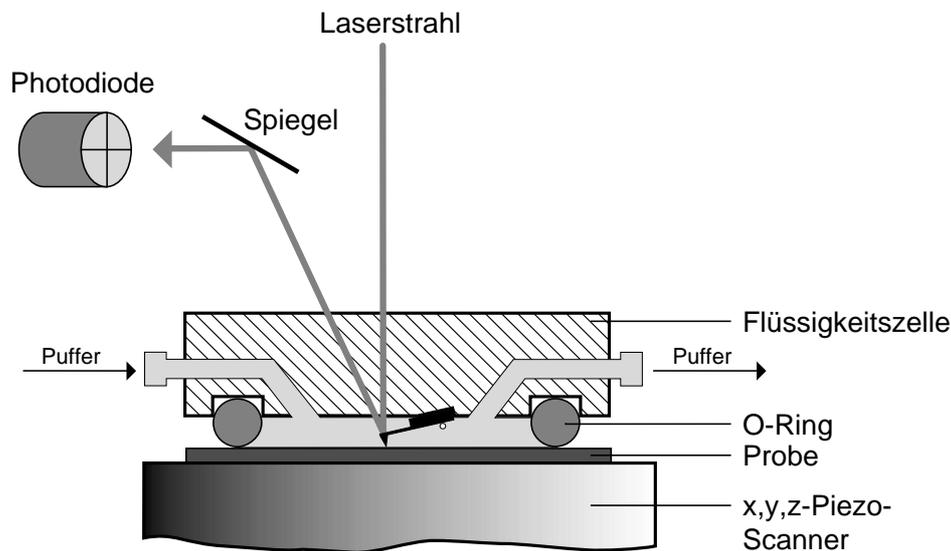


Abb. 2.6: Darstellung der Flüssigkeitsmesszelle im Rasterkraftmikroskop

Eine weitere Beeinträchtigung ergibt sich aus dem Umstand, dass bei Messungen in Luft die Proben getrocknet werden. Dies ist besonders für Proteinproben problematisch. Mit einer Flüssigkeitszelle (Abb. 2.6) lassen sich jedoch auch Proben ungetrocknet, also in physiologischen Pufferlösungen untersuchen. Durch zwei Kanäle kann während einer Messung die Pufferlösung ausgetauscht werden. Bei der Messung in Flüssigkeit umgeht man auch mögliche Trocknungsartefakte. Verwendet werden für Messungen in Flüssigkeit

etwas weichere Federbügel. Die Federbügel für die Messungen in Luft haben eine Federkonstante zwischen 10 und 60 N/m, wohingegen die Federn für Flüssigkeitsmessungen lediglich eine Federkonstante von etwa 2.5 N/m haben. Die Frequenzen, bei denen man die Federbügel zur Schwingung anregt, liegen in Luft bei etwa 250-270 kHz und in Flüssigkeit bei etwa 20 kHz.

Die Probe wird auf einer Glimmerscheibe abgetastet. Diese kann durch Abzug eines Tesafilmstreifens so gespalten werden, dass eine atomar glatte und reine Oberfläche entsteht. Diese Oberfläche ist negativ geladen. In Gegenwart von zweifach positiv geladenen Ionen kann die DNA, die durch ihr Desoxyribosephosphatrückgrat ebenfalls negativ geladen ist, auf dem Glimmer fixiert werden. Für Messungen in Luft wurden hierfür Puffer mit Mg^{2+} -Ionen verwendet, bei Flüssigkeitsmessungen wurden noch zusätzlich Ni^{2+} -Ionen verwendet, um die DNA noch stärker zu binden. Folgende Protokolle wurden verwendet:

5.1 Probenpräparation:

In den Rasterkraftmikroskopieexperimenten wurden die, mittels Salzdialyse hergestellten, Mononukleosomen untersucht (Kapitel 1.3). In Luft konnten Mononukleosomen mit und ohne H1 gemessen werden. In Flüssigkeit wurden Mononukleosomen ohne H1 untersucht. Zur Datenanalyse wurden die aufgenommenen Bilder mit dem Programm NIH Image v. 1.58 (National Institute of Health, Bethesda, MD) an einem Macintosh Computer ausgewertet. Es konnten die DNA-Konturlängen von freien DNA-Fragmenten und von Mononukleosomen gemessen werden. Die Position der assemblierten Nukleosomen wurde bestimmt, indem die Länge von einem Ende des Fragmentes bis zur Mitte des Proteinkomplexes durch die Gesamtlänge des Fragmentes geteilt wurde. Der Winkel zwischen ein- und austretendem Strang am Nukleosom wurde so bestimmt, dass die Richtungen der DNA-Stränge am Nukleosom als Schenkel des angelegten Winkels dienten. Die Messergebnisse wurden in dem Programm Kaleidagraph version 3.08 (Synergy software, PA) dargestellt. Für die Probenpräparationen kamen die folgenden 2 Protokolle zur Anwendung:

Protokoll 1 (Luft)

Der 0.5x HS Puffer (5 mM Hepes/KOH pH 7.5, 10 mM Mg-Acetat, 50 mM K-Acetat) wurde zu Beginn eines Messtages für mindestens 30 min auf 70 °C erhitzt. Die untersuchten Mononukleosomen wurden auf eine Konzentration von etwa 4 nM in dem 0.5x HS-Puffer verdünnt. Auf eine frisch gespaltene Glimmerscheibe wurden 10 µl einer solchen Lösung pipettiert und mit rund 30–50 ml Aqua dest. gewaschen. Anschliessend wurden die Probe mit Stickstoff für 4-5 min getrocknet. Die verwendeten Spitzen waren geätzte Silizium-Spitzen (Typ NCH, Nanosensors, Wetzlar, Deutschland)

Protokoll 2 (Flüssigkeit)

Es wurden 3 verschiedene Puffer verwendet:

Puffer 1: 1x NMDB (10 mM Hepes/KOH pH 8, 10 mM MgCl₂, 30 mM NaCl)

Puffer 2: 190 µl 1x NMDB + 10 µl 0.2 M NiSO₄

Puffer 3: 160 µl 1x NMDB + 40 µl 0.2 M NiSO₄

Die Mononukleosomen wurden in einem Volumen von 200 µl in 1x NMDB-Puffer zu einer Konzentration von 1.4 nM verdünnt. Puffer 1, 2 und 3 wurden für eine Stunde bei 70 °C erhitzt. Die verwendeten Spitzen (sss-FM, Nanosensors, Wetzlar, Deutschland) wurden eine Stunde unter UV-Licht bestrahlt, um diese zu härten. Die durch den O-Ring abgedichtete Flüssigkeitszelle wurde in einem ersten Schritt mit 1x NMDB-Puffer gefüllt. Dann wurden 70 µl der Nukleosomenlösung zugespritzt, einige Minuten inkubiert und dann wieder 70 µl von Puffer 2 zugegeben. Anschliessend wurde nach kurzer Inkubation nochmals 70 µl von Puffer 3 zugegeben. Danach erfolgte die Aufnahme der Bilder.

III. Ergebnisse

1. Protein- und Probencharakterisierung

1.1 DNA-Probencharakterisierung

Das 614 Bp lange DNA-Fragment konnte mit der PCR erfolgreich hergestellt werden. Ein natives PAA-Gel zeigte eine deutliche Bande, die dem 614 Bp langen Fragment entsprach. Nach der Aufreinigung über HPLC konnten noch kleinere Fragmente als das 614 Bp lange PCR-Hauptprodukt nachgewiesen werden. Deshalb wurde eine erneute PCR angesetzt und deren Produkte auf einem Agarosegel aufgereinigt. Diese Aufreinigung zeigte deutlich weniger kleinere Fragmente und wurde für die anschließenden Rekonstitutionen verwendet. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Aufreinigungsmethoden werden unter Punkt 4.1, Abschnitt Rasterkraftmikroskopie dargestellt.

1.2 SDS-Gelelektrophorese des Linker-Histons H1

Um das verwendete H1-Protein näher zu charakterisieren, wurde es zunächst auf einem analytischen SDS-Gel untersucht. Hierfür wurden verschiedene Mengen des Proteins geladen und nach dem Lauf mit Coomassie Brilliant Blue 250 gefärbt (siehe Material und Methoden 2.2). Aus dem Vergleich mit Markerproteinen bekannter Größe kann eine ungefähre Abschätzung auf das Molekulargewicht des betreffenden Proteins vorgenommen werden (Abb. 3.1). Das Histon H1 zeigte auf dem Gel eine Doppelbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 33 und 36 kDa. Aus der Sequenz errechnet sich ein Molekulargewicht von 21 kDa. Der Unterschied dieser Werte beruht darauf, dass das Protein H1 sehr viele Lysinreste besitzt, die dem Protein eine starke positive Ladung geben.

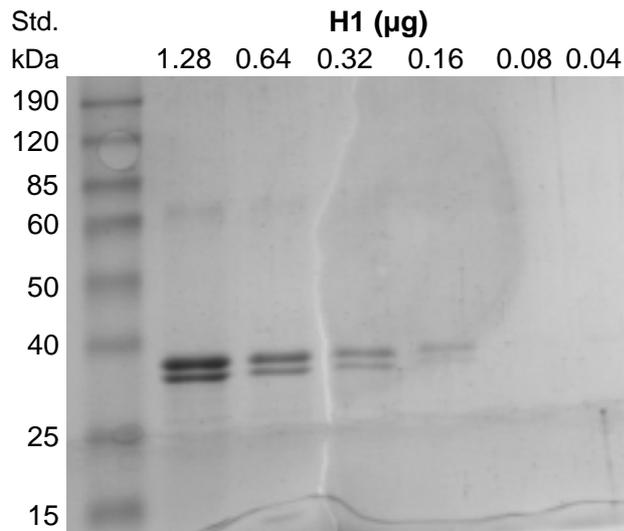


Abb. 3.1: SDS-PAA Gel von H1

Links Standardproteinmarker. Die Auftragsmenge von H1 in μg ist angegeben. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue 250 gefärbt. Im SDS-Gel läuft das verwendete H1 Protein als eine Doppelbande mit ca. 33 und 36 kDa. Die minimal detektierbare Proteinmenge betrug 0.16 μg .

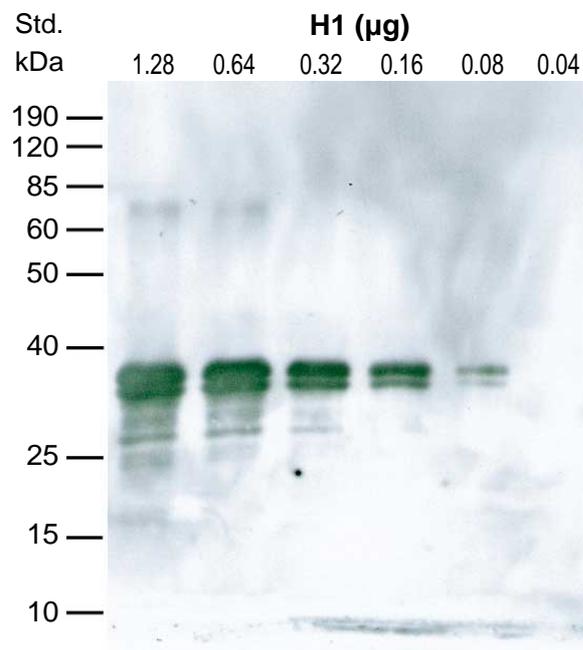


Abb. 3.2: H1 Western Blot

Detektion des Histons H1 mittels eines spezifischen Anti H1 Antikörpers auf einer Nitrozellulosemembran. Zusätzlich zu den im Gel sichtbaren Banden erkennt der Antikörper bei größeren Auftragsmengen kleinere Fragmente, bei denen es sich um H1-Abbauprodukte handeln könnte. Die minimal detektierbare H1 Menge betrug 0.08 μg .

