

**Untersuchungen zur Bindung und Oligomerisierung
des NtrC-Proteins an DNA
mit
Fluoreszenzanisotropie und
Fluoreszenzkorrelationspektroskopie**

Diplomarbeit

Vorgelegt von

Franz W. Sevenich
aus Meerbusch

Durchgeführt unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wolfrum,
Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg

und

Herrn Prof. Dr. Jörg Langowski,
DKFZ Heidelberg und IWR der Universität Heidelberg

am DKFZ-Heidelberg

Juli 1996

Bedanken möchte ich mich

bei *Prof. Dr. Jürgen Wolfrum* für seine wertvolle Betreuung und die durch ihn erlangten Einblicke in die moderne Fluoreszenzspektroskopie,
bei *Prof. Dr. Jörg Langowski* für seine engagierte Betreuung, seine Fähigkeit zu Begeistern und die Schaffung einer optimalen Arbeitsatmosphäre,
bei *Dr. Karsten Rippe* für die interessante biologische Problemstellung dieser Arbeit, die motivierende, stets verfügbare Betreuung, zahllose fruchtbringende Diskussionen und für seine immerwährende Gelassenheit,
bei *Claudia Pfannschmidt* für das Korrekturlesen dieser Arbeit,
bei der *gesamten Gruppe* der Abteilung Biophysik der Makromoleküle für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre,
bei *Verena Weiss* für die Spende des verwendeten Wildtyp-NtrC-Proteins,
bei den Firmen *Zeiss* und *Evotec*, die leihweise ihr FCS-Spektrometer Confocor zur Verfügung gestellt haben,
beim *Cusanuswerk* für die materielle und ideelle Förderung meines Studiums
und bei *meinen Eltern*, die mein ganzes Studium durch ihre finanzielle und persönliche Unterstützung begleitet und ermöglicht haben.

Heidelberg im Juli 1996

Franz W. Sevenich

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

.....

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	
Einleitung	2
1 Biologische Grundlagen	6
1.1 Das NtrC-Protein.....	6
1.2 Transkription am Glutaminsynthetasegen	8
2 Theorie	10
2.1 Lumineszenz organischer Farbstoffmoleküle	10
2.1.1 Energiezustände organischer Moleküle.....	10
2.1.2 Übergänge zwischen den Energiezuständen	11
2.2 Fluoreszenzanisotropie	12
2.2.1 Anisotropie eines einzelnen Fluorophores	13
2.2.2 Anregung und Photoselektion von Fluorophoren.....	14
2.2.3 Die Perrin-Gleichung	15
2.3 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.....	18
2.4 Thermodynamik von DNA-Protein-Wechselwirkungen.....	21
2.4.1 Bindungsgrad für eine Protein-Bindungsstelle	21
2.4.2 Titrationskurven für eine Protein-Bindungsstelle	21
2.4.3 Abhängigkeit der Bindungskonstanten von der Ionenstärke.....	23
3 Material und Methoden	25
3.1 Puffersysteme.....	25
3.2 DNA-Oligonukleotide.....	25
3.2.1 Sequenzen und Fluoreszenzmarkierung.....	25
3.2.2 Konzentrationsbestimmung der Einzelstränge.....	27
3.2.3 Duplexherstellung	28
3.3 Proteine.....	28
3.4 Gelretardations-Analyse	29
3.5 Fluoreszenzanisotropie	30
3.5.1 Das Fluoreszenzspektrophotometer.....	30
3.5.2 Titrationsen.....	32
3.5.3 Datenanalyse.....	34

3.6	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.....	35
3.6.1	Das Confocor.....	35
3.6.2	Titrationen.....	36
3.6.3	Datenanalyse.....	36
4.	Experimentelle Ergebnisse	38
4.1	Charakterisierung der Oligonukleotideinzelstränge.....	38
4.2	Gelretardations-Analyse	41
4.3	FA-Messungen	43
4.3.1	Stöchiometrische Titrationen des DNA-Fragmentes ES/2 mit NtrC	43
4.3.1.1	NtrC-Wildtyp.....	43
4.3.1.2	NtrCS160F	45
4.3.2	Bindung von NtrC an das DNA-Fragment ES/2	46
4.3.2.1	Bindungsdissoziationskonstante bei niedrigen Salzkonzentrationen....	47
4.3.2.2	Bindungsdissoziationskonstante bei hohem Salzgehalt	47
4.3.3	Stöchiometrische Titrationen des DNA-Fragmentes ES mit NtrC.....	50
4.3.4	Bindungsdissoziationskonstanten von RNA-Polymerase.....	52
4.3.4.1	Promotorbindungsstelle PS.....	52
4.3.4.2	Enhancerbindungsstelle-NtrC-Komplex	53
4.4	FCS-Messungen.....	55
4.4.1	Korrelationsfunktionen.....	55
4.4.2	Diffusionszeiten des DNA-Duplexes ES/2.....	56
4.4.3	Analyse der Korrelationsfunktionen	58
4.4.4	Stöchiometrische Titration des DNA-Fragmentes ES/2 mit NtrC.....	59
4.4.5	Bindungsdissoziationskonstante von NtrC am DNA-Fragment ES/2	60
4.5	Ionenpaarbildung bei der NtrC-DNA-Bindung	62
5	Diskussion	63
5.1	Aktivitätsbestimmungen der Proteine	63
5.2	Bindung des NtrC-Dimers an eine einzelne DNA-Bindungsstelle.....	64
5.3	Bindung des NtrC-Proteins an die Enhancer-DNA-Sequenz mit zwei Bindungsstellen.....	67
5.4	Bindung von RNA-Polymerase	69
5.5	Vergleich der FA- und FCS-Messungen.....	71
5.6	Ausblick.....	72
	Literatur	73

Zusammenfassung

Das NtrC-Protein ist ein Regulatorprotein, das an der Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene in Enterobakterien beteiligt ist. Bei der Aktivierung der Transkription spielen DNA-Protein- und Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen NtrC, der DNA-Enhancerbindungsstelle und der RNA-Polymerase eine zentrale Rolle. Solche Wechselwirkungen wurden für die transkriptionsinaktive Wildtyp-Form des Proteins und eine transkriptionsaktive Mutante NtrC^{S160F} miteinander verglichen.

Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter DNA-Fragmente konnte die Bildung von DNA-Protein-Komplexen mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropie (FA) und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) verfolgt werden.

Dabei wurden die Bindungskonstanten von NtrC-Wildtyp und NtrC^{S160F} an eine DNA-Bindungsstelle für ein Protein bestimmt. Es zeigte sich, daß beide Proteine gleich stark an die DNA-Bindungsstelle binden. Für das Wildtyp-Protein wurde durch die Messung der Bindungskonstante bei verschiedenen Ionenkonzentrationen nachgewiesen, daß zwei Ionenpaare bei der Bindung des Proteins an die DNA ausgebildet werden. Nach der Bindung eines Proteins an die DNA fand nur bei der Mutante eine Anlagerung weiterer Proteine an statt.

Bei der Untersuchung der DNA-Enhancerbindungsstelle, die zwei Proteinbindungsstellen aufweist, wurde gefunden, daß die Bindung eines zweiten NtrC-Proteins an die DNA bei der Mutante kooperativ verläuft, beim Wildtyp hingegen nicht. Wiederum wurde nach der Absättigung der DNA mit zwei Proteinen nur bei der Mutante eine Bindung weiterer Proteine gefunden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die transkriptionsaktive Mutante NtrC^{S160F} durch verstärkte Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinen auszeichnet.

Das führt zu der Vorstellung, daß die Transkriptionsaktivierung von NtrC durch die Bildung von Komplexen an der Enhancerbindungsstelle entsteht, die mehr als die zwei NtrC-Proteine enthalten, die direkt an die DNA gebunden werden können.

Schließlich wurde erstmals die Bindung der RNA-Polymerase an den Komplex aus zwei Proteinen NtrC und der Enhancerbindungsstelle quantifiziert. Diese Wechselwirkung spielt vermutlich eine zentrale Rolle bei der Bildung des offenen Komplexes an der Promotorbindungsstelle zu Beginn der Transkription.

Einleitung

Die Kontrolle der Genexpression ist von zentraler Bedeutung für die Zelle. Das Verständnis der dazu benutzten Regulationsmechanismen ermöglicht grundlegende Einblicke in die Funktion und Arbeitsweise prokaryotischer und eukaryotischer Zellen. Wie schaffen es Bakterien, sich schnell veränderten Umweltbedingungen anzupassen? Wie verändern Krankheitserreger den Stoffwechsel von Zellen? Wie entstehen in höheren Lebewesen aus Zellen, die alle dasselbe Erbgut tragen, durch Differenzierung verschiedenartigste Zelltypen wie Nervenzellen oder Hautzellen? Wann versagen die normalen Regulationen der Zellteilung und eine Zelle entartet zur Krebszelle?

Auf molekularer Ebene wird die Genexpression vor allem durch Aktivierung oder Unterdrückung der Transkription der DNA in RNA gesteuert. Eine zentrale Rolle spielen hierbei an spezifische DNA-Sequenzen bindende Regulatorproteine. Um die Transkription eines Gens zu starten, müssen verschiedene Proteine miteinander in Wechselwirkung gebracht werden. Die benötigten Proteine werden dabei an spezifische Bindungsstellen auf der DNA gebunden und können dann durch die günstige räumliche Anordnung, die durch die Fixierung auf der DNA erreicht wird, so in Wechselwirkung treten, daß die Transkription beginnt. Als molekularer Schalter, der die so initiierbare Transkription ein- oder ausschaltet, dienen Proteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren, die die Bildung des Startkomplexes möglich oder unmöglich machen.

Das in dieser Arbeit untersuchte NtrC-Protein ist ein solches Regulatorprotein. In seiner transkriptionsaktivierenden phosphorylierten Form ermöglicht es die Transkription von Genen in Enterobakterien (Magasanik, 1988). Die Aktivierung der Transkription erfolgt unter Zusammenbringung von an entfernten Stellen der DNA gebundenen Proteinen durch Verbiegung der DNA (auch Looping genannt).

Dieser Mechanismus der Transkriptionsaktivierung ist auch in eukaryotischen Zellen, den Zellen höher organisierter Lebewesen, weit verbreitet. Da am Aktivierungskomplex der Transkription im Falle von NtrC wesentlich weniger Proteine beteiligt sind, ist die quantitative Untersuchung regulatorischer Mechanismen leichter möglich.

Bei der Untersuchung des NtrC-Proteins wurde erkannt, daß seine transkriptionsaktive Form eine verstärkte Tendenz zur Oligomerisierung an seiner DNA-Bindungsstelle (der sogenannten Enhancerbindungsstelle) zeigt und daß diese Oligomerisierung notwendig ist, um die Transkription auszulösen (Porter et al., 1993; Weiss et al., 1992). Dabei wurde auch mit Gelretardations-Analysen gezeigt, daß mindestens zwei Dimere an die Enhancerbindungsstelle

gebunden werden können. Untersuchungen mit Hilfe von Rasterkraftmikroskopaufnahmen zeigen so große Komplexe an der Enhancerbindungsstelle, daß vermutet wird, daß vier oder gar acht Dimere NtrC gebunden werden (Rippe et al., 1997). Abbildung 1 zeigt eine Rasterkraftmikroskopaufnahme eines solchen NtrC-DNA-Komplexes.

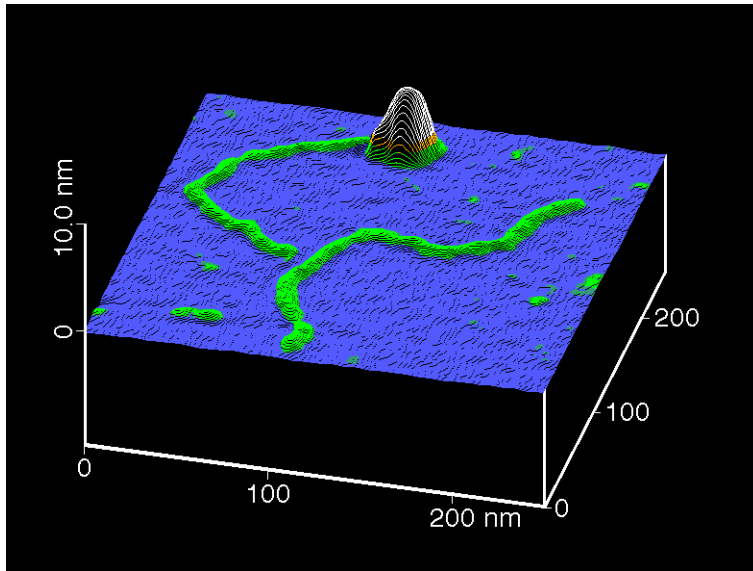


Abbildung 1: Rasterkraftmikroskopaufnahme eines NtrC-Komplexes an der Enhancerbindungsstelle (Rippe et al., 1997). Die Enhancerbindungsstelle sitzt am Ende eines 730 Basenpaare langen DNA-Fragmentes.

Genaue Erkenntnisse über die Struktur des Komplexes sind jedoch zum Verständnis der Funktionsweise des Aktivierungsprozesses unerlässlich. Es erschien ratsam, eine neue Methode zur Untersuchung der Komplexbildung anzuwenden. Die bisher zur Untersuchung des NtrC-Proteins verwendeten biochemischen Untersuchungsmethoden wie Gelretardations-Analyse und Nitrozellulose-Filter-Bindung erscheinen dafür nicht geeignet. Sie beruhen auf der schnellen Auftrennung und anschließenden Analyse der Gleichgewichtskomponenten. Dabei wird angenommen, daß die Auftrennung so vorgenommen werden kann, daß die in Lösung vorliegenden Anteile der Stoffe sich während der Auftrennung nicht verändern. Insbesondere weniger starke Bindungen, wie sie zwischen Proteinen gefunden werden und bei der Multimerisierung und der Wechselwirkung zwischen Aktivator-Komplex und RNA-Polymerase wichtig sind, können durch diese Methoden nur schlecht untersucht werden. Bei der Rasterkraftmikroskopie andererseits sind die Proben auf einer Oberfläche fixiert, hier sind keine thermodynamischen Aussagen möglich.