1.3 Western Blot des Linker-Histons H1

Durch Western Blottechnik kann man mittels Antikörperbindung einzelne Proteine spezifisch in einem Gemisch verschiedener Proteine mit hoher Sensitivität sichtbar machen (Material und Methoden 2.3). Zunächst wurde überprüft, ob der Antikörper das Histon H1 überhaupt erkennt und wie sensitiv diese Reaktion ist. Es wurden analog zum SDS-Gel verschiedene H1-Mengen geladen. Es konnte wie im SDS-Gel eine Doppelbande des Histons H1 detektiert werden (Abb. 3.2). Die minimal detektierbare Menge betrug $0.08 \mu\text{g}$. Auf dem Western Blot traten bei höheren Konzentrationen noch zusätzliche Banden auf, die im SDS-Gel nicht detektiert werden konnten. Es handelt sich möglicherweise um Abbauprodukte des Proteins.

1.4 Charakterisierung der rekonstituierten Nukleosomen

Die mittels des Dialyseverfahrens assemblierten Nukleosomenkomplexe wurden auf einem nativen PAA-Gel untersucht (Abb. 3.3).

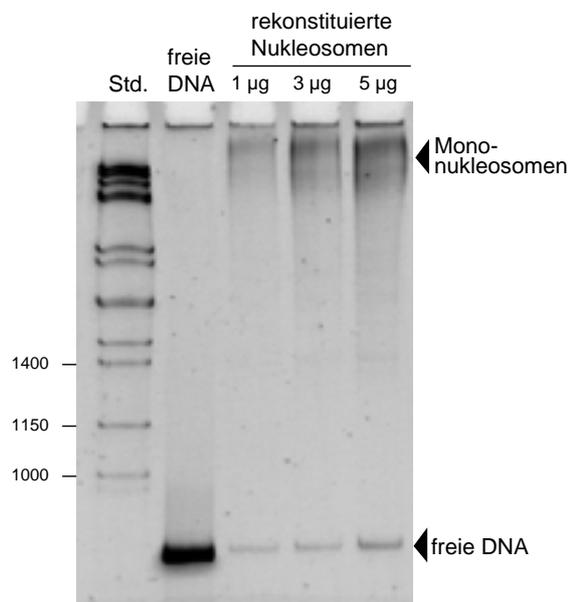


Abb. 3.3: Natives PAA-Gel von rekonstituierten Nukleosomen

Die rekonstituierten Nukleosomen wurden auf einem 8%igen PAA-Gel aufgetrennt. Es wurden jeweils 1, 3 und $5 \mu\text{g}$ eines Rekonstitutionsdialyseansatzes geladen.

Die rekonstituierten Mononukleosomen liessen sich auf dem nativen PAA-Gel von der freien DNA gut trennen. Man erhielt jedoch keine diskrete Bande für die Mononukleosomen, da eine Mischung von verschieden positionierten Mononukleosomen vorlag.

2. Analytische Ultrazentrifugation

Im Gleichgewichtssedimentationslauf sollte die Bindung des Proteins H1 an eine 20 Bp lange DNA Sequenz bestimmt werden. Ziel war es, die Anzahl der DNA-Bindungsstellen des Proteins zu ermitteln. Mit dem Gleichgewichtssedimentationslauf lassen sich sehr präzise Molekulargewichte bestimmen (s. Material und Methoden 3.1).

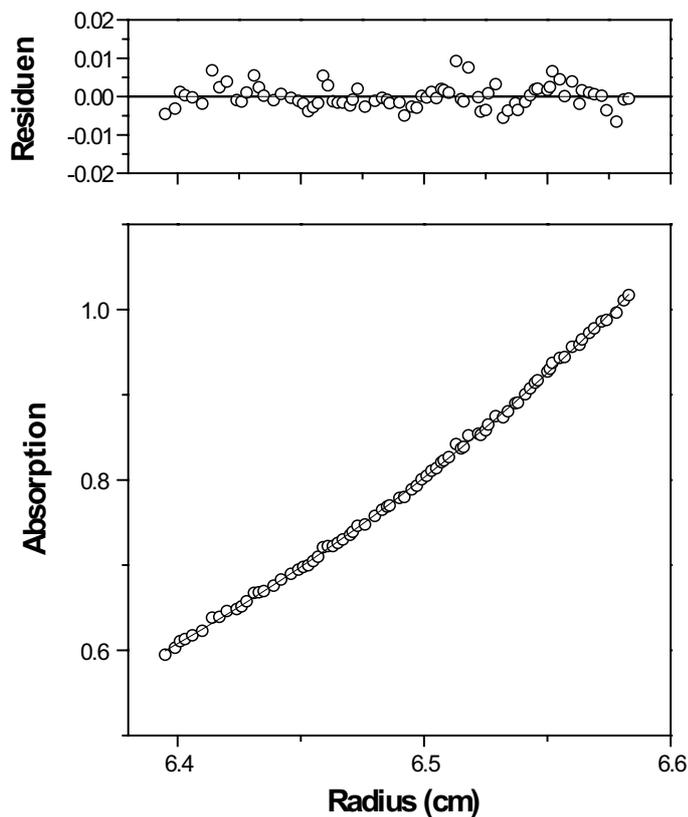


Abb. 3.4: Absorptionsprofil einer Probenzelle in der AUZ

Dargestellt ist die Absorption innerhalb einer Probenzelle bei 10 000 Umdrehungen/min (Probe P8). Der Radius r gibt den Abstand vom Rotormittelpunkt an. Die gemessenen Absorptionsdaten sind mit Gl.4 angepasst worden. Die Residuen geben die Abweichung der Anpassungsfunktion von den Messwerten an. Das Molekulargewicht der ersten Komponente (freie DNA) wurde bei 13 kDa fixiert. Mit einem partialspezifischen Volumen von $0.62 \text{ cm}^3/\text{g}$ ergab sich ein Molekulargewicht von 28 kDa für die zweite Komponente. Der Anteil freier DNA lag bei 9%.

Aus diesen Molekulargewichten lässt sich dann auf die Zusammensetzung der verschiedenen Komplexe zurückschließen. Ein typisches Absorptionsprofil und eine daran angepasste Funktion nach Gl.4 zeigt die Abb. 3.4. Für die Probe, in der nur DNA vorgelegt hat, wurde nur eine Komponente angenommen, die mit Gl. 3 gut angepasst werden konnte. Für die unterschiedlichen Drehzahlen ergaben sich dann folgende Molekulargewichte für die freie DNA:

10 000 Umdrehungen: $M = 12.2 \text{ kDa}$

15 000 Umdrehungen: $M = 12.3 \text{ kDa}$

20 000 Umdrehungen: $M = 12.2 \text{ kDa}$

Der Mittelwert für die DNA lag bei $12.3 \pm 0.1 \text{ kDa}$ im Vergleich zu dem aus der Sequenz berechneten theoretischen Wert von 13.2 kDa . Für die weiteren Auswertungen wurde für die freie DNA ein Molekulargewicht von 13 kDa verwendet. In den Proben 2-8 lag ein Konzentrationsverhältnis von Protein zu DNA von 1:3.5 bis 3:1 vor (Material und Methoden 3.2, Tabelle 1). Jeweils die letzten Scans einer jeden Drehzahl wurden ausgewählt und die Daten mit einer Fitfunktion für zwei Komponenten (Gl. 4) angepasst. Für die zweite Komponente wurde ein partialspezifisches Volumen von $0.62 \text{ cm}^3/\text{g}$ angenommen, was einem Komplex aus drei DNA und einem H1-Protein entspricht. Eine Anpassung der Daten an eine Funktion, die als zweite Komponente einen Komplex aus 2 DNA und einem Protein-H1 berücksichtigte, führte zu systematischen Abweichungen der angepassten Funktion (s. u.). Die Proben 5 und 6, mit einem Protein : DNA Verhältnis von 0.7 : 1 bzw. 1 : 1 zeigten eine starke Aggregation und konnten daher nicht ausgewertet werden. Es ergab sich die in Abb. 3.5 gezeigte Verteilung der Molekulargewichte für die zweite Komponente (erste Komponente für freie DNA wurde auf 13 kDa fixiert, zweite Komponente frei gelassen, eingesetztes partialspezifisches Volumen für die zweite Komponente: $0.62 \text{ cm}^3/\text{g}$). Das Molekulargewicht der zweiten Komponente in den Proben 1 bis 3 betrug etwa 60 kDa (P1: 61.3 kDa , P2: 59.1 kDa , P3: 60.8 kDa). Das Molekulargewicht der zweiten Komponente in den Proben 7 bis 9 lag bei etwa 29 kDa (P7: 29.1 kDa , P8: 28.3 kDa , P9: 28.2 kDa).

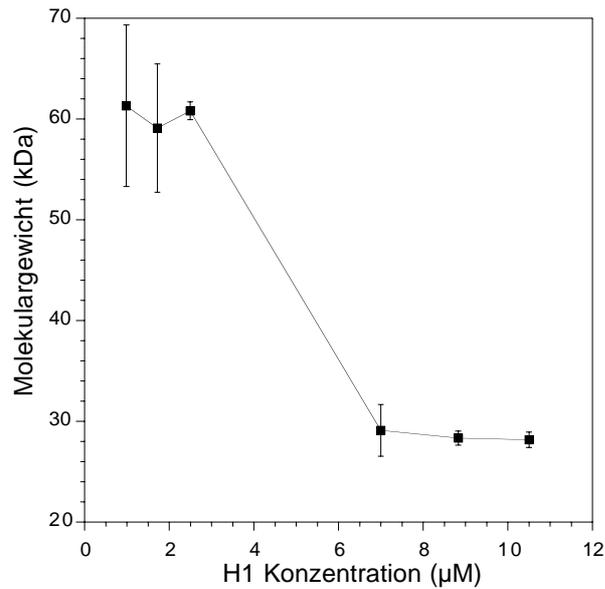


Abb. 3.5: Molekulargewicht des H1-DNA Komplexes

Verlauf der Molekulargewichte der zweiten Komponente unter H1-Zugabe. Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Drehzahlen. Die Fehler entsprechen der Standardabweichung dieser Mittelwerte. Angepasst wurden die Daten des Laufes basierend auf Gleichung 4.

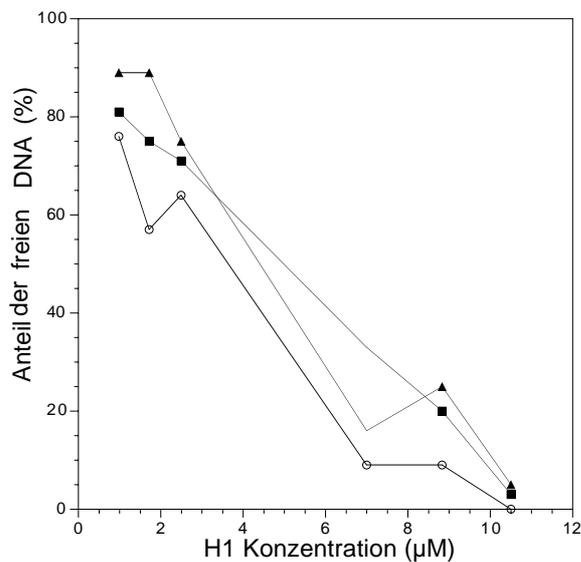


Abb. 3.6: Anteil der freien DNA im Gleichgewichtssedimentationslauf

Verlauf der Konzentration der freien DNA unter steigenden Proteinkonzentrationen. Dargestellt sind die drei verschiedenen Drehzahlen 10000 rpm (○), 15000 rpm (■) und 20000 rpm (△).

Eine weitere Auswertung ermöglichte es, den Anteil der freien DNA in den verschiedenen Proben zu ermitteln (Abb. 3.6). Der Prozentsatz der freien DNA, gemittelt über die drei Drehzahlen, konnte wie folgt bestimmt werden: P2: 82%, P3: 73%, P4: 71%, P7: 19%, P8:

18%, P9: 3%. Bei höherer Drehzahl war auch der Anteil von freier DNA größer. Je höher die Drehzahl war, desto mehr Komplexe aus DNA und H1 wurden bereits während des Laufes abzentrifugiert (Abb. 3.6). Da der Fitfunktion als wichtigen Parameter das partialspezifische Volumen eines Komplexes aus drei DNA und einem H1 für die zweite Komponente vorgegeben wurde, ergeben sich für die Molekulargewichte der letzten drei Proben falsche Werte. Hier liegen offensichtlich keine so großen Komplexe mehr vor. Es ist viel mehr anzunehmen, dass sich Komplexe aus einer DNA und einem H1 in der Lösung befinden. Da das partialspezifische Volumen für einen solchen Komplex ebenfalls bekannt ist, kann auf das korrekte Molekulargewicht zurückgerechnet werden. Es gilt folgende Beziehung:

$$M_1 \cdot (1 - v_1 \cdot \rho) = M_2 \cdot (1 - v_2 \cdot \rho) \quad (6)$$

$$M_2 = M_1 \cdot \frac{(1 - v_1 \cdot \rho)}{(1 - v_2 \cdot \rho)} \quad (7)$$

Somit ergeben sich folgende Werte für die gemittelten Molekulargewichte der beiden Komplexe, die bestimmt werden konnten.

| | Mittleres Molekulargewicht | theoretischer Wert |
|---------------|----------------------------|---------------------|
| Probe 2, 3, 4 | 60.4±4.9 kDa | 60.6 kDa (H1+3 DNA) |
| Probe 7, 8, 9 | 33.9±1.6 kDa | 34.2 kDa (H1+1 DNA) |

Tabelle 2: Molekulargewichte der H1-DNA Komplexe

Gemittelte Molekulargewichte bei 10-,15- und 20 000 Umdrehungen. Proben 2, 3 und 4 mit einem $v = 0.62$ cm³/g angepasst; Proben 7, 8 und 9 mit einem $v = 0.68$ cm³/g gemäß Gleichung 6 berechnet.

In einer weiteren Auswertung wurde überprüft, ob die Daten der Proben P2-P4 auch durch eine Funktion angepasst werden konnte, die als zweite Komponente einen Komplex aus einem H1 Protein und zwei DNA annahmen. Hierzu wurde das entsprechende partialspezifische Volumen von $0.638 \text{ cm}^3/\text{g}$ verwendet (s. Material und Methoden 3.2). Bei der Anpassung der Funktion an die Messdaten wurde das Molekulargewicht der freien DNA wieder bei 13 kDa fixiert. Ebenso wurde das Molekulargewicht der zweiten Komponente bei 47kDa fixiert, was einem Komplex aus zwei DNA und einem H1 entspricht. Es zeigte sich, dass die Anpassung an die Messwerte mit diesen Parametern schlechter war. Denn die Residuen zeigten eine systematische Abweichungen von Fitfunktion und experimentellen Daten (Abb. 3.7, Abb. 3.8).

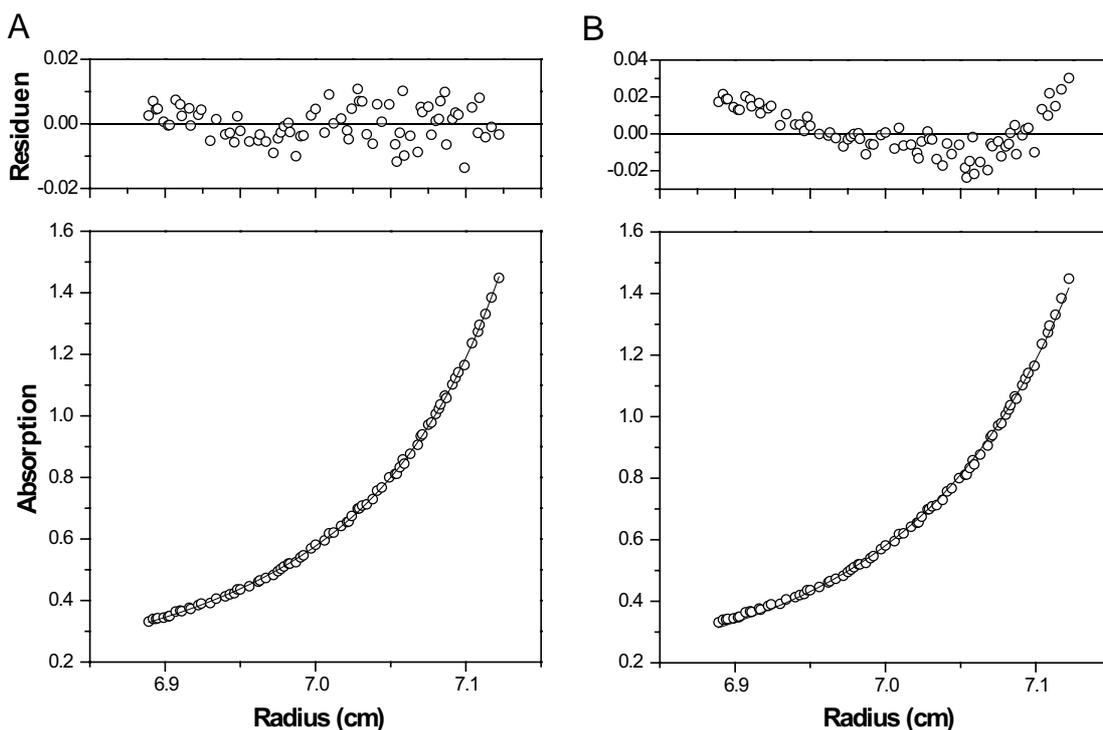


Abb. 3.7: Konzentrationsverteilung der Probe 3 angepasst mit verschiedenen Modellen
 (A) Absorptionsprofil der Probe P3 im Gleichgewicht bei 15 000 Umd/min. Die Messdaten wurden nach Gl.4 (s. Material und Methoden 3.1) angepasst. Es wurde ein partialspezifisches Volumen von $0.62 \text{ cm}^3/\text{g}$ für die zweite Komponente vorgegeben. Das Molekulargewicht der zweiten Komponente wurde nicht fixiert. Es ergab sich ein Wert von 57 kDa. (B) Hier erfolgte eine Anpassung wieder nach Gl.4. Es wurde ein partialspezifisches Volumen von $0.638 \text{ cm}^3/\text{g}$ vorgegeben. Das Molekulargewicht der zweiten Komponente wurde bei 47 kDa fixiert. Die Anpassung zeigt eine deutliche systematische Abweichung von den Messdaten.

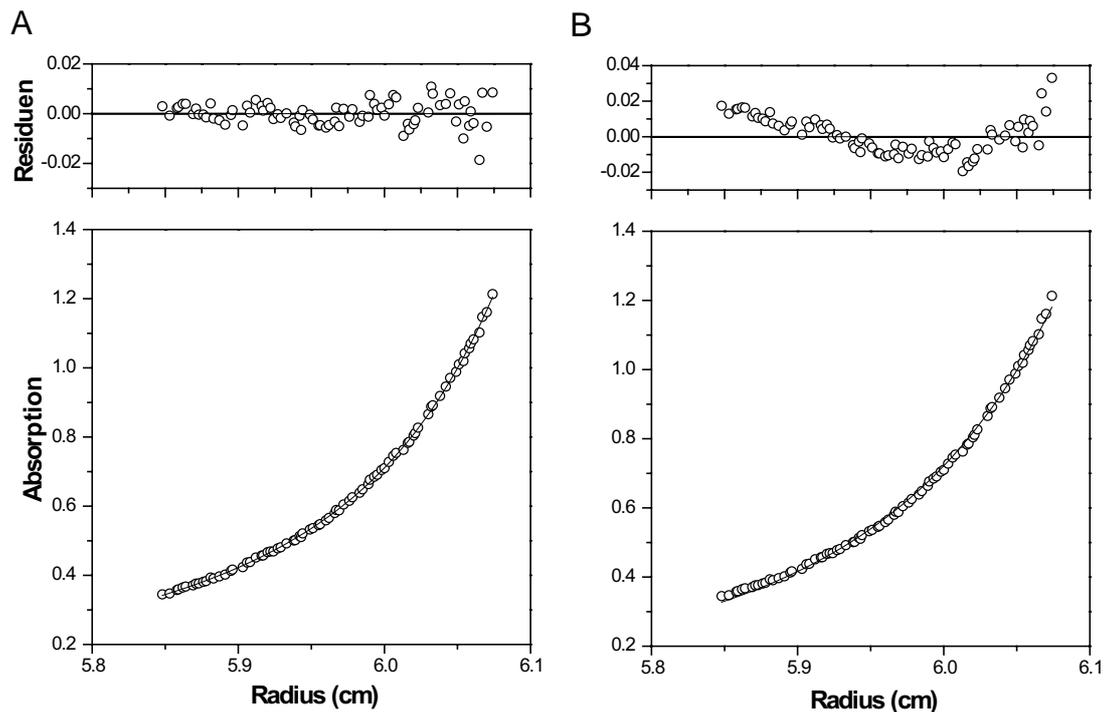


Abb. 3.8: Konzentrationsverteilung der Probe 4 angepasst mit verschiedenen Modellen
 (A) Absorptionsprofil der Probe P4 im Gleichgewicht bei 15 000 Umd/min. Die Messdaten wurden nach Gl.4 (s. Material und Methoden 3.1) angepasst. Es wurde ein partielspezifisches Volumen von $0.62 \text{ cm}^3/\text{g}$ für die zweite Komponente vorgegeben. Das Molekulargewicht der zweiten Komponente wurde nicht fixiert. Es ergab sich ein Wert von 60 kDa. (B) Hier erfolgte eine Anpassung wieder nach Gl.4. Es wurde ein partielspezifisches Volumen von $0.638 \text{ cm}^3/\text{g}$ vorgegeben. Das Molekulargewicht der zweiten Komponente wurde bei 47 kDa fixiert. Die Anpassung zeigt eine deutliche systematische Abweichung von den Messdaten

3. Fluoreszenzanisotropie

3.1 Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindung von Histon H1 an freie DNA

Mit Hilfe der Fluoreszenzanisotropie wurde die Bindungsaffinität des Proteins H1 an eine 20 Bp lange DNA Sequenz untersucht. Hierbei wurden die Bedingungen bei der H1-Titration so gewählt, dass gleiche Pufferbedingungen und DNA-Konzentrationsverhältnisse wie bei den Rasterkraftmikroskopieexperimenten vorlagen. Die gemessene Anisotropieänderung konnte mit einer Fitfunktion, die die Bindung von einem H1-Molekül an eine DNA beschreibt, angepasst werden (Abb. 3.9). Es wurden 3 verschiedene Fitfunktionen gewählt. Bei einer ersten Anpassung wurden die Werte für die minimale und maximale Anisotropie

r_{\min} und r_{\max} nicht fixiert. Es ergab sich eine Dissoziationskonstante (K_D) von $9 \cdot 10^{-8}$ M. Bei der zweiten Anpassung an die Daten wurde r_{\min} bei einem Wert von 0.15 fixiert. Es ergab sich eine Dissoziationskonstante von $1.1 \cdot 10^{-7}$ M. Bei einer weiteren Anpassung wurde sowohl $r_{\min} = 0.15$ als auch $r_{\max} = 0.224$ festgehalten. Die Dissoziationskonstante lag hierfür bei $8.4 \cdot 10^{-8}$ M. Die Güte der Anpassung der Fitfunktion an die Daten kann durch den Parameter R nach Pearson angegeben werden. Dabei ist ein Wert von 1 eine ideale Anpassung. Mit freien Werten für r_{\min} und r_{\max} erhält man ein $R = 0.977$. Ein fixiertes $r_{\min} = 0.15$ liefert für die Anpassfunktion ein $R = 0.971$. Werden sowohl r_{\min} als auch r_{\max} mit den angegebenen Werten fixiert erhält man $R = 0.962$. Es ergaben sich also bei allen drei Ansätzen ähnlich gute Anpassungen mit einer Dissoziationskonstante von $K_D \approx 10^{-7}$ M. Die Salzkonzentration der Titration war 5 mM Hepes/KOH pH 7.5, 10 mM Mg-Acetat, 50 mM K-Acetat.