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Bindungsprozesse fluoreszenzspektroskopische Methoden verwendet. Sie liefern als nichtinvasive Methoden streng thermodynamische Aussagen über die untersuchten Gleichgewichte und erlauben auch die Untersuchung schwacher Wechselwirkungen. Die Fluoreszenz als physikalisches Signal bietet sich wegen ihrer außerordentlich hohen Empfindlichkeit an. Der Verbrauch an den nur in geringen Mengen zur Verfügung stehenden Biomolekülen wird dadurch in Grenzen gehalten. Die Konzentrationen können sich in Bereichen bewegen, wie sie in vivo in Zellen vorliegen. Um

Bindungskonstanten von Gleichgewichten mit hoher Bindungskonstante zu bestimmen, ist es außerdem notwendig, die Konzentration der gemessenen Komponenten niedrig zu wählen, um eine nur teilweise Assoziation des Komplexes zu erreichen und zu vermessen.

Eingesetzt wurden für die hier vorgenommenen Untersuchungen Fluoreszenzanisotropie (FA) und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS).

FA wird bereits lange für Studien in biologischen Systemen eingesetzt. Dazu zählen die Bestimmung der Rotationsdiffusionszeiten von Proteinen (Weber, 1952) und Assoziierung zwischen Proteinen (Heyduk et al., 1993; Rawitch & Weber, 1972). In neuerer Zeit wurde die Methode auch zur Bestimmung von Wechselwirkungen zwischen DNA-Oligonukleotiden und Proteinen eingesetzt (Bailey et al., 1995; Hagmar et al., 1995; Heyduk & Lee, 1990; LeTilly & Royer, 1993; Perez-Howard et al., 1995). Die Anisotropie eines fluoreszierenden Teilchens hängt vom Verhältnis seiner Rotationskorrelationszeit zur Lebensdauer der Fluoreszenz ab. In dem Bereich, wo sich beide in derselben Größenordnung befinden, nimmt die Anisotropie mit der Masse des fluoreszierendes Teilchens zu. Außerhalb dieses Bereiches ändert sich die Anisotropie kaum. Da die Rotationskorrelationszeit von DNA-Oligonukleotiden in der Größenordnung der Fluoreszenzlebensdauer von gängigen Farbstoffen wie Rhodamin und Fluoreszein liegt, sollte sie für unser System ein gutes Meßsignal liefern.

Die erstmalige Anwendung der FCS liegt bereits zwanzig Jahre zurück (Ehrenberg & Rigler, 1974; Elson & Magde, 1974; Koppel, 1974). Aber erst vor kurzem wurde es möglich, das volle Potential dieser Methode auszuschöpfen. Die Sensitivität konnte durch Einführung extrem kleiner Beobachtungsvolumina mit Hilfe konfokaler Abbildung extrem gesteigert werden (Eigen & Rigler, 1994; Rigler & Mets, 1992; Rigler & Widengren, 1990; Rigler et al., 1992). Es sind Messungen mit sehr niedrigen Konzentrationen in kleinen Probenvolumina möglich. Im Vergleich zur Anisotropie spielt die Lebensdauer der fluoreszierenden Spezies keine Rolle für den Meßbereich der Methode, so daß damit Teilchen sehr verschiedener Massen nebeneinander untersucht werden können. Allerdings ist das beobachtete Meßsignal (die Änderung der mittleren Diffusionszeit durch das Beobachtungsvolumen) der dritten Wurzel der Teilchenmasse proportional.

Die unterschiedliche Charakteristik der Abhängigkeit der Meßsignale von der Masse der fluoreszierenden Spezies sowie die methodisch bedingte unterschiedliche Meßgenauigkeit lassen ein unterschiedliches Auflösungsvermögen der beiden Methoden für die Untersuchung der Bindung von Proteinen an ein DNA-Fragment erwarten. Die Eignung der beiden Methoden zur Unterscheidung der bei der Proteinoligomerisierung auftretenden Spezies wurde in dieser Arbeit miteinander verglichen.

Um die Bindung des NtrC-Proteins an die DNA zu verfolgen, wurden zwei fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente eingesetzt. Das eine enthielt nur eine DNA-Bindungssequenz für ein einzelnes Protein, um die reine DNA-Protein-Bindungsstärke zu untersuchen. Das andere enthielt die Enhancerbindungssequenz mit zwei Proteinbindungsstellen.

NtrC bindet in aktiver und inaktiver Form an die DNA. Um die Bindungseigenschaften beider Formen zu vergleichen, wurden hier das inaktive Wildtyp-NtrC-Protein und die transkriptionsaktive Proteinmutante NtrC^{S160F} untersucht. Die Mutante ist leichter für quantitative Untersuchungen zugänglich als das phosphorylierte Protein, da dieses innerhalb von Minuten dephosphoryliert wird und man daher keine einheitliche Proteinfraction in der Lösung hat.

1 Biologische Grundlagen

1.1 Das NtrC-Protein

Das NtrC-Protein wurde beim Studium der Reaktion von *E. coli* auf die Änderung der Verfügbarkeit von Ammoniumionen in ihrer Umgebung entdeckt. Der Mangel an Ammoniumionen führt zu einer erhöhten Konzentration des Enzyms Glutaminsynthetase in den Bakterien. Dadurch wird ein anderer Stoffwechselzyklus zur Stickstoffgewinnung in den Bakterien aktiviert. In der Nachbarschaft des Gens für die Glutaminsynthetase fand sich das Gen, das für das NtrC kodiert. Man fand heraus, daß das Protein reversibel durch das Protein NtrB phosphoryliert werden kann und daß die phosphorylierte Form die Transkription des Glutaminsynthetasegens auslöst (Magasanik, 1988). Der daraufhin untersuchte Mechanismus der Transkriptionsaktivierung am Glutaminsynthetasegen führte zu unerwarteten Aspekten der Regulation prokaryotischer Genexpression (Kapitel 1.2).

In Lösung liegt NtrC als ein Dimer zweier identischer Untereinheiten vor. Es läßt sich in drei Bereiche einteilen, die C-terminale Domäne, die zentrale Domäne und die N-terminale Domäne. Die C-terminale Domäne enthält DNA-bindende Struktureinheiten. Die Struktur dieser Domäne (Abbildung 1.1) kann aus der Röntgenstruktur des FIS-Dimer-Proteins geschlossen werden (Yuan et al., 1991), das eine homologe Sequenz aufweist wie die C-terminale Domäne von NtrC.

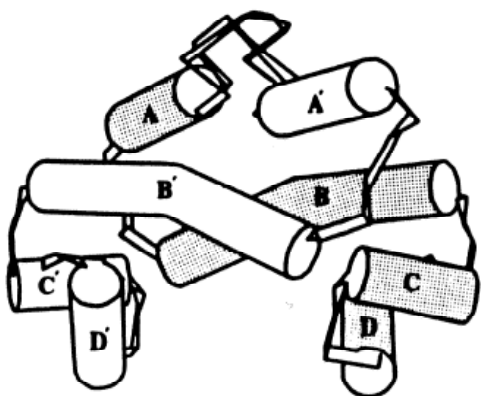


Abbildung 1.1: Die Struktur des FIS-Dimer-Proteins (Yuan et al., 1991). Sie entspricht der DNA-bindenden Domäne des NtrC-Dimers. Links sind schematisch die vier α -Helices je Dimer wiedergegeben, rechts die Struktur im Bandmodell nach den Daten der Röntgenstruktur.

Die Helices C und D bilden ein Helix-Schleife-Helix-Motiv, das oft in DNA-bindenden Proteinen gefunden wird. Für die Dimerisierung der monomeren Einheiten sind die Helices A und B verantwortlich. Durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen werden die beiden Untereinheiten zusammengehalten.

Für die zentrale Domäne des NtrC-Proteins wurde bisher keine genaue Struktur ermittelt. Sie ist an der Erhöhung der Kooperativität des phosphorylierten NtrC-Dimers beteiligt (Chen & Reitzer, 1995). Die zentrale Domäne ist homolog zu einer Domäne die in allen Aktivatoren σ^{54} -abhängiger Promotoren gefunden wird. Ihre Beteiligung an der Wechselwirkung mit dem RNA-Polymerase- σ^{54} Holoenzym konnte nachgewiesen werden (Morett & Segovia, 1993). Sie enthält das Serin an Position 160 der Aminosäuresequenz. Die in dieser Arbeit benutzte Mutante NtrC^{S160F}, bei der dieses Serin durch Phenylalanin ersetzt ist, ist im Gegensatz zum Wildtyp-Protein in nichtphosphorylierter Form in der Lage, die Transkription zu aktivieren (Klose et al., 1993).

Die Struktur der N-terminalen Domäne des NtrC-Proteins in Lösung (Abbildung 1.2) konnte durch mehrdimensionale NMR-Techniken aufgeklärt werden (Volkman et al., 1995). Die kooperative Bindung an zwei benachbarte DNA-Bindungsstellen, die bereits das Wildtyp-NtrC aufweist, wird durch diese Domäne vermittelt (Chen & Reitzer, 1995). Zu ihrer Peptidkette gehört die Aminosäure Aspartat an Position 54. Bei der Phosphorylierung des NtrC-Proteins wird die freie Carboxylgruppe dieses Aspartats phosphoryliert. Diese Aminosäuren und einige andere, die vermutlich an der Phosphorylierung beteiligt sind, sind in Abbildung 1.2 mit ihren Seitenketten wiedergegeben.

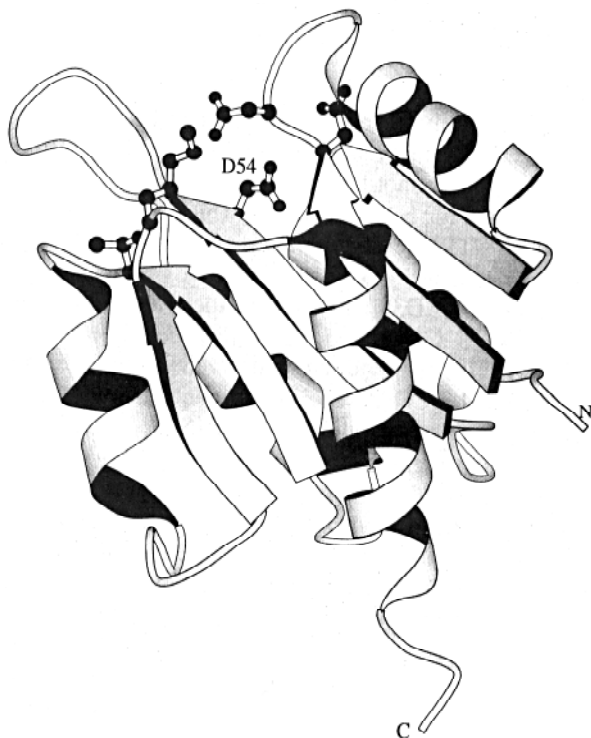


Abbildung 1.2: Die N-terminale Domäne des NtrC-Proteins (Volkman et al., 1995).

1.2 Transkription am Glutaminsynthetasegen

Auf welche Art und Weise startet nun das phosphorylierte NtrC-Protein die Transkription? Die Details dieses Mechanismus' sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Im folgenden soll ein grober Überblick über den bisher bekannten Ablauf gegeben werden.

Der schematische Aufbau der Basensequenz des Glutamin-Synthetase-Gens ist in Abbildung 1.3 wiedergegeben. Die RNA-Polymerase bindet an eine DNA-Sequenz, die man als Promotorbindungsstelle bezeichnet. Diese enthält den Transkriptionsstart, das erste Nukleotid der Sequenz, das transkribiert wird. Dieses Basenpaar erhält die Nummer 1, während die vor dem Transkriptionsstart liegenden Basenpaare negative Nummern erhalten. Etwa 100 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart findet man zwei starke Bindungsstellen für NtrC (Reitzer & Magasanik, 1986). An sie können direkt zwei Dimere binden (Porter et al., 1993; Weiss et al., 1992), eventuell noch weitere durch Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dieser Abschnitt wird als Enhancerbindungsstelle bezeichnet.

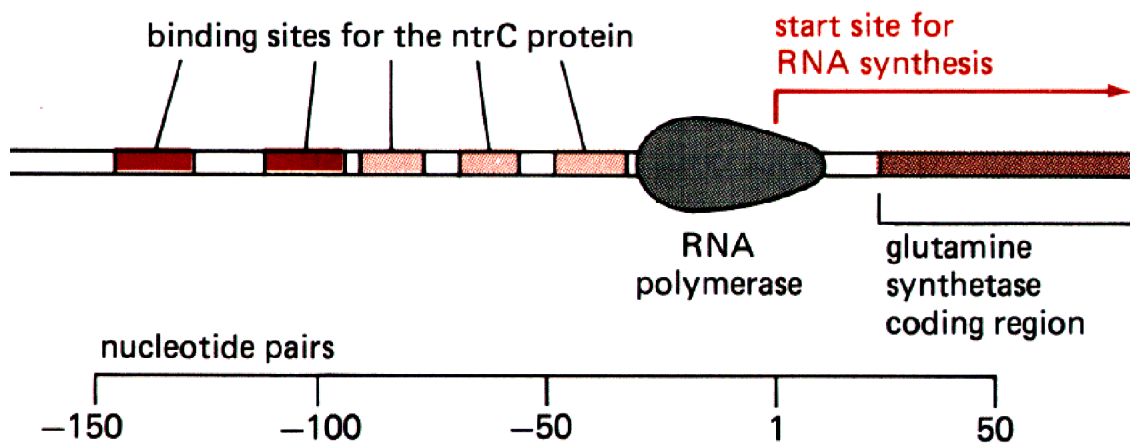


Abbildung 1.3: Die Regulator-Region des E. coli Glutaminsynthetase-Gens (Alberts et al., 1989)

An der Promotorbindungsstelle des Glutaminsynthetasegens bindet nur eine spezielle Form der RNA-Polymerase, die als Untereinheit den σ^{54} -Faktor enthält. Man nennt den gebildeten Komplex am Promotor geschlossenen Komplex (closed complex, Abbildung 1.4, oben), da die DNA am Transkriptionsstart in ihm als Duplex vorliegt. Wenn an die Enhancerbindungsstelle phosphorylierte NtrC-Proteine binden, kann durch Schleifenbildung der DNA dieser Komplex mit der RNA-Polymerase in Wechselwirkung treten. Dies bezeichnet man auch als Aktivierung aus der Distanz. Unter Verbrauch von ATP wird dann die DNA am Transkriptionsstart aufgeschmolzen, der offene Promotorkomplex entsteht (Abbildung 1.4, Mitte). Die aufgeschmolzene DNA wird dann abgelesen. Dabei läuft die RNA-Polymerase stromabwärts an der DNA entlang (Abbildung 1.4, unten) und synthetisiert, beginnend am 5'-Ende, die RNA.

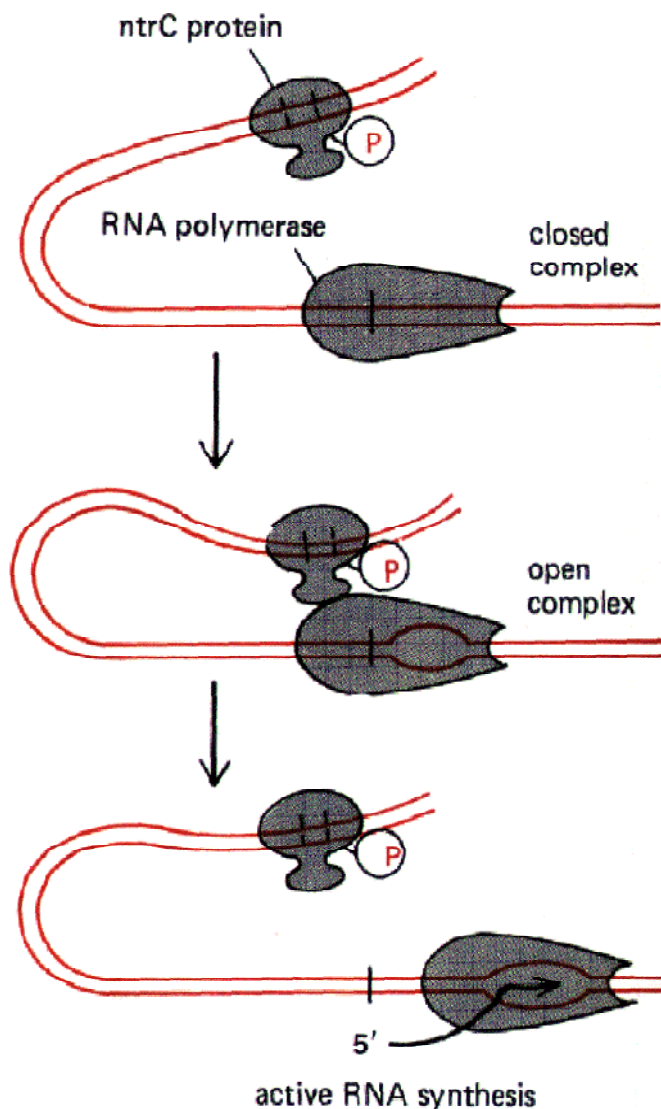


Abbildung 1.4: Schema der Transkriptionsinitiierung durch phosphoryliertes NtrC (Alberts et al., 1989)

Einige Aspekte der Transkriptionsaktivierung mittels NtrC sind der eukaryotischen Transkriptionsaktivierung ähnlich. Die Phosphorylierung als Regulationsmechanismus ist bei Eukaryoten sehr häufig, während in Prokaryoten die Aktivierung durch Bindung kleiner Moleküle vorherrscht.

Die Promoter-Sequenz am GlnA-Gen lässt sich um bis zu 1000 Basenpaare vom Transkriptionsstart verschieben, ohne daß die Transkriptionsaktivierung durch NtrC bei niedrigen Konzentrationen des Proteins vermindert würde. Diese Aktivierung aus der Distanz findet sich auch bei eukaryotischen Systemen (Ninfa et al., 1987).

In eukaryotischen Systemen bilden in der Regel mehrere verschiedene Proteine den Aktivatorkomplex. Häufig existieren mehrere Bindungsstellen für ein bestimmtes Protein. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten kann der Aktivierungsmechanismus am Glutaminsynthetasegen als Modell der eukaryotischen Transkriptionskontrolle angesehen werden.

2 Theorie

2.1 Lumineszenz organischer Farbstoffmoleküle

2.1.1 Energiezustände organischer Moleküle

Wie sich quantenmechanisch beschreiben läßt, besitzen organische Moleküle eine Fülle möglicher energetischer Zustände. Das Termschema dieser Moleküle läßt sich mit Hilfe des Jablonski-Diagrammes beschreiben (Abbildung 2.1). Man unterscheidet zwei Arten elektronischer Zustände, die Singulett- (S) und die Triplett-Zustände (T). Bei ersteren ist der Gesamtspin aller Elektronen null, bei letzteren ist er eins. Da ein Übergang zwischen den beiden Zuständen verboten ist (Interkombinationsverbot), zeichnet man sie zweckmäßigerweise nebeneinander. Wegen des Pauli-Prinzips haben die beiden Zustände unterschiedliche Energien. Der Index an den Buchstaben S und T bezeichnet jeweils die Gesamtdrehimpulsquantenzahl J aller Elektronen eines Zustandes.

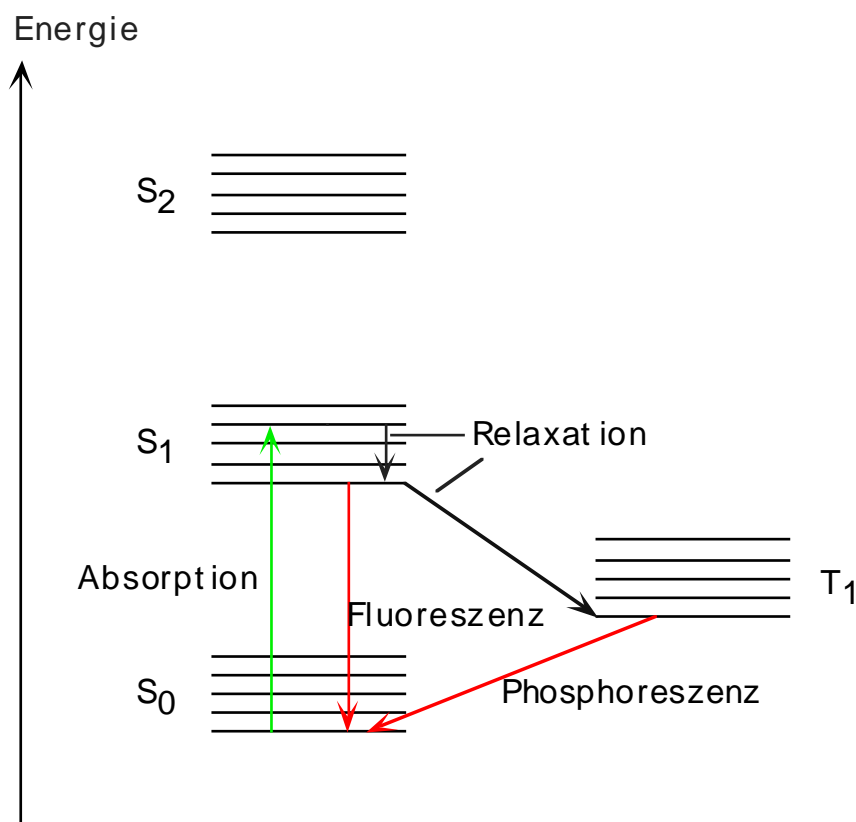


Abbildung 2.1: Jablonski-Diagramm der Energieniveaus eines Farbstoffmoleküls. Links sind Singulettzustände (S_0 , S_1 , S_2), rechts ein Triplettzustand T_1 gezeichnet. Einige mögliche Übergänge zwischen den Energieniveaus sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Weitere Energieniveaus ergeben sich aus der Möglichkeit, Rotationen und Schwingungen im Molekül anzuregen. Die Schwingungen zwischen je zwei Atomen lassen sich als harmonische Oszillationen beschreiben, was zu äquidistanten Energieniveaus mit dem Abstand $h\omega$ über dem Grundzustand führt. Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum und ω die Kreisfrequenz der Schwingung. Die Anregungswellenlängen für die Schwingungen liegen im Infrarotbereich.

Die Rotationszustände liegen nicht äquidistant übereinander, sondern ihr Abstand nimmt mit dem Quadrat der Rotationsquantenzahl zu. Um diese Zustände anzuregen, sind wesentlich kleinere Energiebeträge notwendig als zur Schwingungsanregung – die Anregungswellenlängen liegen im Mikrowellenbereich. Oberhalb eines jeden elektronischen Niveaus bilden die Rotations- und Schwingungszustände ein nahezu kontinuierliches Band von Zuständen.

2.1.2 Übergänge zwischen den Energiezuständen

Durch Absorption von Licht gehen die Moleküle in elektronisch angeregte Zustände über. Dabei werden auch Schwingungen und Rotationen angeregt. Diese relaxieren jedoch durch Stöße mit den umgebenden Teilchen innerhalb von etwa 10^{-12} Sekunden praktisch vollständig in den ersten elektronisch angeregten Zustand. Wegen der Gesamtspinerhaltung sind Übergänge zwischen Singulett- und Triplettzuständen verboten. Ein kleiner Teil der angeregten Moleküle geht dennoch in den Triplettzustand über, indem der Spin über einen Stoß an ein anderes Molekül übertragen wird.

Als Fluoreszenz wird der unter Lichtemission stattfindende Übergang von S_1 nach S_0 bezeichnet. Er findet mit einer Halbwertszeit von 10^{-9} bis 10^{-7} Sekunden statt. Ein Teil der zur Anregung verwendeten Energie wurde bereits durch strahlungslose Übergänge abgegeben. Daher ist das emittierte Licht rotverschoben (Stokes-Verschiebung).

Der (verbotene) Übergang von T_1 nach S_0 wird als Phosphoreszenz bezeichnet, er hat wegen der sehr kleinen Übergangswahrscheinlichkeit eine wesentlich höhere Lebensdauer (10^{-1} - 10^0 Sekunden).

2.2 Fluoreszenzanisotropie

Die im folgenden skizzierte Theorie der FA folgt der Darstellung von Lakowicz (Lakowicz, 1983). Der fluoreszierende Farbstoff wird klassisch durch einen in Richtung des elektrischen Feldes oszillierenden Dipol beschrieben.

Wenn ein in Lösung befindlicher Fluorophor mit polarisiertem Licht angeregt wird, so ist das emittierte Fluoreszenzlicht ebenfalls polarisiert. Regt man die Fluoreszenz in einer Küvette in z-Richtung an, so läßt sich die in den gesamten Raum abgestrahlte Fluoreszenz durch die drei Intensitäten I_x , I_y und I_z für die Fluoreszenzemission beschreiben (Abbildung 2.2).

Die Anisotropie ist dann definiert als das Verhältnis der Intensität I der polarisierten Komponente zur der Gesamtintensität:

$$r = \frac{I_z - I_y}{I_x + I_y + I_z} \quad (2.1)$$

Man ermittelt die Anisotropie durch Messung der Lichtintensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} , die entlang der y-Achse ausgesendet werden (Abb. 2.1). Da die Anregung in der z-Achse erfolgt, ist sie symmetrisch bezüglich der x- und y-Richtung und für die beobachteten Intensitäten gilt: $I_x = I_y$. Damit wird Gleichung (2.1) zu:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.2)$$

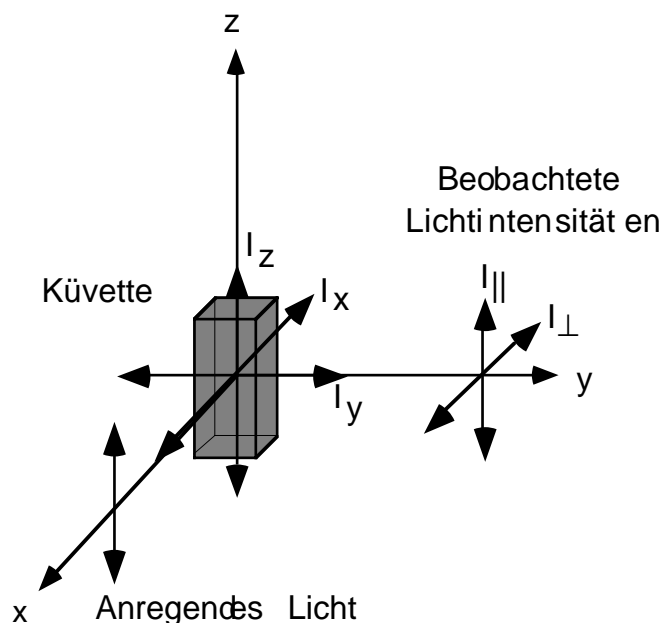


Abbildung 2.2: Beobachtung der Anisotropie der Fluoreszenz nach Anregung mit polarisiertem Licht. Die Doppelpfeile geben jeweils die Richtung des elektrischen Feldes der Lichtwellen wieder.

2.2.1 Anisotropie eines einzelnen Fluorophores

Die räumliche Position des Dipols eines einzelnen Fluorophores läßt sich durch die Winkel θ und ϕ beschreiben (Abbildung 2.3). Die Anisotropie eines solchen einzelnen, strahlenden Dipols liefert die Grundlage für die Berechnung der Anisotropie einer Lösung aus vielen fluoreszierenden Molekülen.