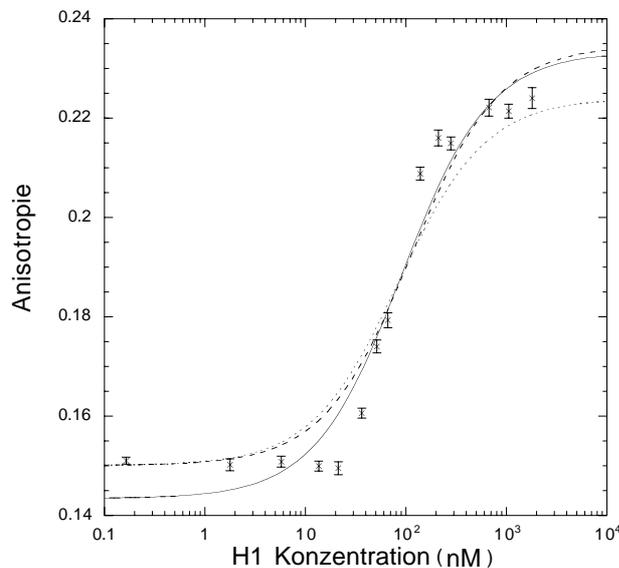


Abb. 3.9: H1 Anisotropie Titration

Titration einer 20 Bp langen DNA (4 nM) mit dem Histon H1. Es wurde eine 4 nM DNA-Lösung vorgelegt und mit dem Histon H1 bis zu einem über 400fachen Proteinüberschuss titriert. Nach Zugabe des Proteins wurde so lange gemessen, bis die Anisotropie annähernd konstant blieb. Jeder Messwert stellt den Mittelwert von 20 Einzelmessungen dar. Der Fehler ergibt sich aus der Standardabweichung von diesem Mittelwert. Dargestellt sind die 3 verschiedenen Fitfunktionen. Die durchgezogene Linie stellt die Bindungskurve bei freien Werten für r_{\min} und r_{\max} dar ($K_D = 9.1 \cdot 10^{-8}$ M). Die fein gepunktete Kurve ergibt sich für fixierte $r_{\min} = 0.15$ und $r_{\max} = 0.224$ ($K_D = 8.4 \cdot 10^{-8}$ M). Für eine fixiertes $r_{\min} = 0.15$ erhält man ein $K_D = 1.1 \cdot 10^{-7}$ M.

4. Rasterkraftmikroskopie

Bei den Rasterkraftmikroskopieexperimenten wurden die rekonstituierten Nukleosomen in Luft und in Flüssigkeit untersucht. Es konnten wichtige Strukturparameter von Nukleosomen mit und ohne H1 ermittelt werden. Ebenso wurden die freien DNA-Fragmente vermessen. Die Probenpräparation wurde gemäß den angegebenen Protokollen (Material und Methoden 5.1) durchgeführt. Typische Bilder für die Messungen in Luft und Flüssigkeit sind in Abb. 3.10 gezeigt:

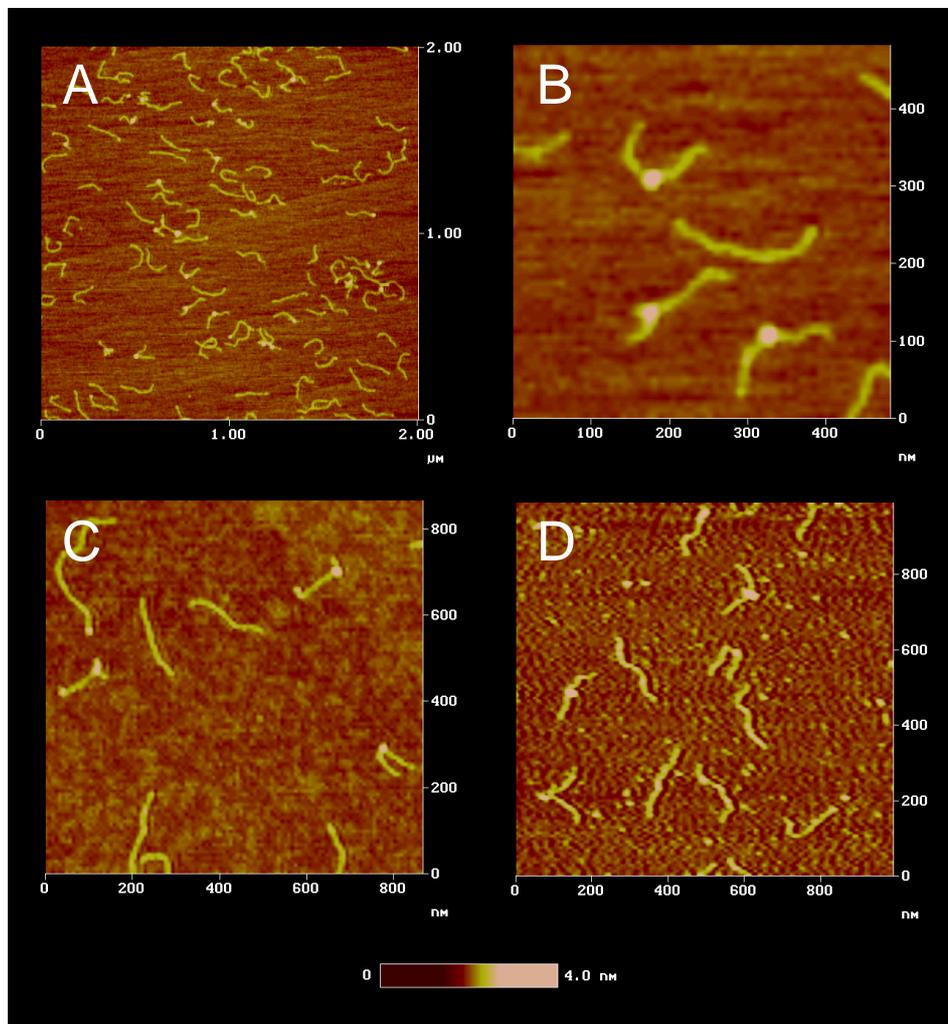


Abb. 3.10: Rasterkraftmikroskopiebilder von Mononukleosomen

(A) Übersichtsbild einer Präparation von Nukleosomen ohne H1 in Luft. (B) Detailansicht des in (A) dargestellten Bildes. (C) Präparation einer Nukleosomenprobe mit H1 in Luft. (D) Präparation einer Nukleosomenprobe ohne H1 in Flüssigkeit.

4.1 Bestimmung der Länge der freien DNA

Zuerst wurden die mittels PCR hergestellten und durch HPLC aufgereinigten Fragmente (siehe Material und Methoden 1.2) charakterisiert. Die Längen der DNA-Fragmente wurden bestimmt und die sich daraus ergebende Verteilung in einem Histogramm dargestellt. In einem weiteren Schritt wurden Fragmente vermessen, die nach der PCR aus einem Agarosegel aufgereinigt wurden (siehe Material und Methoden 1.3). Die Verteilung der gemessenen Längen der freien DNA-Fragmente, nach Aufreinigung über HPLC, konnte mit zwei Gaußfunktionen angepasst werden. Die Verteilung zeigte ein Maximum bei 189 ± 16 nm (Abb. 3.11). Die Probe, die aus dem Gel aufgereinigt wurde, konnte ebenfalls mit einer Gaußfunktion angepasst werden. Das Maximum der Verteilung lag bei 190 ± 9 nm (Abb. 3.12). Durch die Gelaufreinigung konnte eine bessere Abtrennung der kleineren Fragmente erzielt werden. Für die weiteren Experimente wurden ausschliesslich Fragmente aus der Gelaufreinigung verwendet.

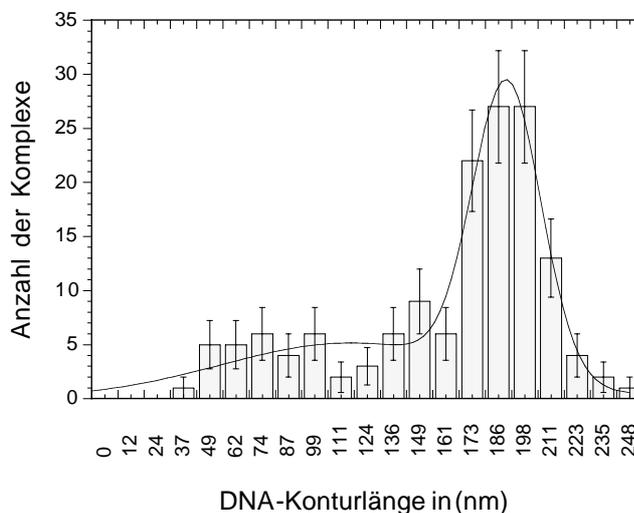


Abb. 3.11: DNA-Konturlängenverteilung von HPLC aufgereinigten DNA-Fragmenten

Längenverteilung der freien DNA-Fragmente, die mittels der PCR hergestellt und durch HPLC aufgereinigt wurden. Probenpräparation (s. Material und Methoden 1.2). Es ergab sich ein Maximum der Gaußverteilung bei 189 ± 16 nm.

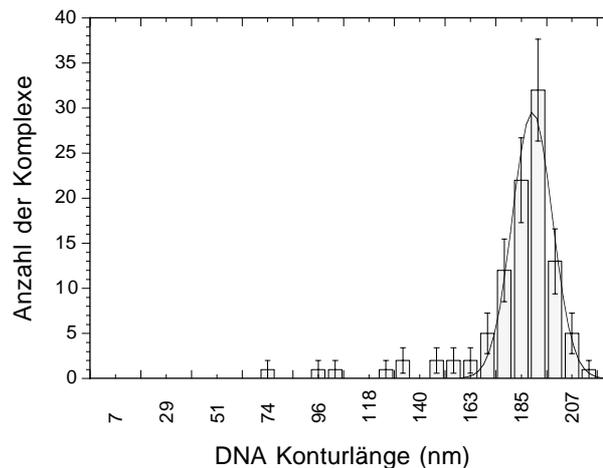


Abb. 3.12: DNA-Konturlängenverteilung von Gel aufgereinigten DNA-Fragmenten
Längenverteilung der DNA-Fragmente nach Gelaufreinigung. Probenpräparation (s. Material und Methoden 1.3). Es ergab sich ein Maximum der Gaußverteilung bei 190 ± 9 nm.

4.2 Charakterisierung von rekonstituierten Mononukleosomen

Untersucht wurden hierbei, die auf dem 614 Bp Fragment mittels Salzdialyse rekonstituierten Mononukleosomen. An Fragmenten, die offensichtlich einen Proteinkomplex gebunden hatten, wurde die Konturlänge der DNA bestimmt. Hierzu konnte wie bei der Bestimmung der Konturlänge der freien DNA vorgegangen werden. Die Lage des Nukleosoms wurde so bestimmt, dass von einem Ende des DNA-Fragments bis zur Mitte des Nukleosomenkomplexes die Distanz gemessen wurde und anschliessend durch die gemessene Konturlänge dieses Moleküls geteilt wurde. Ausserdem wurde der Winkel zwischen ein- und austretendem DNA-Strang am Nukleosom gemessen. Als Schenkel des angelegten Winkels dienten die Richtungen des ein- und austretenden Stranges. Die dargestellten Winkelverteilungen in Luft konnten an verschiedenen Messtagen reproduzierbar gemessen werden. Die Abbildungen sind Zusammenfassungen mehrerer Messungen.

Positionen der gebundenen Nukleosomen

Wie beschrieben wurde die Lage der Nukleosomenkomplexe auf der 614 Bp langen DNA bestimmt. Es konnten so Werte zwischen 0 (ganz aussen) und 0.5 (Mitte) erreicht werden.