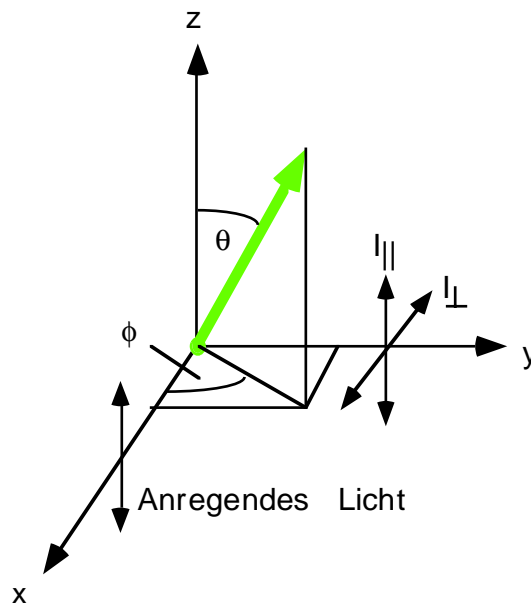


Abbildung 2.3: Beschreibung der räumlichen Lage eines einzelnen Dipoles

Die beobachtete Emissionsintensität eines Dipols ist proportional zum Quadrat des auf die Beobachtungsachse projizierten Vektors. Man erhält damit:

$$I_{\parallel} = \cos^2 \theta \quad (2.3)$$

$$I_{\perp} = \sin^2 \theta \sin^2 \phi \quad (2.4)$$

Regt man mit in Richtung der z-Achse polarisiertem Licht an, ist die Wahrscheinlichkeit der Anregung für Moleküle aller Winkel ϕ bei einem gegebenen Winkel θ identisch. Den mittleren Wert von $\sin^2 \phi$ erhält man durch Integration zu

$$\overline{\sin^2 \phi} = \frac{\int_0^{2\pi} \sin^2 \phi d\phi}{\int_0^{2\pi} d\phi} = \frac{1}{2} \quad (2.5)$$

Damit wird (2.4) zu

$$I_{\perp} = \frac{1}{2} \sin^2 \theta \quad (2.6)$$

Einsetzen in (2.2) liefert unter Berücksichtigung von $\sin^2 \theta = 1 - \cos^2 \theta$ für die Anisotropie

$$r = \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \quad (2.7)$$

Die Anisotropie des Fluorophors hängt also nur von θ , dem Winkel zwischen dem Emissionsdipol und der z-Achse, ab.

2.2.2 Anregung und Photoselektion von Fluorophoren

Um Licht zu emittieren, muß das fluoreszierende Teilchen zunächst angeregt werden. Wie in Abbildung 2.3 gezeigt, erfolgt die Anregung in Richtung der z-Achse und θ ist der Winkel, den der Anregungsdipol des Fluorophores mit der z-Achse einschließt. Die Wahrscheinlichkeit der Anregung des Dipols ist proportional zum Quadrat der Projektion des Dipolvektors auf die z-Achse. Damit ist die Anregungswahrscheinlichkeit für Dipole eines beliebigen Winkels ϕ bei konstantem Winkel θ identisch. Die Anregung durch polarisiertes Licht erzeugt also eine Population von angeregten Fluorophoren, die symmetrisch um die z-Achse liegt. Die Abhängigkeit der Anregungswahrscheinlichkeit von der räumlichen Orientierung des Anregungsdipoles wird als Photoselektion bezeichnet.

Für zufällig im Raum verteilte Moleküle ist die Wahrscheinlichkeit, mit der die Moleküle einen Winkel θ mit der z-Achse einschließen proportional zu $\sin\theta d\theta$, das entspricht der Fläche zwischen dem Winkel θ und $\theta+d\theta$ auf einer Einheitskugel.

Insgesamt ergibt sich die Verteilungsfunktion $f(\theta)$ für die Anregung zu

$$f(\theta)d\theta = \cos^2 \theta \sin \theta d\theta \quad (2.8)$$

Über diese Verteilung mittelt man den $\overline{\cos^2 \theta}$:

$$\overline{\cos^2 \theta} = \frac{\int_0^{\pi/2} f(\theta) \cos^2 \theta d\theta}{\int_0^{\pi/2} f(\theta) d\theta} \quad (2.9)$$

Einsetzen von (2.8) und Integration liefert $\overline{\cos^2 \theta} = 3/5$ und durch Einsetzen in Gleichung (2.7) ergibt sich

$$r = \frac{\overline{3 \cos^2 \theta - 1}}{2} = \frac{2}{5} \quad (2.10)$$

Der maximal erreichbare Wert der Anisotropie ist also 0.4. Dabei wurde vorausgesetzt, daß Anregungs- und Emissionsdipol des Fluorophores in die gleiche Richtung zeigen und dieser sich während der Lebensdauer der Fluoreszenz im Raum nicht bewegt.

Berücksichtigt man noch mögliche Winkel α zwischen Anregungs- und Emissionsdipol erhält man die maximal mögliche Anisotropie r_0 eines Fluorophores in Abwesenheit dynamischer Prozesse:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{2} \right) \quad (2.11)$$

Der Maximalwert der Anisotropie wird weiter verringert, wenn Anregungs- und Emissionsdipol nicht in dieselbe Richtung zeigen. Dabei sind sogar negative Werte möglich, minimal kann r_0 -0.2 werden.

2.2.3 Die Perrin-Gleichung

Die Rotationsdiffusion von Fluorophoren während der Lebensdauer der angeregten Zustände ist ein Hauptgrund für auftretende Fluoreszenzdepolarisation. Dieser Vorgang wird durch die Perrin-Gleichung beschrieben.

Für ein sphärisches Teilchen folgt der zeitaufgelöste Abfall der Anisotropie $r(t)$ nach einem schnellen Anregungsblitz einer einfachen Exponentialfunktion:

$$r(t) = r_0 e^{-t/\phi} \quad (2.11)$$

Dabei ist ϕ die Rotationskorrelationszeit des Fluorophores, die durch die Viskosität η und die Temperatur des Lösungsmittels und durch das Volumen der rotierenden Einheit V bestimmt wird:

$$\phi = \frac{\eta V}{RT} \quad (2.12)$$

Wenn $I(t)$ der zeitaufgelöste Verlauf der totalen Fluoreszenzintensität $I(t) = I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)$ ist, dann ergibt sich die Anisotropie einer stationären Messung als $r(t)$ gewichtet mit $I(t)$, also

$$r = \frac{\int_0^{\infty} I(t) r(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad (2.13)$$

Für $I(t)$ erwartet man einen exponentiellen Abfall mit der Fluoreszenzlebensdauer τ :

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (2.14)$$

Setzt man (2.11) und (2.13) in Gleichung (2.14) ein, erhält man schließlich die Perrin-Gleichung

$$r = \frac{r_0}{1 + \left(\frac{\tau}{\phi}\right)} \quad (2.15)$$

Die Anisotropie ist demnach etwa 0 für sehr schnell rotierende Teilchen, das heißt wenn $\phi \ll \tau$, für sehr langsame rotierende Teilchen mit $\phi \gg \tau$ erreicht sie den Maximalwert r_0 . Wenn ϕ und τ von der selben Größenordnung sind, ändert sich die Anisotropie recht stark mit zunehmendem Volumen des fluoreszierenden Teilchens. Für verschiedene Werte von r_0 ist in Abbildung 2.4 die Anisotropie als Funktion von τ/ϕ wiedergegeben.

Für nichtsphärische Teilchen wird die Situation komplizierter. Die Anisotropie wird dann durch mehrere Rotationskorrelationszeiten beschrieben, deren Auftrennung allerdings sehr schwierig ist (Cantor & Schimmel, 1980).

Die genaue Analyse der Anisotropie eines Teilchens wird auch dadurch erschwert, daß ein kovalent an ein Biomolekül gebundener Farbstoff eine gewisse Beweglichkeit relativ zur Hauptmasse hat. So ist die Anisotropie von fluoresceinmarkierten DNA-Fragmenten im allgemeinen kleiner als die von rhodaminmarkierten, obwohl die Fluoreszenzlebensdauern der freien Farbstoffe ähnlich sind. Das heißt, daß Fluorescein eine höhere Beweglichkeit an der DNA besitzt als Rhodamin.

Für die vorliegende Arbeit ist wesentlich, daß man zwei verschieden große fluoreszierende Spezies durch verschieden große Anisotropien unterscheiden kann.

Vorausgesetzt die Lebensdauer und relative Beweglichkeit des Farbstoffes bleiben unverändert, führt eine Massenzunahme zu einer Zunahme der Anisotropie.

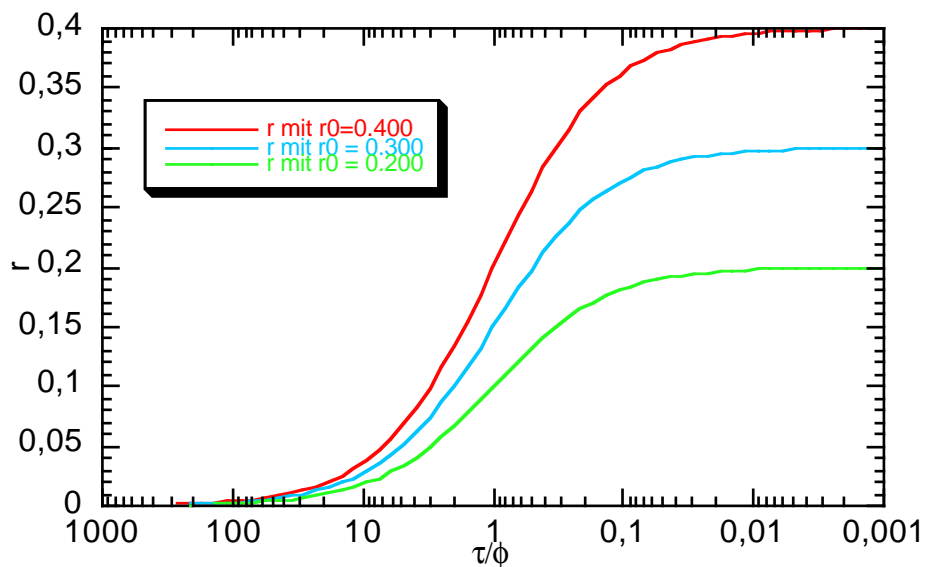


Abbildung 2.4: Die Anisotropie nach Gleichung (2.15) als Funktion des Verhältnisses von Lebensdauer zu Rotationskorrelationszeit τ/ϕ für verschiedene Werte der maximal möglichen Anisotropie r_0 .

Es stellt sich noch die Frage nach der Gesamtanisotropie einer Lösung, die mehrere verschieden große Teilchen enthält. Sie ergibt sich durch die anteilige Summation der n Einzelanisotropien der Komponenten:

$$r = \sum_{i=1}^n f_i r_i \quad (2.16)$$

Dabei ist f_i der Anteil der Komponente i in der untersuchten Lösung.

2.3 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Bei der FCS mißt man die Schwankungen der Fluoreszenzintensität in einem kleinen Detektionsvolumen, die durch die statistische Diffusion der Teilchen hervorgerufen werden. Diese Schwankungen sind der Wurzel der absoluten Teilchenkonzentration im Beobachtungsvolumen umgekehrt proportional (Elson & Magde, 1974), man wählt daher zweckmäßig ein möglichst kleines Detektionsvolumen. Dies läßt sich durch einen konfokalen Aufbau erreichen (Abbildung 2.5). Ein Laserstrahl wird über eine Linse fokussiert und das emittierte Fluoreszenzsignal über eine Lochblende auf einen Einzelphotonendetektor abgebildet. Die Anregungswellenlänge wird durch den dichroitischen Spiegel und der störende Raman-Peak des Wassers durch einen Filter vor der Detektion aus dem Signal herausgefiltert. Durch die Lochblende erreicht man eine nahezu beugungsbegrenzt kleine Abbildung mit einem Fokusvolumen von ca. 10^{-15} l (1 femtoliter).

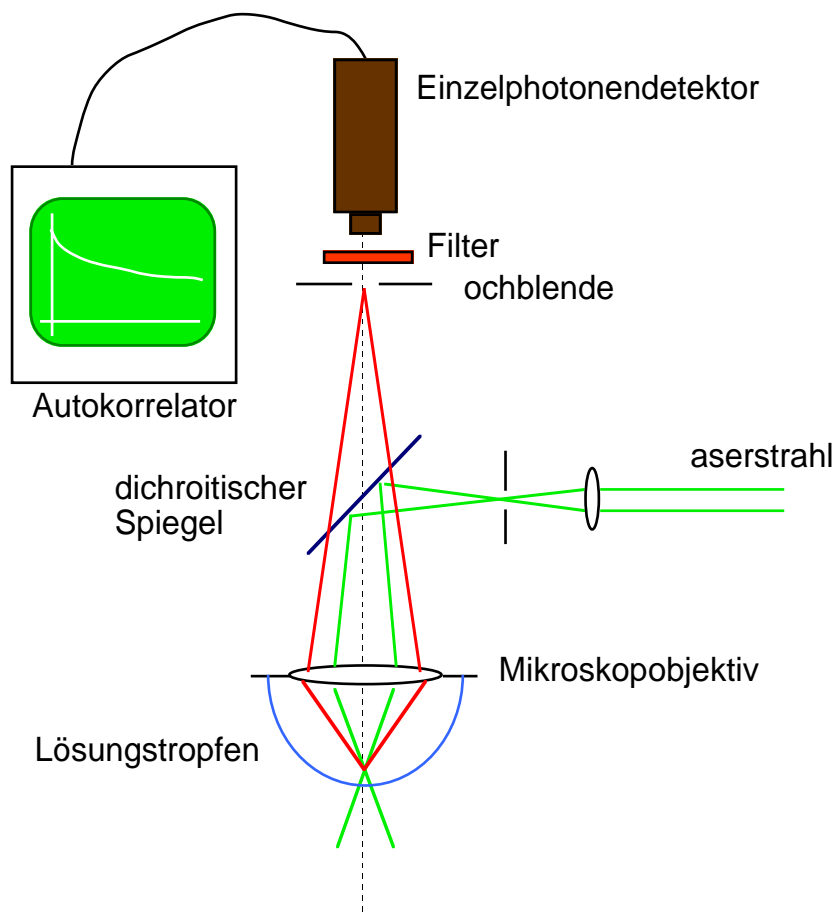


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau einer konfokalen FCS-Messung.

Zur Analyse der Fluoreszenzschwankungen betrachtet man die Schwankung um den mittleren Wert der Fluoreszenzintensität $\langle F \rangle$ in Abhängigkeit von der Zeit t :

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle \quad (2.17)$$

Die Fluktuationen in der Zählrate werden durch die Autokorrelationsfunktion G in Abhängigkeit von der Korrelation nach der Zeit τ beschrieben:

$$G(\tau) = \left\langle \frac{F(t+\tau)F(t)}{\langle F(t) \rangle^2} \right\rangle \quad (2.18)$$

Die Form der Autokorrelation wird durch das gewählte Beobachtungsvolumen bestimmt. Für den oben skizzierte Aufbau wird der Intensitätsquerschnitt des Laserstrahles durch ein Gauß-Profil beschrieben, das durch die Blende bestimmte Transmissionsprofil in Ausbreitungsrichtung läßt sich ebenfalls durch ein Gaußprofil der Intensitätsverteilung beschreiben.

Das sich ergebende Profil des Beobachtungsvolumens läßt sich durch die beiden Längen ω_1 und ω_2 charakterisieren (Abbildung 2.6).

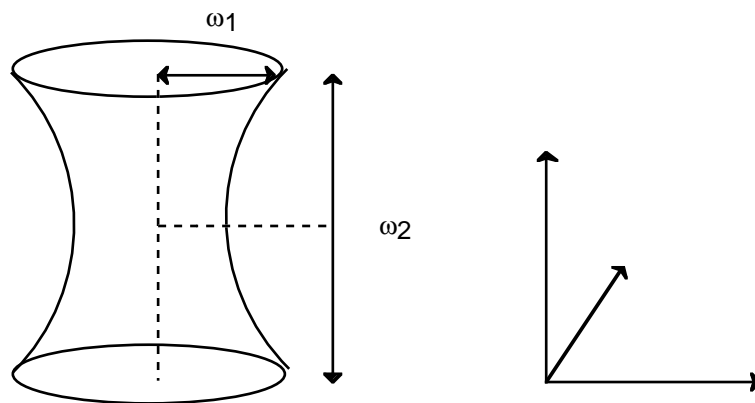


Abbildung 2.6: Das quasizylindrische Beobachtungsvolumen bei konfokaler Abbildung. Die optische Achse verläuft entlang der z-Richtung.

Mit diesem Ansatz läßt sich eine analytische Lösung für die Korrelationsfunktion eines einzelnen diffundierenden Teilchens angeben (Aragón & Pecora, 1976; Rigler et al., 1993):

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[\left(1 + \frac{\tau}{\tau_1} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_1 \cdot k_{SP}} \right)^{-1/2} \right] \quad (2.19)$$

Dabei ist N die mittlere Zahl der Teilchen im Fokus, der Ordinatenachsenabschnitt wächst also mit abnehmender Zahl der beobachteten Teilchen. Die charakteristische Diffusionszeit des Teilchens beträgt

$$\tau_1 = \frac{\omega_1^2}{4D_1} \quad (2.20)$$

D_1 bezeichnet der Diffusionskoeffizient des Teilchens. Der Term $(1 + \tau / \tau_1)^{-1}$ beschreibt die Diffusion in zwei Dimensionen, für die dritte Dimension kommt noch ein Term

$\left((1 + \tau) / \tau_1 k_{SP}\right)^{-1/2}$ hinzu. Der Strukturparameter k_{SP} beschreibt das Verhältnis der halben Länge zum Radius des Beobachtungszylinders:

$$k_{SP} = \frac{\omega_2}{\omega_1} \quad (2.21)$$

Damit ergibt sich für die charakteristische Diffusionszeit in z-Richtung:

$$\tau_1 \cdot k_{SP} = \frac{\omega_2^2}{4D_1} \quad (2.22)$$

Analog ergibt sich die Korrelationsfunktion für zwei verschiedene Komponenten 1 und 2:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[\Theta \left(1 + \frac{\tau}{\tau_1}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_1 \cdot k_{SP}}\right)^{-1/2} + (1 - \Theta) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_2 \cdot k_{SP}}\right)^{-1/2} \right] \quad (2.23)$$

Dabei ist Θ der Anteil der Komponente 1 an der Gesamtzahl der beobachteten Teilchen und $(1 - \Theta)$ der Anteil der Komponente 2.

Da bei der FCS ein Laserstrahl relativ hoher Lichtintensität auf ein kleines Volumen fokussiert wird, kann die Tripletbildung einiger Fluorophore während ihrer Diffusion durch den Fokus eine Rolle bei der Beschreibung der Korrelationsfunktion spielen. Setzt man die Näherung des stationären Zustandes für den Teil der Fluorophore an, die sich im Tripletzustand befinden, so läßt sich eine erweiterte Form der Korrelationsfunktion ableiten (Widengren et al., 1995):

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N(1 - \bar{T}_{Eq})} \cdot \left[\Theta \left(1 + \frac{\tau}{\tau_1}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_1 \cdot k_{SP}}\right)^{-1/2} + (1 - \Theta) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_2 \cdot k_{SP}}\right)^{-1/2} \right] \cdot \left[1 - \bar{T}_{Eq} \left(1 - e^{-\frac{\tau}{\bar{\tau}_T}}\right) \right] \quad (2.24)$$

Neben dem Anteil der Fluorophore \bar{T}_{Eq} , die sich im Tripletzustand befinden, kommt noch die mittlere Zeitkonstante für die Bildung des Tripletzustandes $\bar{\tau}_T$ als Parameter hinzu. Die geringere Anzahl aktiver Fluorophore erhöht den Ordinatenabschnitt der Korrelationsfunktion. Die Ausbildung des Tripletzustandes führt bei Zeiten von der Größenordnung der Zeit der Tripletbildung $\bar{\tau}_T$ zu einem zusätzlichen Abfall der Korrelationsfunktion.

2.4 Thermodynamik von DNA-Protein-Wechselwirkungen

2.4.1 Bindungsgrad für eine Protein-Bindungsstelle

Die Bindung von Proteinen an DNA kann durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben werden. Bindet ein einzelnes Protein an ein DNA-Fragment, so ergibt sich die Bindungskonstante zu

$$K = \frac{c_{DP}}{c_D c_P} = \frac{1}{K_{diss}} \quad (2.25)$$

Dabei sind c_{DP} , c_D und c_P die Konzentrationen des DNA-Protein-Komplexes, des freien DNA-Fragments und des freien Proteins.

Bei Experimenten zur Untersuchung von Bindungsgleichgewichten kann man bestimmte Mengen an Edukten vorlegen. Wie groß wird dann die gebildete Konzentration an DNA-Protein-Komplex sein? Da man die Stöchiometrie kennt, kann man Gleichung (2.25) umformen, wobei $c_{D,tot}$ die eingesetzte Gesamtkonzentration an DNA-Fragment und $c_{P,tot}$ die eingesetzte Gesamtkonzentration an Protein ist:

$$K = \frac{c_{DP}}{(c_{D,tot} - c_{DP}) \cdot (c_{P,tot} - c_{DP})} \quad (2.26)$$

Der Anteil der DNA, der ein Protein gebunden hat, wird mit dem Bindungsgrad Θ beschrieben und ergibt sich nach

$$\Theta = \frac{c_{DP}}{c_{D,tot}} \quad (2.27)$$

Die Umformung von Gleichung (2.26) nach c_{DP} ergibt eine quadratische Gleichung. Von den beiden Lösungen ist nur eine physikalisch sinnvoll, da die andere eine Konzentration an Komplex berechnet, die größer ist als die Konzentration an DNA, die man vorgelegt hat. Kombination mit (2.27) ergibt schließlich für den Bindungsgrad Θ

$$\Theta = \frac{c_{D,tot} + c_{P,tot} + K_{diss} - \sqrt{(c_{D,tot} + c_{P,tot} + K_{diss})^2 - 4c_{D,tot}c_{P,tot}}}{2c_{D,tot}} \quad (2.28)$$

2.4.2 Titrationskurven für eine Protein-Bindungsstelle

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Ansätzen wurden die Konzentrationen von DNA-Fragment und Protein stets in derselben Größenordnung gewählt. Zu einer bestimmten Menge vorgelegter DNA wurde nach und nach Protein hinzutitriert und die Bildung des DNA-Protein-

Komplexes verfolgt. Für eine solche Titration lassen sich drei Fälle unterscheiden: Die DNA-Konzentration kann wesentlich größer sein als die Bindungsdissoziationskonstante, sie kann in derselben Größenordnung liegen wie diese oder sie kann wesentlich kleiner sein.

Ist die Konzentration an DNA wesentlich größer als die Bindungsdissoziationskonstante K_{diss} , so vereinfacht sich (2.28) zu

$$\Theta = \begin{cases} c_{P,\text{tot}} / c_{D,\text{tot}} & \text{für } c_{P,\text{tot}} < c_{D,\text{tot}} \\ 1 & \text{für } c_{P,\text{tot}} > c_{D,\text{tot}} \end{cases} \quad (2.29)$$

Diesen Fall bezeichnet man als **stöchiometrische Titration**. Das zugegebene Protein bindet praktisch quantitativ an die DNA, bis schließlich die DNA abgesättigt ist.

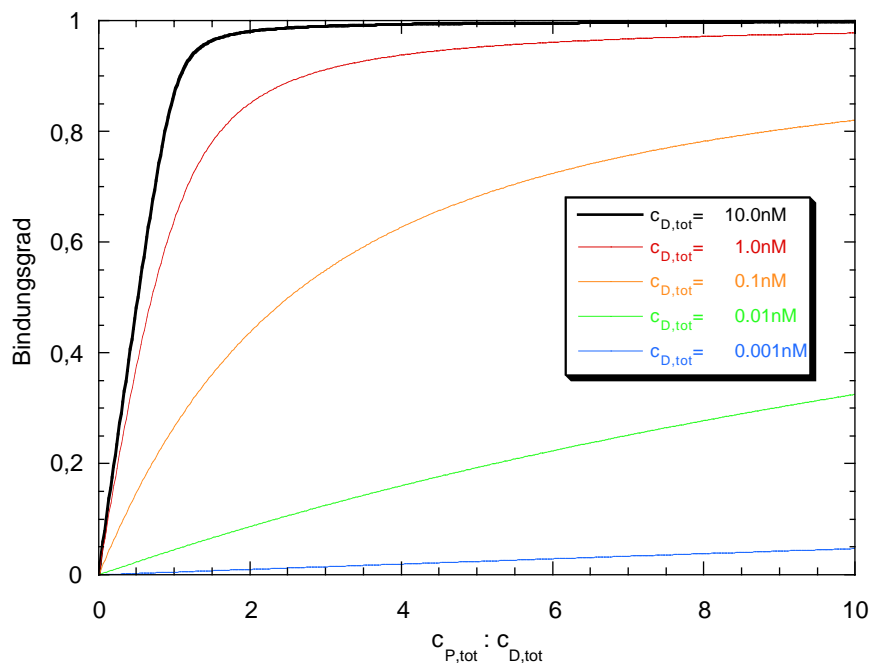


Abbildung 2.7: Titrationskurven für verschiedene Verhältnisse von Bindungsdissoziationskonstante K_{diss} und Gesamt-DNA-Konzentration $c_{D,\text{tot}}$ nach Gleichung (2.28). Auf der Abszisse ist die Gesamt-Protein-Konzentration in der Lösung $c_{P,\text{tot}}$ als Vielfaches von $c_{D,\text{tot}}$ aufgetragen. Für alle Kurven ist $K_{\text{diss}}=0.2$ nM.

Liegen die Bindungsdissoziationskonstante K_{diss} und die DNA-Gesamtkonzentration $c_{D,\text{tot}}$ in der gleichen Größenordnung, so wird gemäß (2.28) nur ein Teil des zugegebenen Proteins gebunden, und es ergibt sich eine Bindungskurve. Für diese beiden Fälle sind in Abbildung 2.7 die Titrationskurven nach (2.28) gezeichnet. Angenommen ist eine Bindungsdissoziationskonstante K_{diss} von 0.2 nM. Die braune Kurve mit $c_{D,\text{tot}} = 10$ nM entspricht einer stöchiometrischen Titration. Die Vereinfachungen, die zu (2.29) geführt haben, sind in der Nähe des Äquivalenzpunktes (wenn $c_{P,\text{tot}} : c_{D,\text{tot}} = 1$) nicht mehr erfüllt, so daß man statt zweier sich schneidender Geraden einen weichen Übergang erhält, der allerdings mit weiter steigendem Unterschied zwischen K_{diss} und $c_{D,\text{tot}}$ schärfer wird. Nach geringem Überschuß von Protein wird praktisch vollständige Besetzung der DNA erreicht. Für 1 nM und 0.1 nM DNA-

Konzentrationen (rote, gelbe und grüne Kurve in Abbildung 2.7) steigt die Bindungskurve wesentlich langsamer an, und es wird im abgebildeten Bereich, wo die Endproteinkonzentration das fünffache der DNA-Konzentration beträgt, keine quantitative Bindung erzielt.

Als dritter Fall kann die Bindungsdissoziationskonstante wesentlich größer sein als die Konzentration an DNA. Wenn die Proteinkonzentration weiterhin in derselben Größenordnung wie die DNA-Konzentration ist, dann kann man Gleichung (2.25) umformen:

$$\frac{c_{DP}}{c_D} = \frac{c_{P,tot}}{K_{diss}} \quad (2.30)$$

Da ja nur wenig Protein gebunden wird, ist $c_{P,tot}$ gleich der Proteinkonzentration in der Lösung. Für den Kehrwert des Bindungsgrades gilt

$$\frac{1}{\Theta} = \frac{c_D + c_{DP}}{c_{DP}} = \frac{c_D}{c_{DP}} + 1 \quad (2.31)$$

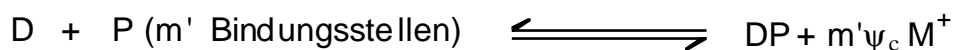
Einsetzen von Gleichung (2.30) und Umformung nach Θ liefert schließlich unter Berücksichtigung, daß $K_{diss} \gg c_{P,tot}$ ist:

$$\Theta = \frac{c_D + c_{DP}}{c_{DP}} = \frac{c_{P,tot}}{K_{diss}} \quad (2.32)$$

Der Bindungsgrad steigt also für diesen Fall langsam linear mit wachsender Proteinkonzentration an. Dies entspricht der blauen Kurve in Abbildung 2.7.