Für die Position der Nukleosomen ergab sich eine breite Verteilung mit zwei Maxima (Abb. 3.13). Die Mitte der Nukleosomenbindungsstelle aus der *Xenopus borealis* rRNA Sequenz befand sich an Position 0.5. Neben dem gefundenen Maximum von ≈ 0.45 , das nahe der Positionierungssequenz liegt, konnte ein zweites Maximum bei einer Position von etwa 0.24 bestimmt werden. Die Verteilungsmuster bei Messungen in Luft und in Flüssigkeit scheinen sich nicht signifikant zu unterscheiden. Die Nukleosomen assemblieren nicht nur an der starken Bindungssequenz, sondern können auch abseits dieser positioniert werden.

DNA-Konturlängen von Mononukleosomen

Für die Mononukleosomen ohne H1 ergab sich in Luft eine DNA-Konturlänge von 158 ± 13 nm und in Flüssigkeit von 163 ± 11 nm. Für Mononukleosomen mit H1 und in Luft ergab sich eine Länge von 156 ± 12 nm (Abb. 3.14). Dies entspricht einer Verkürzung von etwa 31 nm gegenüber der freien DNA. Es lassen sich keine signifikanten Veränderungen zwischen Messungen in Luft und in Flüssigkeit, sowie zwischen Mononukleosomen mit und ohne H1 feststellen.

Nukleosomen Ein- und Austrittswinkel

Die Winkelverteilung für Mononukleosomen ohne H1 in Luft liess sich mit einer Summe von zwei Gaußfunktionen anpassen. Es konnten zwei Maxima bei $67 \pm 21^\circ$ und $143 \pm 40^\circ$ ermittelt werden. Für Flüssigkeitsmessungen an Mononukleosomen ohne H1 wurden Maxima bei $68 \pm 15^\circ$ und $127 \pm 36^\circ$ gefunden. Die Winkelverteilung in Luft für Mononukleosomen mit H1 ergab einen Mittelwert von $97 \pm 33^\circ$ (Abb. 3.15). Durch Zugabe von H1 verringert sich die Anzahl der Komplexe mit grossen Ein- und Austrittswinkel ($>120^\circ$) am Nukleosom. Es ergibt sich nur noch ein Maximum, bei $97 \pm 33^\circ$, in dem Verteilungsmuster. Die Messergebnisse für Mononukleosomen ohne H1 in Luft und Flüssigkeit zeigten ähnliche Winkelverteilungen.

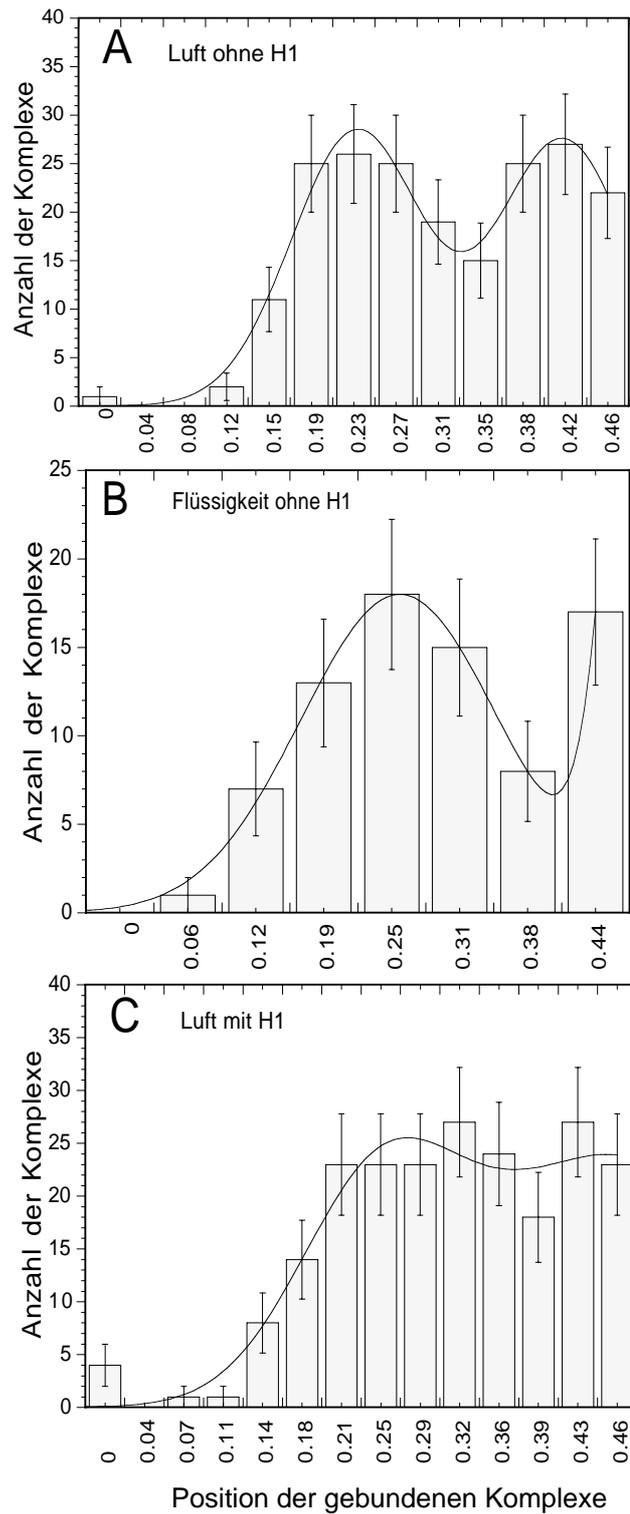


Abb. 3.13: Position der gebundenen Nucleosomen

(A) Nucleosomen in Luft ohne H1. Die Maxima der Gaußverteilungen lagen bei 0.23 ± 0.06 und 0.42 ± 0.06 . (B) Nucleosomen in Flüssigkeit ohne H1. Die Maxima der Gaußverteilungen lagen bei 0.25 ± 0.06 und 0.44 ± 0.06 . (C) Nucleosomen in Luft mit H1. Die Maxima der Gaußverteilungen lagen bei 0.25 ± 0.07 und 0.46 ± 0.12 .

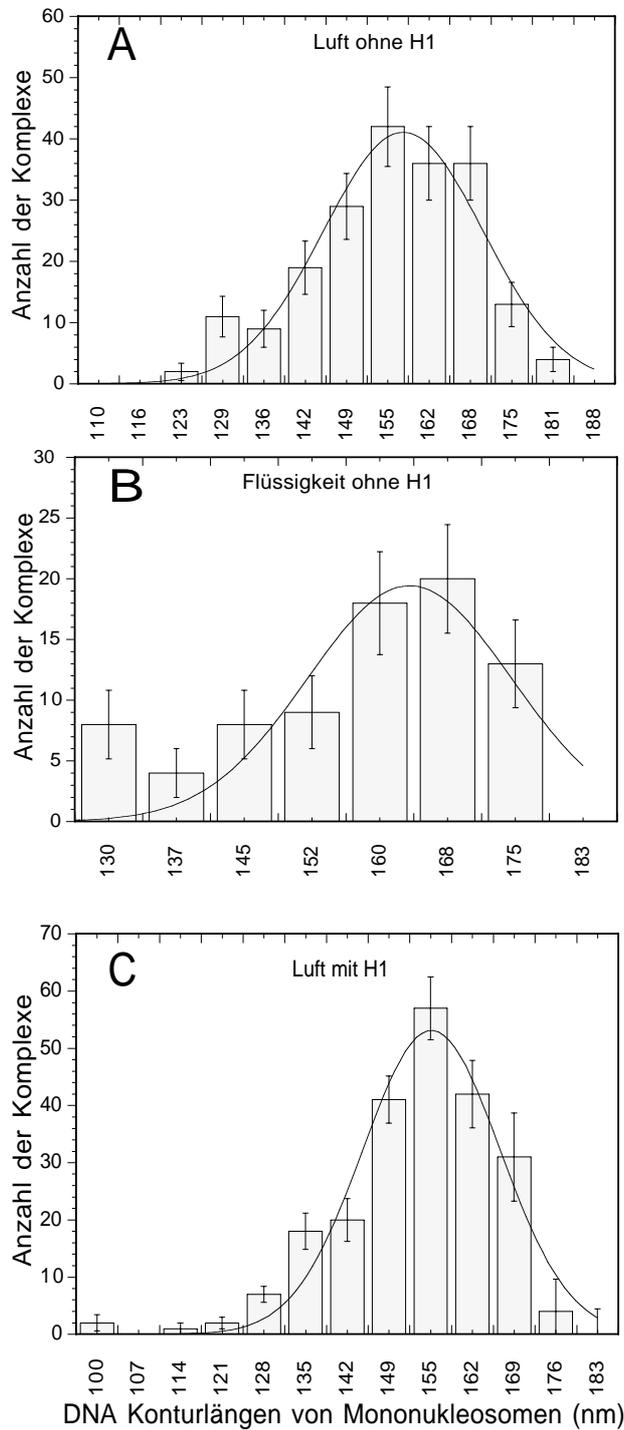


Abb. 3.14: Verteilung der Konturlängen von Mononucleosomen

(A) Konturlängen von Nucleosomen in Luft ohne H1. Das Maximum der Gaußverteilung lag bei 158 ± 13 nm. (B) Konturlängen von Mononucleosomen in Flüssigkeit ohne H1. Das Maximum der Gaußverteilung lag bei 163 ± 11 nm. (C) Konturlängen von Nucleosomen in Luft mit H1. Das Maximum der Gaußverteilung lag bei 156 ± 12 nm.

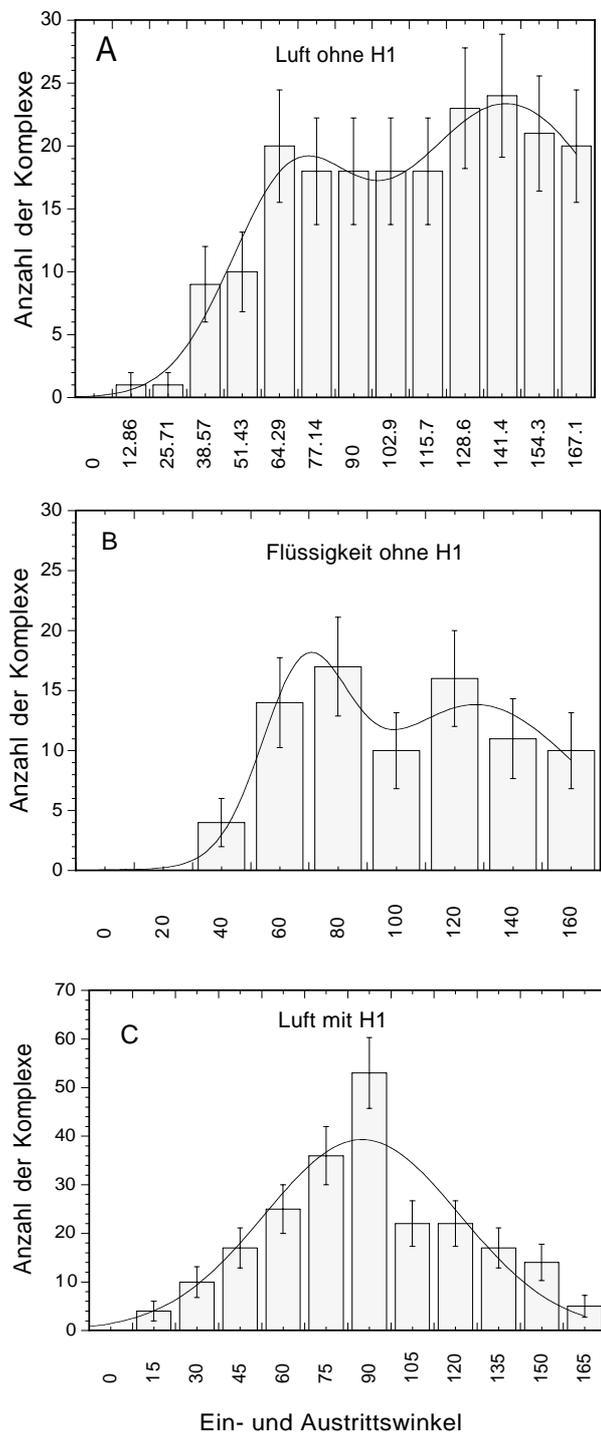


Abb. 3.15: Ein- und Austrittswinkel an Mononucleosomen

(A) Winkelverteilung für Mononucleosomen ohne H1 in Luft. Die Maxima der Gaußverteilungen lagen bei $67 \pm 21^\circ$ und $143 \pm 40^\circ$. (B) Winkelverteilung von Mononucleosomen ohne H1 in Flüssigkeit. Die Maxima der Gaußverteilungen lagen bei $68 \pm 15^\circ$ und $127 \pm 36^\circ$. (C) Winkelverteilung für Mononucleosomen mit H1 in Luft. Der Mittelwert betrug $97 \pm 33^\circ$.