2.4.3 Abhängigkeit der Bindungskonstanten von der Ionenstärke

DNA-Protein-Bindungen sind in ihrer Stärke oft stark von der Salzkonzentration abhängig. Diese Abhängigkeit wurde von Record und Mitarbeitern (Record et al., 1976) als Verdrängung von die DNA umgebenden Gegenionen durch die Proteine interpretiert. Nach der Polyelektrolytheorie von Manning (Manning, 1969) findet an Polyelektrolyten wie DNA Ionenkondensation statt, das heißt in unmittelbarer Umgebung der Polyelektrolyte ist die Gegenionenkonzentration im thermodynamischen Gleichgewicht stark erhöht und liegt in der Größenordnung von 1 M M^+ . Man betrachtet das Gleichgewicht zwischen freier DNA D, freiem Protein P mit m' geladenen Bindungsstellen und dem Komplex DP unter Berücksichtigung einer Freisetzung von einfach geladenen Ionen M^+ :



Dabei ist ψ_c der Anteil von Gegenionen pro Phosphatanion, die an die DNA thermodynamisch gebunden sind.

Die beobachtete Bindungskonstante K_{beob} und ihre Abhängigkeit von der Konzentration monovalenter Kationen in der Lösung sind dann:

$$K_{beob} = \frac{[DP]}{[D][P]} \quad (2.33)$$

$$\frac{-\partial \log K_{beob}}{\partial \log [M^+]} = m' \psi \quad (2.34)$$

Der Parameter ψ beinhaltet neben dem Anteil gebundener Gegenionen ψ_c noch die Abschirmung der Restladung des Polyelektrolyten. Dieser Parameter wurde für doppelsträngige DNA zu 0.88 berechnet (Record et al., 1976).

Die Steigung des doppelt logarithmischen Auftrags der Bindungskonstanten gegen die Konzentration monovalenter Kationen liefert also die Anzahl der durch die DNA-Protein-Wechselwirkung ausgebildeten Ionenpaare.

3 Material und Methoden

3.1 Puffersysteme

Die DNA-Oligonukleotideinzelstränge und die Stammlösungen der DNA-Fragmente wurden in TE-Puffer (10 mM Tris/Cl pH= 8.0, 0.1 mM EDTA) bei -20°C aufbewahrt.

Das NtrC^{S160F}-Protein wurde bei -20°C im Kühlschrank in 50 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/Cl pH=8.0, 50 mM Kaliumchlorid, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT) gelagert. Der hohe Glycerinanteil verhinderte ein Einfrieren bei dieser Temperatur.

Aliquots des NtrC Wildtyps wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren in 30%(v/v) Glycerin, 50 mM Tris/Cl pH= 8.0, 100 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 1 mM DTT und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurde ein Aliquot aufgetaut und für eine Meßreihe einige Tage bei -20°C aufgehoben.

Bei den Gelelektrophoresen wurde für das Gel der gebräuchliche TBE-Puffer verwendet, 1.0xTBE enthält 90 mM Tris/Borat pH=8.0 und 2 mM EDTA, 0.5x TBE genau die halben Konzentrationen.

Die Titrationsen wurden meist mit TK¹⁵⁰A-Puffer durchgeführt, der mit 150 mM etwa physiologische Konzentrationen einwertiger Ionen in Form von Kaliumionen enthält. Für einige Messungen wurden n mM Konzentrationen an Kaliumacetat verwendet (TKⁿA-Puffer). Alle diese TKⁿA-Puffer enthielten 10 mM Tris/Acetate pH=8.0. Meist wurden 0.1 mg/ml Bovin-Serum-Albumin und 1 mM Dithiothreitol zugesetzt.

Das Bovin-Serum-Albumin (BSA) war von New England Biolabs (100x, 10 mg/ml), 1,4-Dithiothreitol (DTT) von Merck und Tris [Tris(hydroxymethyl)methylamin] von Sigma. Anorganische Salze und Essigsäure wurden in p. A.-Qualität eingesetzt.

Das für alle Lösungen verwendete Wasser war deionisiert und wurde dann auf einem Seralpur Pro 90 CN Wasserreinigungssystem über Aktivkohlefilter, Ionenaustauscher und Adsorbersäulen nochmals gereinigt, so daß am Ende die Leitfähigkeit weniger als 0.1 µS betrug.

3.2 DNA-Oligonukleotide

3.2.1 Sequenzen und Fluoreszenzmarkierung

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech hergestellt und markiert. Es wurden drei Duplexe verschiedener Sequenz aus den Einzelsträngen NtrC1-4 und RNAP1+2 (Tab. 3.1)

hergestellt. Das DNA-Fragment ES/2 enthält eine NtrC-Bindungsstelle (NtrC3+NtrC4), das Fragment ES (NtrC1+NtrC2) zwei identische NtrC-Bindungsstellen und das Fragment PS die Bindungssequenz der RNA Polymerase mit σ^{54} -Cofaktor (RNAP1+RNAP2).

NtrC1	5'-TCAGTTGCACTAAAATGGTGCATAATGTTAACATTAATGCACTAAAATGGTGCACATG-3'
NtrC2	5'-CATGTTGCACCATTTTAGTGCATTAATGTTAACATTATGCACCATTTTAGTGCACACTGA-3'
NtrC3	5'-TGAGATCAGTTGCACTAAAATGGTGCATAATG-3'
NtrC4	5'-CATTATGCACCATTTTAGTGCACACTGATCTCA-3'
RNAP1	5'-TGTGAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTTTATATTTTTACGGCGACACGGCCAGCAGAATTG-3'
RNAP2	5'-CAATTCTGCTGGCCGTGTCGCCGTA AAAAATATAAAGCGAAATCTGTGCCAACTTTTCACA-3'

Tabelle. 3.1: Die Sequenzen der benutzten Oligonukleotide

Die Sequenz mit einer Bindungsstelle weist eine invertierte Sequenzwiederholung (in Tab. 3.1 unterstrichen) aus zweimal 6 Oligonukleotiden auf, die von einer 5 Basen langen AT-reichen Sequenz unterbrochen wird. Sie stammt aus der NtrBC Promoter-Region von *Salmonella Typhimurium*. Die hier verwendete Enhancer-Sequenz ES setzt sich aus zwei Bindungsstellen von ES/2 zusammen, die bezüglich ihrer Mitte 30 Basenpaare (3 Helixwindungen) weit auseinander liegen. Diese Sequenz wurde erstmals von Susan C. Porter (Porter et al., 1993) für Untersuchungen der Oligomerisierung von NtrC benutzt. Der Abstand der beiden Bindungsstellen ist derselbe wie am *glnA* Enhancer von *S. Typhimurium*, dieser weist allerdings zwei in ihrer Sequenz und Bindungsstärke etwas verschiedene Dimerbindungsstellen auf. Die hier gewählte Anordnung erlaubt ein einfaches Studium der Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den NtrC-Dimeren.

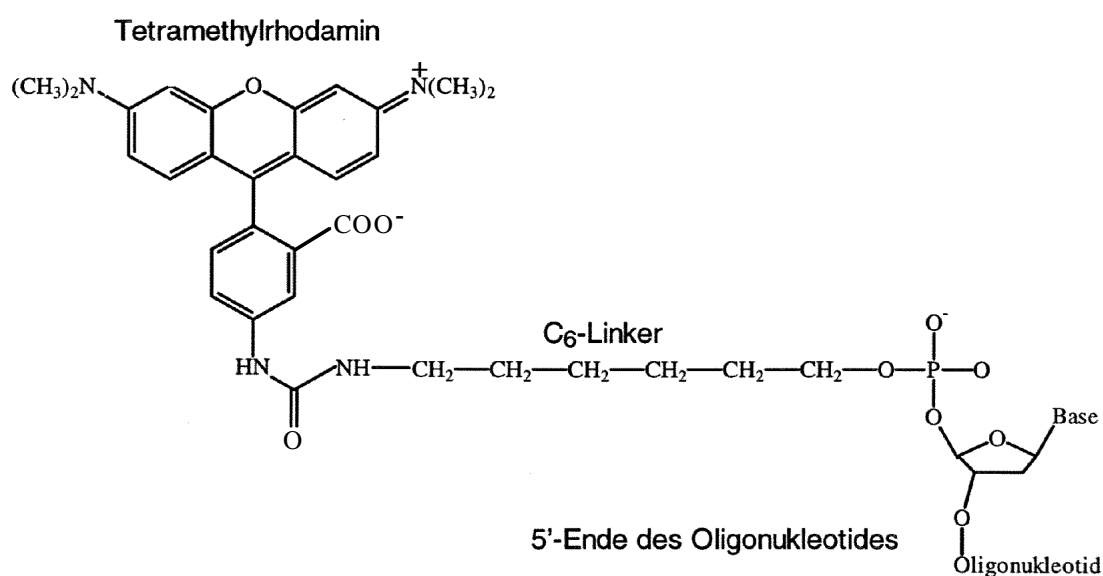


Abbildung 3.1: Der Aufbau der Bindung des Tetramethylrhodaminmarkers an das 5'-Ende des Oligonukleotides

Für jeden der drei untersuchten DNA-Duplexe wurden drei Oligonukleotidstränge synthetisiert, zwei von identischer Sequenz, von denen eines mit Tetramethylrhodamin markiert war (NtrC1, NtrC3, RNAP1) und ein komplementärer nichtmarkierter Strang. Damit ließen sich die Bindungsstellen einmal als markierte und einmal als nicht markierte Duplexe hybridisieren.

Die markierten Oligonukleotide wurden am 5'-Ende mit einen C₆-Amino-Linker versehen und dieser mit 5'-Tetramethylrhodaminisothiocyanat markiert. Die chemische Struktur des fertig markierten Oligonukleotid-Endes ist in Abbildung 3.1 wiedergegeben.

Alle Oligonukleotide wurden nach Synthese und Markierung durch HPLC-Chromatographie gereinigt.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung der Einzelstränge

Die Konzentration der Einzelstränge wurde durch Absorptionsspektrometrie auf einem Cary 4E Zweikanalspektrophotometer bestimmt. Aus bekanntem Extinktionskoeffizienten ϵ wird nach Messung der optischen Dichte A die Konzentration c bestimmt:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot d} \quad (3.1)$$

Die Extinktionskoeffizienten für die Einzelstränge wurden nach Literaturwerten für die Extinktionskoeffizienten von Mono- und Dinukleotiden (Puglisi & Tinoco, 1989) bei 260 nm berechnet. Die Werte gelten für 25°C.

Die gemessenen Extinktionswerte A_{260} müssen für die rhodaminmarkierten Einzelstränge um den Untergrund des Rhodamins bei 260nm korrigiert werden. Dazu wurden Absorptionsspektren von freiem Tetramethylrhodamin und von tetramethylrhodaminmarkierter DNA aufgenommen und auf ihr Absorptionsmaximum für das Rhodamin bei 560nm normiert. Der im normierten Spektrum des freien Rhodamins auftretende Absorptionwert $A_{260,Rh}$ bei 260nm entspricht dem Untergrund und man erhält den Korrekturfaktor f_{Rh} zu

$$f_{Rh} = \frac{A_{260,DNA-Rh} - A_{260,Rh}}{A_{260,DNA-Rh}} \quad (3.2)$$

Dabei ist $A_{260,DNA-Rh}$ der Absorptionwert des normierten DNA-Spektrums.

Die Einzelstränge bilden in Lösung bei Raumtemperatur unter Basenpaarung Sekundärstrukturen aus. Dies führt zu verkleinerten Absorptionswerten A_{260} (hyperchromer Effekt der Basenpaarung). Temperaturkurven der Absorption wurde mit dem Cary 4E Absorptionsspektrometer aufgenommen, wobei mit einer Rate von 0.5°C die Temperatur langsam von 25°C auf 80°C erhöht wurde. Die Kurve zeigt bei höherer Temperatur größere Absorptionswerte, da dann die Sekundärstrukturen aufgelöst sind. Aus diesem Anstieg kann auf den erwarteten Absorptionwert $A_{260,DNA,frei}$ der DNA ohne Sekundärstrukturen

extrapoliert werden. Als Korrekturfaktor erhält man hier mit dem gemessenen Absorptionswert $A_{260,DNA,gem}$:

$$f_{Sek} = \frac{A_{260,DNA,frei}}{A_{260,DNA,gem}} \quad (3.3)$$

Insgesamt ergibt sich der korrigierte Absorptionswert $A_{260,korr}$ aus dem gemessenen Wert $A_{260,gem}$ zu

$$A_{260,korr} = f_{Rh} \cdot f_{Sek} \cdot A_{260,gem} \quad (3.4)$$

Mit diesem korrigierten Absorptionswert wird dann die Konzentration des Einzelstranges nach Gleichung (3.1) bestimmt.

3.2.3 Duplexherstellung

Zwei komplementären Basenstränge wurden in TE-Puffer zu einer Konzentration von 10.0 mM je Einzelstrang gemischt und die Lösung dann für 5 Minuten auf 70°C erwärmt. Dann ließ man die Lösung im Metallblock während 1 1/2h langsam auf 25°C abkühlen.

Zur Kontrolle, ob die Hybridisierung quantitativ war und stöchiometrische Mengen der beiden Einzelstränge zugegeben wurden, diente eine Gelelektrophorese auf 12%igem Acrylamidgel (Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid 29:1, beide von Sigma), 1.0x TBE-Puffer bei einer Spannung von 10 V/cm. Je Probe wurden 10 µl 1 nM (NtrC1+2,RNAP1+2) oder 10 µl 2 nM (NtrC3+4) DNA in TE-Puffer mit 2 µl 50% Glycerin versetzt und auf das Gel gegeben. Das entspricht ungefähr 0.2 µg DNA, eine solche Menge ist geeignet zur anschließenden Sichtbarmachung der DNA mit Ethidiumbromid. Dazu wurde das Gel 1/2h mit 1µg/ml Ethidiumbromid in Reinstwasser eingefärbt und unter der UV-Lampe die Banden betrachtet. Mit Hilfe des Gelphotodokumentationssystems Bioprint wurde ein photographischer Abzug des Geles erstellt. Bei allen verwendeten Duplexproben betrug die durch Vergleichsbanden abgeschätzte Duplexbildung mindestens 95%.

Die drei Duplexe werden mit ES/2 (NtrC3+NtrC4) für die halbe Enhancerbindungssequenz, ES für die Enhancerbindungssequenz (NtrC1+NtrC2) und PS für die Promotorbindungssequenz der RNA-Polymerase (RNAP1+RNAP2) bezeichnet.

3.3 Proteine

Das NtrC-Wildtyp(wt)-Protein wurde freundlicherweise von Verena Weiss (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt. Seine Herstellung erfolgte wie in (Flashner et al., 1995; Mettke et al., 1995) beschrieben.

Die NtrC^{S160F}-Mutante des Proteins sowie der RNA-Polymerase- σ^{54} -Komplex wurden von Karsten Rippe kloniert, die Vorschrift wird gerade zur Publikation vorbereitet (Rippe, unveröffentlicht).

Aus der Basensequenz berechnet sich die Masse eines NtrC-Dimer-Protein-Komplexes zu 113 kD. Das Holoenzym RNA-Polymerase- σ^{54} besitzt eine Masse von etwa 450 kD.

3.4 Gelretardations-Analyse

Die Gelretardations-Analyse ist eine Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von DNA-Protein-Wechselwirkungen (Carey, 1991). Ein Gemisch aus DNA und DNA-Protein-Komplex wird auf ein laufendes Gel aufgetragen. Die Wanderungsgeschwindigkeit des DNA-Protein-Komplexes auf dem Gel ist geringer als die der freien DNA. Ein Käfigeffekt der Gelmatrix wird vermutet, der für den Erhalt des DNA-Protein-Komplexes nach der Separation von der freien DNA im Gel sorgt und so die analytische Auftrennung gemäß den in Lösung vorliegenden Anteilen an freier und komplexierter DNA ermöglicht.

Es wurde ein 5 % Polyacrylamidgel mit 0.5 x TBE-Puffer zur Auftrennung verwendet, das Gel wurde nach dem Gießen über Nacht bei 4 °C equilibriert und dann eine halbe Stunde ohne Beladung vorlaufen gelassen. Die Spannung betrug 16 V/cm und die Proben wurden bei bereits angelegter Spannung aufgetragen. Für jedes Gel wurden Proben zu 10 μ l TK^{150A}-Puffer zusammenpipettiert, die 0.4 μ M oder 1.0 μ M an DNA, variierende Volumina Protein-stocklösung, 5 % Glycerin (v/v) und 1 mM DTT enthielten. Als Vergleich wurden noch Proben ohne Protein mit 1/4, 1/2, 3/4 und 1/1 der benutzten DNA-Konzentrationen auf das Gel gegeben.

Die Quantifizierung der Gele erfolgte durch 30 Minuten Anfärben mit 1 μ g/ml Ethidiumbromid in Reinstwasser und Abfotografieren des Gels mit dem Bioprint-System. Die entstandenen TIFF-Dateien wurden mit dem Programm NIH-Image eingelesen und die Banden mit Hilfe des Gel Plotting Makros integriert und quantifiziert.

3.5 Fluoreszenzanisotropie

3.5.1 Das Fluoreszenzspektrophotometer

Für die Messungen der Anisotropie wurde ein SLM 8100 Fluoreszenzspektrophotometer der Firma SLM Aminco verwendet. Der Aufbau des Gerätes ist in Abbildung 3.2 wiedergegeben.

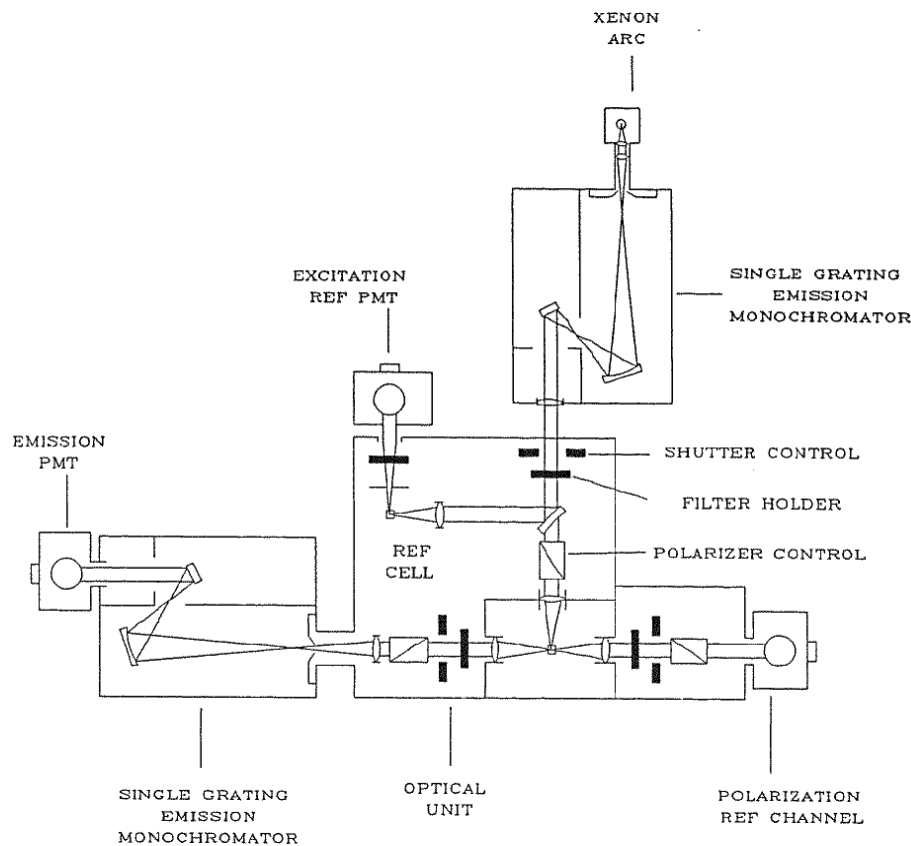


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau des SLM 8100 Fluoreszenzspektrometers (aus dem Handbuch der Firma SLM Aminco)

Mit Hilfe einer Xenonhochdrucklampe wird ein breites Frequenzspektrum an Licht erzeugt. Ein mit Spalten versehener Monochromator selektiert das Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses wird durch den Anregungspolarisator polarisiert und mit Hilfe einer Linse auf eine Fluoreszenzküvette fokussiert. Senkrecht zur Anregungsrichtung wird das Licht über eine weitere Linse aufgefangen und, in der Abbildung links, nach Durchlaufen des Emissionspolarisators durch einen Monochromator eine bestimmte Wellenlänge selektiert. Die Lichtintensität wird mit Hilfe eines Photomultipliers gemessen. Auf der rechten Seite in der Abbildung ist ein zweiter Meßkanal abgebildet, bei dem durch einen separaten Polarisator eine bestimmte Lichtebene detektiert und das emittierte Licht durch einen Filter selektiert wird. Ein kleiner Teil des Anregungslichtes wird durch einen teildurchlässigen Spiegel auf den

Referenzkanal umgelenkt. In diesem wird die Fluoreszenz einer Lösung von 3 g/l Rhodamin B in Ethylenglykol gemessen. Normieren der Meßsignale auf diesen Kanal mittels eventuelle Intensitätsschwankungen der Lampe aus dem Signal. Der Küvettenhalter des Spektrometers ist über einen Thermostaten temperierbar.

Bei den Anisotropiemessungen wurden zwei verschiedenen Meßmethoden verwendet. Die meisten Messungen wurden im L-Format der Anordnung vorgenommen. Man mißt dann auf der linken (Monochromator) Seite zunächst die Intensität I_{\parallel} der Emission parallel zur Anregung und dann durch Drehen des Polarisators um 90° die Intensität I_{\perp} senkrecht dazu (Abbildung 3.3, links). Bei der T-Format-Messung werden die Intensitäten $I_{V,\parallel}$ und $I_{V,\perp}$ gleichzeitig gemessen. Der Polarisator auf der Monochromatorseite steht dabei immer parallel zur Anregung, der Polarisator auf der Filterseite steht immer senkrecht zur Anregung. Die T-Format-Methode erlaubt schnellere und besser reproduzierbare Messungen, sie wurde nach der Anschaffung eines zweiten Photomultipliers stets benutzt.

Für beide Meßmethoden ist die Messung eines geräte- und aufbauspezifischen Parameters G notwendig, der die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Messungen für Licht unterschiedlicher Anregungsrichtungen berücksichtigt. Bei der L-Format-Messung wird Licht verschiedener Anregungsrichtungen durch den Emissionsmonochromator unterschiedlich gut durchgelassen. Bei der T-Format-Messung haben Filter und Monochromator verschiedene Durchlaßeigenschaften. Man wählt nun eine Anordnung, bei der theoretisch die parallel und senkrecht gemessenen Intensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} genau gleich groß sein müßten, indem man den Anregungsmonochromator um 90° dreht (Abbildung 3.3, rechts). Dann sind die gemessenen Intensitäten $I_{H,\parallel}$ und $I_{H,\perp}$ beide senkrecht zur Anregung und sollten gleiche Intensität besitzen.

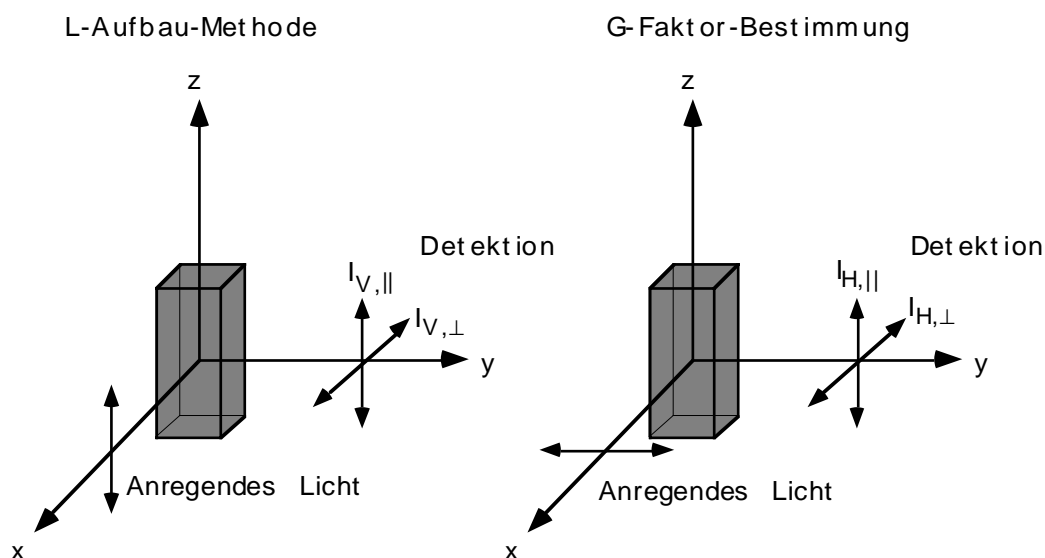


Abbildung 3.3: Schemata der L-Format-Messung und der G-Faktor Bestimmung. Die Doppelpfeile geben die Polarisationsrichtung des elektrischen Feldes der Lichtwellen an.

Der G-Faktor ergibt sich zu

$$G = \frac{I_{H,\parallel}}{I_{H,\perp}} \quad (3.5)$$

Das wirklich aus der Küvette abgestrahlte Verhältnis der Intensitäten ist dann

$$\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = \frac{1}{G} \cdot \frac{I_{V,\parallel}}{I_{V,\perp}} \quad (3.6)$$

Aus Gleichung (2.2) für die Anisotropie erhält man durch Umformen

$$r = \frac{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} - 1}{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} + 2} \quad (3.7)$$

Durch die Aufnahme von insgesamt vier Intensitäten kann also das Meßgerät auf die apparativen Gegebenheiten geeicht und die Anisotropie bestimmt werden.

Die gemessenen Konzentrationen lagen im Bereich von 2.5 bis 100 nM. Um bei diesen niedrigen Konzentrationen möglichst große Signalstabilität zu erreichen, wurden die Spalte beider Monochromatoren auf 16nm Halbwertsbreite (Maximale Öffnung) eingestellt. Die Anregung wurde auf 540nm eingestellt und die Emission auf 580nm. Im rechten Kanal wurde die Rayleigh-Streuung durch Einsatz eines Langpassfilters 570nm mit Interferenzbeschichtung abgeschnitten. Die Empfindlichkeit des/der Photomultiplier wurden jeweils so eingestellt, daß das Signal mit der größten Intensität 85% Meßausschlag zeigte.

3.5.2 Titrationsen

Die Titrationsen wurden in Fluoreszenzküvetten aus Quarzglas Suprasil der Firma Hellma durchgeführt. Dabei fanden 50 µl, 1 ml und 3 ml Küvetten Verwendung. Um das durch die optische Anordnung des Fluorimeters ausgeleuchtete Volumen auszufüllen, genügten bei der 1000 µl Küvette 500 µl und bei der 3 ml Küvette 1 ml Füllvolumen. Zur Verhinderung unspezifischer Bindung an der Glasoberfläche wurden die Küvetten silyliert. Dazu ließ man eine 5 %ige Lösung von Trimethylsilylchlorid (reinst, Sigma) in Toluol (p. A., Sigma) 10 Minuten auf die gereinigte Küvette einwirken, wusch anschließend mit Aceton (z. A., J. T. Baker) und trocknete bei 110 °C eine Stunde im Trockenschrank.

In der Küvette wurden (2.5-100) nM DNA in TKⁿA-Puffer (n=150,600), 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA vorgelegt. Das Protein wurde in TKⁿA-Puffer, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA und 0.1% Nonident P40 (NP40, Boehringer Mannheim, Stammlösung mit 10%) so verdünnt, daß eine Einzelzugabe zwischen zwei Meßpunkten mindestens 3 µl betrug. Die verwendeten Gilson-Pipetten zeigten oberhalb dieses Volumens Reproduzierbarkeiten von ±1.5%. Während

der Titration, die drei bis sechs Stunden dauerte, wurde die Proteinlösung eisgekühlt. Die Küvette wurde auf 25°C temperiert.

Nach der Zugabe einer bestimmten Proteinmenge wurde die Lösung in der Küvette mit einem Mikroglassührstab durchmischt und nach einigen Minuten der Meßwert bestimmt. Die Zeiten bis zur Messung wurden je nach genauer Zusammensetzung so gewählt, daß nach dieser Zeit keine Änderung der Anisotropie mehr erfolgte.