IV. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Effekt des Linker-Histons H1 auf die Konformation von Mononukleosomen untersucht, die mit den rekombinanten Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 rekonstituiert wurden. Dazu wurden die Mononukleosomen und H1 zunächst durch Gelelektrophorese und Western Blot charakterisiert. Dann wurden Komplexe von DNA bzw. Mononukleosomen mit H1 mit Analytischer Ultrazentrifugation (AUZ), Fluoreszenzanisotropie (FA) und Rasterkraftmikroskopie (SFM) untersucht. AUZ und FA haben den Vorteil, dass biologische Makromoleküle frei in Lösung und im thermodynamischen Gleichgewicht untersucht werden können. SFM erlaubt die Analyse von einzelnen Makromolekülen mit einer Auflösung im Nanometerbereich. Allerdings müssen die Komplexe an eine Oberfläche gebunden werden. Es ist jedoch möglich die Bildaufnahme in Pufferlösungen durchzuführen.

1. Protein- und Probencharakterisierung

1.1 Analyse von H1 durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Mit Hilfe von SDS-Gelen und Western-Blot wurde das Linker-Histon H1 näher charakterisiert und die Reinheit der Proteinprobe bestimmt. Besonders wichtig ist die Reinheit der verwendeten H1 Proben für rasterkraftmikroskopische Messungen, da diese Technik sehr empfindlich auf Verunreinigungen reagiert. Histon H1 aus Kalbsthymus zeigte auf SDS-Gelen eine Doppelbande, die bei ca. 33 und 36 kDa lief (Abb.3.1). Diese Banden entsprechen wahrscheinlich zwei unterschiedlich stark phosphorylierten H1 Proteinen (Biotechnology, 2001). Aus der Sequenz errechnet sich ein Molekulargewicht von 21 kDa. Das apparente Molekulargewicht auf dem SDS-Gel lässt sich durch das Vorhandensein zahlreicher Lysinreste im Protein erklären. Die Lysinreste besitzen eine basische

Aminogruppe, die dem Protein eine positive Ladung geben. Deshalb gilt für das Histon H1 die Annahme nicht, dass das Protein durch das gebundene SDS eine konstante negative Ladung pro Aminosäurerest erhält. Die dadurch verminderte Ladungsdichte im Vergleich mit den Standardmarkerproteinen führt dazu, dass das Protein im Gel langsamer läuft. Die kleinste Menge Protein, die auf einem Coomassie gefärbten Gel noch sichtbar gemacht werden konnte, betrug für das Protein H1 etwa 0.16 µg. Neben den beiden unterschiedlichen Varianten des Protein wurden keine weiteren Proteinbanden detektiert. Der Western Blot lässt noch 0.08 µg H1 erkennen, er war also nicht um Größenordnungen sensitiver als die Coomassiefärbung. Bei größerer Auftragsmenge erschienen zusätzliche Banden auf der Membran, die im Gel nicht sichtbar waren (Abb. 3.2). Da diese durch den Antikörper erkannt wurden, handelt es sich möglicherweise um Abbauprodukte des Proteins. Die relativ geringe Sensitivität des Western Blots erklärt sich durch die Tatsache, dass beim Transfer vom Gel auf die Nitrozellulosemembran immer eine deutliche Menge des Proteins im Gel zurückblieb.

1.2 Darstellung der rekonstituierten Nukleosomen auf nativen PAA-Gelen

Die mit einer Salzdialyse aus rekombinanten Histonen und einer 614 Bp langen DNA hergestellten Nukleosomen wurden auf einem nativen 8%igen PAA-Gel sichtbar gemacht (Abb. 3.3). Hierzu wurde die DNA mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt. Die Protein-DNA-Komplexe bewegen sich im Gel langsamer als die freie DNA.

Wie das Gel zeigt, konnten Mononukleosomen durch Salzdialyse rekonstituiert werden. Dass diese nicht als eine scharfe Bande im Gel laufen, liegt daran, dass es eine breite Verteilung bezüglich der Position der Nukleosomen auf dem DNA-Fragment gibt (Hamiche *et al.*, 1996). Die DNA wickelt sich in etwa 2 Windungen und 146 Bp um das Histonoktamer herum. Der ein- und austretende DNA-Strang am Nukleosom bildet ein Winkel der von 180° deutlich verschieden ist (Abb. 3.15). Dies führt zu einer effektiven

Krümmung der DNA um das Nukleosom. Sitzt das Nukleosom in der Mitte des DNA-Fragmentes treten zu beiden Seiten annähernd gleich lange DNA-Stücke aus. Je näher das Nukleosom an einem Ende des DNA-Fragmentes positioniert ist, desto asymmetrischer sind die Längen der austretenden DNA-Stücke verteilt. Fragmente, die ein Nukleosom in der Mitte assembliert haben und zu beiden Seiten des Nukleosoms annähernd gleich lange DNA-Stücke haben, wandern im Gel langsamer. Durch ihre Konformation werden diese Fragmente bei ihrer Bewegung durch die Poren des Geles stärker behindert als Fragmente, die eine asymmetrische Krümmung aufweisen. Der Effekt einer DNA-Krümmung auf das Laufverhalten in einem Gel konnte bereits gezeigt werden (Koo & Crothers, 1988).

2. Stöchiometrie der H1-DNA-Komplexe

Zur Charakterisierung der Bindung von Histon H1 an freie DNA wurde die analytische Ultrazentrifugation verwendet. Im Gleichgewichtssedimentationslauf der analytischen Ultrazentrifugation sollte die Anzahl der Bindungsstellen bestimmt werden, die das Histon H1 für DNA besitzt. Mit den, durch den Gleichgewichtssedimentationslauf bestimmbareren Molekulargewichten, kann auf die Zusammensetzung der verschiedenen Komplexe und die Anzahl der Bindungsstellen auf dem Histon H1 für freie DNA geschlossen werden. Zu diesem Zweck wurden Proben, die Histon H1 und ein 20 Bp langes DNA-Fragment in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen enthielten, untersucht.

In dem Gleichgewichtssedimentationslauf konnten zwei verschieden große Komplexe aus DNA und H1 bestimmt werden. Bei dem ersten Komplex, der sich bei niedrigen H1-Konzentrationen (H1 im Unterschuss zur DNA) bildet, könnte es sich um einen Komplex aus drei DNA-Fragmenten und einem H1-Protein handeln. Das entsprechende Molekulargewicht von 60.6 kDa wird erreicht (gemessen 60.4 ± 4.9 kDa), auch wenn die Werte bei verschiedenen Drehzahlen etwas schwanken und nicht ausgeschlossen werden kann, dass mehrere verschieden grosse Komplexe vorlagen. Das sich jedoch ein Komplex aus 3 DNA und einem H1 bildet ist nicht unwahrscheinlich. Es konnte bereits durch

Gelanalysen mit DNA-Kreuzstrukturen gezeigt werden, dass die globuläre Domäne des Histons H1 zwei DNA-Bindungsstellen besitzt (Goytisolo et al., 1996; Varga-Weisz et al., 1994). Auch zeigen neuere Untersuchungen des C-terminalen Bereichs des Histon H1 das Vorhandensein einer amphipathischen α -Helix (Vila et al., 2000). Diese könnte eine weitere DNA-Bindungsstelle auf dem Protein sein. Lag das Protein im Überschuss zur DNA vor, wurde im Gleichgewichtssedimentationslauf ein Molekulargewicht von 33.9 ± 1.6 kDa gefunden, das einem Komplex aus einer DNA und einem Histon H1 entspricht (theoretischer Wert 34.2 kDa). Dies erscheint sinnvoll, da bei einem Proteinüberschuss die Bindungsstellen auf dem Protein nicht gesättigt werden können. Die Proben P5 und P6, welche einem DNA:Protein Verhältnis von 1 beziehungsweise 0.7 entsprachen, zeigten starke Aggregation und konnten nicht ausgewertet werden.

3. Fluoreszenzanisotropiemessungen der Bindung von H1 an DNA

Mit Hilfe der Fluoreszenzanisotropie (FA) wurde die Bindung des Proteins H1 an eine 20 Bp lange DNA untersucht. Die Anisotropie gibt die Abnahme der Depolarisation von linear polarisiertem Licht nach Bindung des Proteins an die Farbstoff markierte DNA an (s. Material und Methoden 4.1). Mittels der FA konnte auf die Dissoziationskonstante des Komplexes aus DNA und H1 geschlossen werden. Die Fluoreszenzanisotropie ermöglicht es bei wesentlich geringeren DNA-Konzentrationen (4 nM), als die AUZ (3.5 μ M), zu messen. Im Falle der FA-Experimente wurden die Bedingungen so gewählt, dass sie den Verhältnissen bei den Rasterkraftmikroskopieexperimenten vergleichbar waren. Neben gleichen Pufferbedingungen (5 mM HEPES/KOH pH 7.5, 10 mM Mg-Acetat, 50 mM K-Acetat) lag auch die DNA-Konzentration (4 nM) in derselben Größenordnung (SFM: 1-6 nM). Die Daten der Anisotropie lassen sich mit einem Modell der Bindung von einem Protein an eine DNA anpassen. Die sich ergebende Dissoziationskonstante beträgt etwa 10^{-7} M. Aus dem Verlauf der Anisotropie wird deutlich, dass das Protein erst bei etwa 10fachem Überschuss an die freie DNA bindet. Dies ist in Hinsicht auf die rasterkraftmikroskopischen

Untersuchungen wichtig. Es kann so ausgeschlossen werden, dass das zu den Mononukleosomen zugegebene H1 unspezifisch an die DNA bindet. Unter den Bedingungen bei denen im Rasterkraftmikroskop gemessen wurde, kann das Protein wenn überhaupt nur an den Nukleosomen selbst gebunden sein.

Es ist ausserdem festzustellen, dass der Verlauf der Anisotropiekurve zunächst nicht mit den Beobachtungen des Gleichgewichtssedimentationslaufes zusammenpasst. Im Gleichgewichtssedimentationslauf wurden bei niedrigen H1 Konzentrationen zunächst Komplexe aus einem H1 und drei DNA-Fragmenten gebildet. Bei höheren Konzentrationen bildeten sich Komplexe aus einem H1 und einer DNA. Die Komplexe aus einem H1 und drei DNA sollten einen höheren Wert in der Anisotropie als die 1:1 Komplexe zeigen. Der Verlauf der Anisotropiekurve zeigt indes einen kontinuierlichen Anstieg mit steigender Proteinkonzentration. Jedoch ist zu beachten, dass bei dem Gleichgewichtssedimentationslauf nur wenige Komplexe aus drei DNA und einem Protein bei Proteinüberschuss gebildet wurden (maximal 25%). Da bei der Fluoreszenzanisotropie alle Teilchen zur Gesamtanisotropie beitragen, kommt es zu einer Signalüberlagerung beider Spezies. Das Modell der Bindung von einem H1 an eine DNA, das zur Anpassung der Anisotropiekurve (Abb. 3.7) verwendet wurde, berücksichtigt nicht das mögliche Vorhandensein anderer Komplexe. Obwohl die beiden Messungen daher nur bedingt vergleichbar sind, führen beide Messmethoden zu wichtigen Aussagen. Die Fluoreszenzanisotropie ermöglicht es, eine Bindung des Histons H1 in den rasterkraftmikroskopischen Versuchen an freie, nicht nukleosomale DNA auszuschliessen. Das angenommene Bindungsmodell gibt eine erste Abschätzung auf die Dissoziationskonstante von Histon H1 an freie DNA mit etwa 10^{-7} -M (5mM Hepes/KOH pH 7.5, 10 mM Mg-Aceat, 50 mM K-Acetat). Die Ergebnisse des Gleichgewichtssedimentationslaufes ermöglichen eine Aussage über die Anzahl der Bindungsstellen des Histons H1 für DNA. Das Protein trägt danach wahrscheinlich drei DNA-Bindungsstellen.

4. Rasterkraftmikroskopie

Durch Rasterkraftmikroskopie kann ein topographisches Bild einer Oberfläche mit einer Auflösung im Nanometerbereich erstellt werden. So ist es möglich von Mononukleosomen wichtige Strukturparameter zu bestimmen. Mit Hilfe einer quantitativen Bildanalyse konnten die Längen der DNA-Fragmente, die Position des gebundenen Nukleosoms auf der DNA, sowie der Ein- und Austrittswinkel zwischen den DNA-Strängen am Nukleosom gemessen werden. Diese Parameter erlauben Rückschlüsse über die Vorgänge bei der Kompaktierung der DNA in der 30-nm-Chromatinfiber.

4.1 Konturlänge der freien DNA

Das durch PCR (s. Material und Methoden 1.1) hergestellte 614 Bp lange DNA-Fragment wurde im Rasterkraftmikroskop zunächst in Abwesenheit von Protein untersucht. Die in der PCR hergestellte 614 Bp lange DNA wies nach der Aufreinigung über HPLC eine breite Längenverteilung auf (Abb. 3.11). Es ergab sich eine Verteilung, die das Vorhandensein mehrerer Fragmente unterschiedlicher Länge nahe legte. Das Auftreten von offensichtlich zu kleinen Fragmenten (≤ 140 nm) könnte durch mögliche Nebenprodukte aus der PCR erklärt werden. Diese kleineren Fragmente konnten mittels des HPLC Aufreinigungsschrittes nicht abgetrennt werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass Nukleasen in der Probe aktiv waren, die zu einer Degradation der Fragmente geführt haben. Da in den weiteren Experimenten Fragmente definierter Länge erwünscht waren, wurde eine erneute PCR durchgeführt und deren Produkte auf einem Agarosegel aufgereinigt. Die gemessenen Längen dieser Präparation zeigte dann die erwartete Form (Abb. 3.12). Es waren weniger kleine Fragmente in der Probe vorhanden, und auch der Mittelwert der gemessenen Fragmente von 190 ± 9 nm zeigt mit den bereits durchgeführten Messungen an den gleichen Fragmenten eine gute Übereinstimmung (Caudron, 2000). Der theoretische Wert einer 614

Bp langen DNA errechnet sich zu $614 \cdot 0.34 \text{ nm} \approx 209 \text{ nm}$. Aus bereits zuvor unternommenen Untersuchungen an freien DNA-Fragmenten war bekannt, dass aufgrund der Probenpräparation in Luft eine scheinbare Verkürzung der DNA mit 0.31-0.34 nm/Bp festzustellen ist (Rippe *et al.*, 1997; Rivetti *et al.*, 1996). Der gemessene Wert von 190 nm ist jedoch im Vergleich zu Messungen an Fragmenten, die aus Plasmiden ausgeschnitten wurden zu gering. Das ist wohl durch das Vorhandensein kleinerer Fragmente aus der PCR bedingt, die letztlich auch bei der Gelaufreinigung nicht völlig abgetrennt werden konnten. Dividiert man den gemessenen Mittelwert durch die Anzahl der Basenpaare des Fragmentes (190nm/614 bp) erhält man einen Wert von 0.31 nm/Bp. Für die B-DNA wurde ein Wert von 0.34 nm/Bp bestimmt (Leslie *et al.*, 1980). Mit diesen Vergleichsdaten kann man davon ausgehen, dass das Hauptprodukt der PCR, das 614 BP lange Fragment, erfolgreich hergestellt und aufgereinigt werden konnte.

4.2 Strukturparameter der Mononukleosomen

Position der gebundenen Mononukleosomen

Das verwendete 614 Bp lange Fragment trägt in der Mitte eine starke Positionierungsstelle für Nukleosomen. Aus der gemessenen Verteilung der Positionen der gebundenen Nukleosomenkomplexe (Abb. 3.13) wird deutlich, dass die Nukleosomen sich auch an anderen Stellen auf dem Fragment assemblieren können. Hierbei ist anzumerken, dass nur solche Nukleosomenkomplexe ausgewertet wurden, an denen ein Winkel zwischen ein- und austretendem Strang zu messen war. So wurden etwa 5-10 % der Komplexe, welche ein Nukleosom an dem einen oder anderen Ende des DNA-Fragmentes gebunden hatten, nicht ausgewertet. Wie beschrieben, sind Nukleosomen auf der DNA beweglich (Ramakrishnan, 1997). Bei Temperaturen von 37 °C konnten die Nukleosomen auf dem DNA-Strang verschoben werden (Gottesfeld *et al.*, 2001). Auch können bei der Probenpräparation für die Rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen die gebundenen Nukleosomen verschoben

worden sein. Ein ähnlicher Depositionierungseffekt konnte für die Bindung der RNA-Polymerase- σ^{54} an den *glnA* Promotor nachgewiesen werden (Schulz *et al.*, 1998). Dies und eine an sich schon statistisch bedingte Positionierung der Nukleosomen auf dem 614 Bp langen Fragment ergeben die gemessene breite Verteilung der Positionierung der Nukleosomenkomplexe. Bei Messungen in Flüssigkeit ist ein annähernd gleiches Verteilungsmuster der Positionierung der Nukleosomen wie bei Messungen in Luft festzustellen. Die Probenpräparation in Luft führt anscheinend zu keinen zusätzlichen Artefakten der Positionierung der Nukleosomen, im Vergleich mit der Probenfixierung in Flüssigkeit.

Scheinbare DNA-Konturlänge von Mononukleosomen

Die DNA-Konturlängen von Mononukleosomen wurden analog zu den Messungen von DNA-Konturlängen freier DNA-Fragmente durchgeführt. Die DNA-Konturlänge für Nukleosomen ohne H1 in Luft betrug 158 ± 13 nm, in Flüssigkeit 163 ± 11 nm. Für Nukleosomen mit H1 wurden in Luft 156 ± 12 nm gemessen (Abb. 3.14). Der Wert für freie DNA-Fragmente betrug 190 ± 9 nm (Abb. 3.10). Dies entspricht einer Verkürzung der DNA-Konturlänge von Nukleosomen gegenüber freien DNA-Fragmenten von ungefähr 31 nm. Dieser Wert scheint zunächst zu gering zu sein. Aus bisherigen Experimenten ist bekannt, dass sich 146 Bp DNA um den Nukleosomenkernkomplex wickeln (Luger *et al.*, 1997). Bei der Bestimmung der DNA-Konturlänge wird ein Teil der DNA, die durch das Nukleosom hindurchführt, fälschlicherweise der DNA-Konturlänge hinzu addiert. Dieser Wert kann aufgrund der unterschiedlichen Größen der Nukleosomenkomplexe in den rasterkraftmikroskopischen Bildern nicht eindeutig bestimmt werden. Dies ist durch die Verwendung unterschiedlich "scharfer" Spitzen, die die Auflösung der Aufnahmen direkt beeinflussen, bedingt. Aus diesen Gründen ist es deshalb nicht möglich, die exakte Länge der DNA, die sich um das Nukleosom herumwickelt, zu bestimmen. Nach einem anderen Verfahren kann die sogenannte versteckte DNA-Länge, die sich um das Nukleosom wickelt, bestimmt werden (Furrer *et al.*, 1995). Hierbei wird von der gemessenen Konturlänge der

freien DNA-Fragmente die Konturlänge der Mononukleosomen substrahiert und mit dem Verhältnis von der theoretischen Länge der freien DNA-Fragmente (in Bp) zu der tatsächlich gemessenen Länge (in nm) multipliziert (Furrer et al., 1995). Mit einer mittleren Verkürzung um 31 nm und dem Verhältnis von 614 Bp zu 190 nm, für die freien DNA-Fragmente, ergibt sich hierfür ein Wert von 101 Bp. Der erwartete Wert beträgt 83 Bp (Luger et al., 1997).

In DNA-Schutzexperimenten konnte bisher gezeigt werden, dass die Zugabe des Linker-Histons H1 zu Nukleosomen einen zusätzlichen Schutz von 20 Bp bewirkt (Duggan & Thomas, 2000). Bei solchen Experimenten werden die Nukleosomen mit *Micrococcus* Nuklease abgebaut. Dabei schützt das Nukleosom ohne Linker-Histon ein Fragment von 146 Bp Länge vor dem Abbau. Die Zugabe von Linker-Histon zu den Nukleosomen führt zu einer geschützten DNA-Länge von 166 Bp. Bei den Messungen in dieser Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der DNA-Konturlänge zwischen Mononukleosomen mit und ohne H1 ermittelt werden. Dies kann durch mehrere Überlegungen erklärt werden. Zum einen liegt im Bereich von 20 Bp, also etwa 7 nm, die Auflösungsgrenze des Rasterkraftmikroskops. Eine andere mögliche Erklärung kann darin liegen, dass ein erweiterter Nukleaseabbauschutz der nukleosomalen DNA nicht gleichbedeutend mit einer erhöhten Windungszahl am Nukleosom ist. Vielmehr kann der Schutz durch das Histon H1 auch durch Schutz flankierender Sequenzen erreicht werden, was dann nicht zu einer weiteren Verkürzung der DNA-Konturlänge führen müsste. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Messungen in Luft und Flüssigkeit. Dies ist wieder ein Indiz, dass die Probenpräparation in Luft zu keinen zusätzlichen Artefakten führt.

Ein- und Austrittswinkel der nukleosomalen DNA

Der Winkel zwischen den ein- und austretenden DNA-Strängen am Nukleosom wurde so bestimmt, dass die direkten Austrittsrichtungen der DNA-Stränge am Nukleosom als Schenkel des angelegten und gemessenen Winkels dienten. Die Messungen an Mononukleosomen in Luft ohne H1 ergaben eine breite Winkelverteilung zwischen ein- und

austretendem Strang (Abb. 3.13). Passt man die Verteilung der Winkel mit einer Summe von zwei Gaußfunktionen an, erhält man zwei Maxima bei 67° und 143° . Es wurden signifikant mehr Winkel, die größer als 90° sind gemessen. Dies spricht für eine relativ "offene" Konformation am Nukleosom. Messungen mittels Kryo-Elektronenmikroskopie an rekonstituierten Mononukleosomen aus Hühnererythrozyten-Oktameren ergaben zwar im Mittel einen kleineren Ein- und Austrittswinkel ($58 \pm 42^\circ$), jedoch wurden bei diesen Messungen auch Mononukleosomen mit größeren Winkeln ($>120^\circ$) gemessen (Furrer et al., 1995). Messungen mittels Rasterkraftmikroskopie an Hühnererythrozyten-Chromatin, dem die Linker-Histone entzogen wurden, ergab einen Mittelwert für den Ein- und Austrittswinkel von 130° (Leuba et al., 1998). Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung zu den in dieser Arbeit gemessenen Winkeln von rekonstituierten Mononukleosomen ohne H1. Die großen Winkel, die im Gegensatz zu elektronenmikroskopischen Messungen stehen, können durch die Deponierungsmethoden bedingt sein.

Mononukleosomen, die das Linker-Histon H1 enthielten, zeigen eine deutlich unterschiedliche Winkelverteilung. Der Anteil der Mononukleosomen, die einen großen Ein- und Austrittswinkel besitzen wurde signifikant kleiner. Als Mittelwert ergab sich ein Winkel von $97 \pm 33^\circ$ (Abb. 3.13). Messungen an isoliertem Hühnererythrozyten-Chromatin zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Während rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an isolierten Hühnererythrozyten-Chromatin mit den Linker-Histonen H1 und H5 (Histon H5 ist ein zusätzliches Linker-Histon, das neben dem Histon H1 in Hühnererythrozyten-Chromatin vorkommt) einen Wert von $100 \pm 44^\circ$ ergaben (Leuba et al., 1998), lieferten kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen einen Wert von 35° (Bednar et al., 1998). Auch ist auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Mononukleosomen aus Hühnererythrozyten mit Linker-Histon ein sogenannter *Stem Loop* zu beobachten (Hamiche et al., 1996). Dieses Strukturmotiv konnte bei den in dieser Arbeit angefertigten Rasterkraftmikroskopiebildern jedoch nicht gefunden werden. Der Ein- und Austrittswinkel

an Hühnererythrozyten-Chromatin liefert je nach verwendeter Messmethode unterschiedliche Werte.

Die Messungen der Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie wurden an Proben vorgenommen, die sich nicht frei in Lösung befanden. Eine weitere Methode, die den Abstand der nukleosomalen Linker-DNA am Nukleosom bestimmen kann, ist die des Fluoreszenzresonanzenergietransfers (Tóth *et al.*, 2001). Hierbei besteht die Möglichkeit in freier Lösung zu messen, und so präparative Artefakte durch die Oberflächenbindung zu vermeiden. Messungen an rekonstituierten Mononukleosomen ohne H1 ergaben Winkel, die denen aus kryoelektronenmikroskopischen Messungen entsprechen (Furrer *et al.*, 1995). Der Zusatz des Linker-Histons H1 führte zu einer weiteren Annäherung der ein- und austretenden Stränge am Nukleosom (Tóth *et al.*, 2001). Die hochauflösenden Röntgenstrukturanalysen des Nukleosoms (Luger *et al.*, 1997) deuten auf einen engen Kontakt von nur 121 Bp mit dem Histonoktamerkomplex hin. Jeweils 10 bp zu beiden Seiten des Komplexes sind weniger stark assoziiert. Es besteht daher die Möglichkeit, dass durch die Probenfixierung im Rasterkraftmikroskop diese terminalen Sequenzen von dem Oktamerkomplex abgelöst werden. Dieses Ablösen vom Kernkomplex könnte zu den großen, in der Rasterkraftmikroskopie gemessenen, Winkeln führen. Da die Messungen des Fluoreszenzresonanzenergietransfers in freier Lösung stattfinden, entsprechen diese und die mittels der Kryoelektronenmikroskopie ermittelten Werte wahrscheinlich eher den tatsächlichen Verhältnissen. Die Messergebnisse, die in dieser Arbeit mittels Rasterkraftmikroskopie an Mononukleosomen aus rekombinanten Histonen erzielt wurden, stehen jedoch in Einklang mit früheren rasterkraftmikroskopischen Messungen an nativen Hühnererythrozyten-Chromatin. Dies spricht dafür, dass mit rekombinanten Histonen Mononukleosomen mit nativer Konformation rekonstituiert werden konnten. Die hier beobachteten Abweichungen zu kryoelektronenmikroskopischen Messungen können durch die Oberflächenbindung verursacht sein. Vielleicht ist es möglich durch Änderung der Pufferbedingungen diese Artefakte zu minimieren. So könnte untersucht werden, ob eine

stärkere oder schwächere Bindung der Fragmente auf den Glimmer zu anderen Resultaten führt. Auch können durch eine weitere Optimierung der Messungen in Flüssigkeit womöglich diese Probleme behoben werden. Daher scheint die Rasterkraftmikroskopie hinsichtlich weiterer Messungen erfolgversprechend zu sein.

5. Ausblick

Die in den AUZ und FA Experimenten bestimmten DNA-Bindungsstellen und Dissoziationskonstanten für H1 müssen durch weiterführende Experimente detailliert untersucht werden. In der AUZ könnten Experimente mit dem Geschwindigkeits-sedimentationslauf weitere Erkenntnisse über die unterschiedlichen Komplexe aus H1 und freier DNA in Lösung liefern. Die genaue Bestimmung der Bindungskonstanten mittels FA erfordert Messungen mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen und verschiedenen Substratkonzentrationen. Durch Untersuchung einzelner H1 Proteindomänen könnten so auch die Bindungsaffinitäten der einzelnen Bindungsstellen separat ermittelt werden. Die Kenntnis, die sich aus solchen Experimenten ergeben, werden wichtige Aussagen über die Lage und die Stärke der DNA-Bindung von H1 am Nukleosom zulassen.

Festzuhalten ist weiter, dass gelungen ist, scheinbar intakte Mononukleosomen aus rekombinanten Proteinen zu rekonstituieren. Daher sollte es möglich sein, die Auswirkungen der posttranslationalen Histonmodifikationen (Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung) gezielt zu untersuchen. Mit der Rasterkraftmikroskopie können weitere strukturelle Veränderungen des Nukleosoms gemessen werden. Der Einsatz von rekombinanten Histonen ermöglicht es ausserdem gezielte Mutationen in den Histonen einzuführen und so die Effekte z. B. der Histonschwänze auf die Struktur des Nukleosoms zu bestimmen. Auch sollte es in Zukunft möglich sein längere Chromatinfibern zu rekonstituieren und so auch Strukturparameter der 30 nm Fiber zu bestimmen. Aus den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten ergeben sich also im Bereich der Chromatinforschung zahlreiche weitere Ansätze, die interessante Ergebnisse versprechen.

V. Literaturverzeichnis

- An, W., Leuba, S. H., van Holde, K. & Zlatanova, J. (1998). Linker histone protects linker DNA on only one side of the core particle and in a sequence-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3396-3401.
- Archer, S. Y. & Hodin, R. A. (1999). Histone acetylation and cancer. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 9, 171-174.
- Ausio, J. (2000). Are linker histones (histone H1) dispensable for survival? *Bioessays* 22, 873-877.
- Becker, P. B. (2000). Preparation and analysis of positioned nucleosomes. In *Methods in Molecular Biology, Vol. 119: Chromatin Protocols* (Becker, P. B., Hrsg.), S. 17-26. Humana Press, Totowa, NJ.
- Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S. A., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J. & Woodcock, C. L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14173-14178.
- Upstate Biotechnology. (2001). Anti-Histone H1, clone AE-4. Biotechnology, U.
- Bird, A. P. & Wolffe, A. P. (1999). Methylation-induced repression — belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451-454.
- Campbell, A. M., Cotter, R. I. & Pardon, J. F. (1978). Light scattering measurements supporting helical structures for chromatin in solution. *Nucleic Acids Res.* 5, 1571-1580.
- Caudron, M. (2000). Utilisation de la microscopie a force atomique pour etudier la conformation de mononucleosomes. Magistère de Physique Fondamentale, Université Paris-Sud.

-
- Duggan, M. M. & Thomas, J. O. (2000). Two DNA-binding Sites on the Globular Domain of Histone H5 are Required for Binding to both Bulk and 5 S Reconstituted Nucleosomes. *J. Mol. Biol.* 304, 21-33.
- Finch, J. T. & Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1897-1901.
- Furrer, P., Bednar, J., Dubochet, J., Hamiche, A. & Prunell, A. (1995). DNA at the entry-exit of the nucleosome observed by cryoelectron microscopy. *J. Struct. Biol.* 114, 177-183.
- Gerchman, S. E. & Ramakrishnan, V. (1987). Chromatin higher-order structure studied by neutron scattering and scanning transmission electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7802-7806.
- Gottesfeld, J. M., Melander, C., Suto, R. K., Raviol, H., Luger, K. & Dervan, P. B. (2001). Sequence-specific recognition of DNA in the nucleosome by pyrrole-imidazole polyamides. *J. Mol. Biol.* 309, 615-629.
- Goytisolo, F. A., Gerchman, S. E., Yu, X., Rees, C., Graziano, V., Ramakrishnan, V. & Thomas, J. O. (1996). Identification of two DNA-binding sites on the globular domain of histone H5. *EMBO J.* 15, 3421-3429.
- Hamiche, A., Schultz, P., Ramakrishnan, V., Oudet, P. & Prunell, A. (1996). Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes. *J. Mol. Biol.* 257, 30-42.
- Herrera, J. E., West, K. L., Schiltz, R. L., Nakatani, Y. & Bustin, M. (2000). Histone H1 is a specific repressor of core histone acetylation in chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 20, 523-529.
- Kadonaga, J. T. (1998). Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92, 307-313.
- Knippers, R. (1997). *Molekulare Genetik*, Thieme Verlag, Stuttgart.

- Koo, H.-S. & Crothers, D. M. (1988). Calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bending. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1763-1767.
- Kouzarides, T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 9, 40-48.
- Leslie, A. G. W., Arnott, S., Chandrasekaran, R. & Ratliff, R. L. (1980). Polymorphism of DNA double helices. *J. Mol. Biol.* 143, 49-72.
- Leuba, S. H., Bustamante, C., van Holde, K. & Zlatanova, J. (1998). Linker histone tails and N-tails of histone H3 are redundant: scanning force microscopy studies of reconstituted fibers. *Biophys J* 74, 2830-2839.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Mahlknecht, U., Ottmann, O. G. & Hoelzer, D. (2000). When the band begins to play: histone acetylation caught in the crossfire of gene control. *Mol. Carcinog.* 27, 268-271.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex [see comments]. *Nature* 393, 386-389.
- Puglisi, J. D. & Tinoco, J., I. (1989). Absorbance melting curves of RNA. *Meth. Enzymol.* 180, 304-325.
- Ramakrishnan, V. (1997). Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 83-112.
- Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L. & Sweet, R. M. (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* 362, 219-23.

-
- Rippe, K., Mücke, N. & Langowski, J. (1997). Molecules in motion: Imaging DNA with the scanning force microscope in aqueous solutions. *Bioforum International* 1, 42-44.
- Rivetti, C., Guthold, M. & Bustamante, C. (1996). Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: Equilibration vs. molecular kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J. Mol. Biol.* 264, 919-932.
- Schulz, A., Mücke, N., Langowski, J. & Rippe, K. (1998). Scanning force microscopy of *E. coli* RNA Polymerase- σ 54 holoenzyme complexes with DNA in buffer and in air. *J. Mol. Biol.* 283, 821-836.
- Strahl, B. D. & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Tazi, J. & Bird, A. (1990). Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 60, 909-920.
- Tóth, K., Brun, N. & Langowski, J. (2001). Trajectory of nucleosomal linker DNA studied by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* 40, 6921-6928.
- Travers, A. (1999). The location of the linker histone on the nucleosome. *Trends Biochem. Sci.* 24, 4-7.
- van Holde, K. & Zlatanova, J. (1996). What determines the folding of the chromatin fiber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10548-10555.
- van Holde, K. E. (1989). *Chromatin*, Springer, Heidelberg.
- Varga-Weisz, P., Zlatanova, J., Leuba, S. H., Schroth, G. P. & van Holde, K. (1994). Binding of histones H1 and H5 and their globular domains to four-way junction DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3525-3529.
- Vila, R., Ponte, I., Jimenez, M. A., Rico, M. & Suau, P. (2000). A helix-turn motif in the C-terminal domain of histone H1. *Prot. Sci.* 9, 627-636.
- Wedemann, G. & Langowski, J. (submitted). Computer simulation of the 30-nm chromatin fiber. *Biophys. J.*

Woodcock, C. L., Grigoryev, S. A., Horowitz, R. A. & Whitaker, N. (1993). A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9021-9025.

Zhou, Y. B., Gerchman, S. E., Ramakrishnan, V., Travers, A. & Muyldermans, S. (1998). Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* 395, 402-405.