Für einen Meßwert wurden je fünf Werte der Anisotropie und fünf G-Werte aufgenommen mit einer Integrationszeit von je 8 Sekunden pro Signal bei der L-Methode und 4 Sekunden je Signal bei der T-Methode. Dies ergab Gesamtmeßzeiten für einen Meßpunkt von ca. 3 Minuten bzw. ca. 1 Minute bei vergleichbarer Meßgenauigkeit. Der Meßfehler eines einzelnen Meßpunktes wurde als Standardabweichung der 5 Meßwerte angegeben.

3.5.3 Datenanalyse

Die Verarbeitung der Meßdaten wurde nach Konvertierung durch die SLM-Software in ASCII-Format mit dem Apple Macintosh Programm Kaleidagraph vorgenommen. Die Volumenzunahme während einer Titration ist bei den verwendeten Bedingungen nicht zu vernachlässigen. Daher wurden für die einzelnen Meßpunkte sowohl die Gesamtkonzentrationen an DNA auf die Volumenzunahme als auch die Proteinkonzentrationen auf das aktuelle Gesamtvolumen korrigiert.

Zur Bestimmung von Äquivalenzpunkten wurden durch bestimmte Bereiche der Messungen Geraden gelegt und deren Schnittpunkt bestimmt (siehe dazu auch Abb. 2.7). Die Steigung und Achsenabschnitte der Geraden wurden mit Fehler durch die nichtlineare Anpassung an die im Bereich liegenden Meßpunkte bestimmt. Der Schnittpunkt ergab sich dann algebraisch aus den zwei Gleichungssystemen mit zwei Unbekannten, die die beiden Geradengleichungen darstellen. Aus dem algebraischen Zusammenhang zwischen Abszissenwert des Schnittpunktes und den Parametern der beiden Geraden wurde mit dem Gaußschen Gesetz zur Fehlerfortpflanzung ein Fehler für den Schnittpunkt abgeschätzt. Diese wiederkehrenden Berechnungen wurden in einem Excel-Arbeitsblatt zusammengefaßt.

Zur Berechnung der Bindungsdissoziationskonstanten für die Bindung eines Proteins an eine Dimerbindungsstelle benötigt man zunächst den Zusammenhang zwischen Bindungsgrad Θ und den Anisotropien r_1 und r_2 der beiden Komponenten. Für zwei Komponenten ist nach Gleichung (2.16) die Anisotropie

$$r = (1 - \Theta)r_1 + \Theta r_2 = r_1 + (r_2 - r_1)\Theta \quad (3.8)$$

Die Titrationskurven wurden an die Gleichungen (3.8) mit dem Bindungsgrad nach Gleichung (2.28) angepaßt, wobei drei Parameter vorgegeben waren: die Bindungsdissoziationskonstante K_{diss} und die Anisotropien der Komponenten 1 und 2. Dabei ergab sich für K_{diss} ein Fehler aus der Anpassung der Bindungskurve. Um noch den Fehler der Proteinkonzentration zu berücksichtigen, wurde die Kurve mit dem maximalen und minimalen Wert für die Proteinkonzentration $c_P \pm \Delta c_P$ nochmals angepaßt.

Daraus erhielt man $K_{\text{diss}} \pm \Delta K_{\text{diss},P}$. Dabei ist dieser Fehler nur der Fehler der Proteinkonzentration und es gilt näherungsweise

$$\Delta K_{\text{diss},P} = \frac{\partial K_{\text{diss}}}{\partial P} \Delta P \quad (3.9)$$

Aus der Gaußschen Fehlerfortpflanzungsformel erhält man durch Einsetzen von (3.9) und des Anpassungsfehlers für K_{diss} eine Abschätzung des Gesamtfehlers.

3.6 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

3.6.1 Das Confocor

Die Firmen Zeiss und Evotec stellten unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise ihr FCS-Meßgerät Confocor leihweise zur Verfügung. Der schematische Aufbau des Meßgerätes ist in Abbildung 3.4 wiedergegeben.

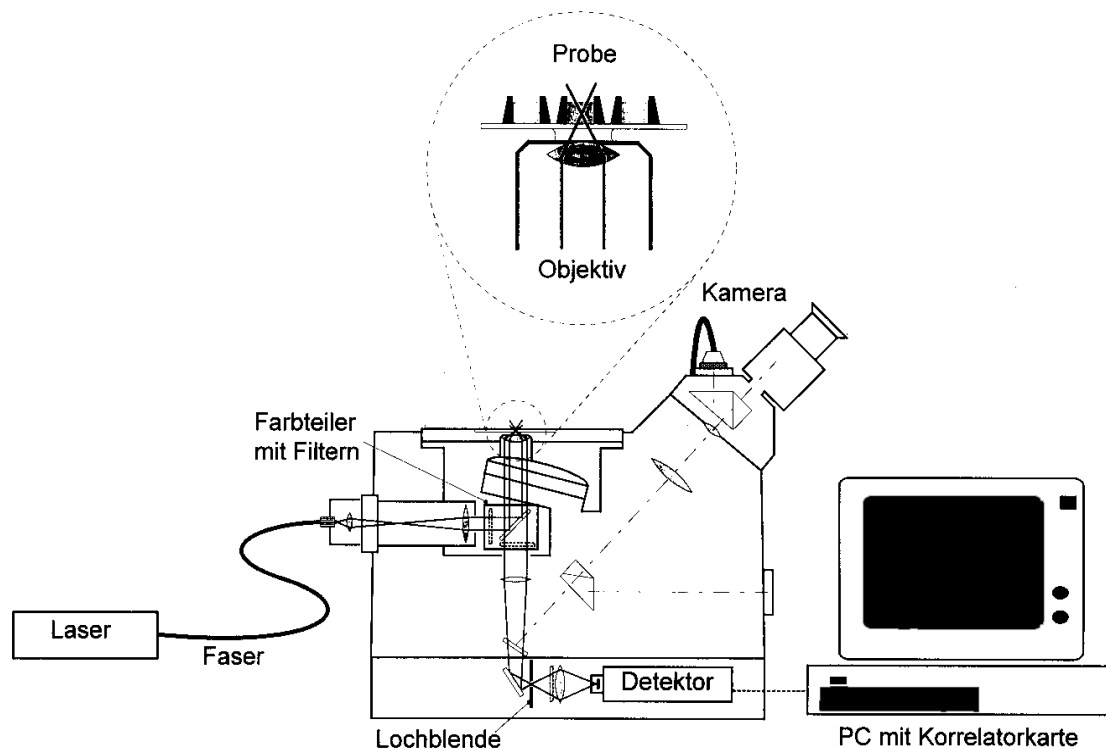


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau des Fluoreszenzkorrelationspektrometers der Firmen Zeiss und Evotec mit Wiedergabe des optischen Strahlenganges (Völcker et al., 1996).

Als Laser findet ein Argon-Laser mit einer Leistung von 20 mW Anwendung, die Anregungswellenlänge beträgt 514 nm. Die benötigte, weit geringere Leistung zur Messung stellt man durch Graufiltereinsätze ein. Mit einer polarisationserhaltenden Singlemode-Glasfaser wird das Licht zum Mikroskop übertragen, der Strahl aufgeweitet und dann das parallele Licht durch den Anregungsfilter auf den Farbteiler (ein dichroitischer Spiegel) gebracht. Für Licht der Anregungswellenlänge ist dieser undurchlässig und es wird zum Objektiv (einem C Apochromat 40x/1,2 für Wasser korrigiert) abgelenkt und in die Probe fokussiert. Wegen der Verwendung des wasserkorrigierten Immersionsobjektives befindet sich ein Tropfen Reinstwasser zwischen Objektiv und Meßgefäßboden. Auf dem umgekehrten Weg gelangt das Fluoreszenzlicht zum Farbteiler, der für längerwelliges Licht als das Anregungslicht durchlässig ist. Der Emissionsfilter schneidet die Ramanlinie (bei etwa 620 nm) ab und das Fluoreszenzlicht gelangt durch ein Linsensystem über die in Ihrer Größe verstellbare Lochblende zum Detektor,

einer Einzelphotonen zählenden Avalanche-Photodiode. Die Umsetzung des zeitaufgelösten Fluoreszenzsignals in die zugehörige Korrelationsfunktion erfolgt mittels eines Hardwarekorrelators.

3.6.2 Titrationsen

Als Meßgefäß fand ein 8-Kammer-Gefäß von Nunc (Lab-Tek, Chambered Coverglass) Verwendung, das einen ca. 140 µm dicken Borosilikatglasboden besitzt. Der Fokus des Objektivs wurde bei jeder Messung 200 µm oberhalb des Objektglasbodens eingestellt. Das Pinhole, das stets 50 µm groß gewählt wurde, wurde dann über computersoftwaregesteuerte Motoren auf eine optimale Lichtausbeute justiert. Ein Abschwächer wurde in den Strahlengang eingefügt, so daß die mittlere Fluoreszenzintensität bei zirka 20 kHz lag.

Eine Kammer war mit 400 µl 1 nM DNA in TKⁿA-Puffer (n=15, 600), 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT und 0.1% NP 40 gefüllt. 5 Messungen zu je 200 Sekunden ergaben eine mittlere Diffusionszeit für die freie DNA, den Strukturparameter des Aufbaues und die Tripletzeitkonstante der Messung (siehe auch die Datenanalyse in Kap. 3.6.3). Das Protein wurde im selben Puffer, in dem die DNA vorlag, verdünnt und während der Messung auf Eis gekühlt aufbewahrt. In Schritten von minimal 3 µl wurde es zur DNA-Lösung hinzugefügt und die Lösung mit einer Gilsonpipette vorsichtig gemischt. Nach einigen Minuten Wartezeit, die so gewählt wurde, daß sich die gemessene Diffusionszeit nach dieser Zeit nicht mehr änderte, wurde über 100 Sekunden eine Korrelationsfunktion aufgezeichnet.

3.6.3 Datenanalyse

Die Auswertung der Korrelationsfunktionen wurde mit Hilfe des Programmes "FCS Access Fit" der Firma Evotec vorgenommen. Die Funktion, die an die gemessene Korrelationsfunktion angepaßt wird, wurde bereits angegeben [Gleichung (2.24)]. Alle Messungen wurden so ausgewertet, daß maximal zwei fluoreszierende Komponenten in der Lösung angenommen wurden.

Die justageabhängigen Parameter von Gleichung (2.24) sind die Tripletzeitkonstante τ_T , der Strukturparameter k_{SP} und die Diffusionszeiten τ_1 (für das freie Oligonukleotid) und τ_2 (für den Komplex). τ_T , k_{SP} und τ_1 wurden mit den ersten Messungen des freien Oligonukleotides bei jeder Titration bestimmt. Für das Verhältnis von τ_2 und τ_1 ergibt sich nach Gleichung (2.20).

$$\frac{\tau_2}{\tau_1} = \frac{D_1}{D_2} \quad (3.10)$$

Die Diffusionszeiten zweier Komponenten bilden also in der FCS ein festes Verhältnis unabhängig von der genauen Größe und des Strukturparameters des Beobachtungsvolumens. Es hängt nur von den beiden Diffusionskoeffizienten D_1 und D_2 ab. Aus Messungen, bei denen

nur noch die zweite Komponente vorlag, also aus den Endwerten der stöchiometrischen Titrations, wurde die Diffusionszeit der zweiten Komponente bestimmt. Das Verhältnis der Diffusionszeiten wurde dann bei den anderen Messungen eingesetzt, um den zweiten Diffusionskoeffizienten zu errechnen.

Mit den verbliebenen Parametern wurde die Gleichung (2.24) an die gemessenen Korrelationsfunktionen angepaßt. Daraus erhält man dann den Anteil der beiden Komponenten in jedem Ansatz. Für die zweite Komponente entspricht dieser Anteil dem Bindungsgrad Θ des gebildeten DNA-Protein-Komplexes.

Stöchiometrische Messungen wurden analog zu Kap. 3.5.3 ausgewertet. Bindungskurven für die Bindung eines Proteins an eine Dimerbindungsstelle wurden durch Anpassung der Meßdaten an Gleichung (2.28) analysiert. Die Gesamt-DNA-Konzentration in der Lösung und die Gesamt-Proteinkonzentration wurden auf das während der Titration zunehmende Gesamtvolumen korrigiert. Ein wichtiger Fehler, der bei der Analyse der Bindungskurven noch eingeht, ist die Unsicherheit der Bestimmung der Diffusionszeit des DNA-Protein-Komplexes. Um dafür einen Fehler abzuschätzen, wurden die Korrelationsfunktionen auch mit den maximalen und minimalen Diffusionszeiten des Komplexes angepaßt, und die erhaltenen Bindungsgrade ebenfalls angepaßt. Man erhält so $K_{\text{diss}} \pm \Delta K_{\text{diss}, D_2}$, wobei für diesen Fehler wieder näherungsweise gilt:

$$\Delta K_{\text{diss}, D_2} = \frac{\partial K_{\text{diss}}}{\partial D_2} \Delta D_2 \quad (3.11)$$

Damit kann der Gesamtfehler aus Anpassungsfehler und Diffusionszeitfehler nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung abgeschätzt werden.

4. Experimentelle Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Oligonukleotideinzelstränge

Für die Bestimmung der Bindungskonstanten muß die Konzentration der DNA-Duplexe möglichst genau bekannt sein. Um aus der Absorption der DNA ihre Konzentration zu bestimmen, ist es notwendig, ihren Extinktionskoeffizienten bei 260 nm zu kennen.

Die Markierung der DNA-Einzelstränge mit Rhodamin führt zu einer zusätzlichen Absorption im zur Konzentrationsmessung verwendeten UV-Bereich. Während unmarkierte DNA erst unterhalb von etwa 300 nm absorbiert, zeigt der markierte Einzelstrang eine kontinuierliche Absorption ab ca. 600 nm. Die Spektren eines tetramethylrhodaminmarkierten DNA-Einzelstranges und des freien Farbstoffes Tetramethylrhodaminisothiocyanat sind in Abbildung 4.1 wiedergegeben.

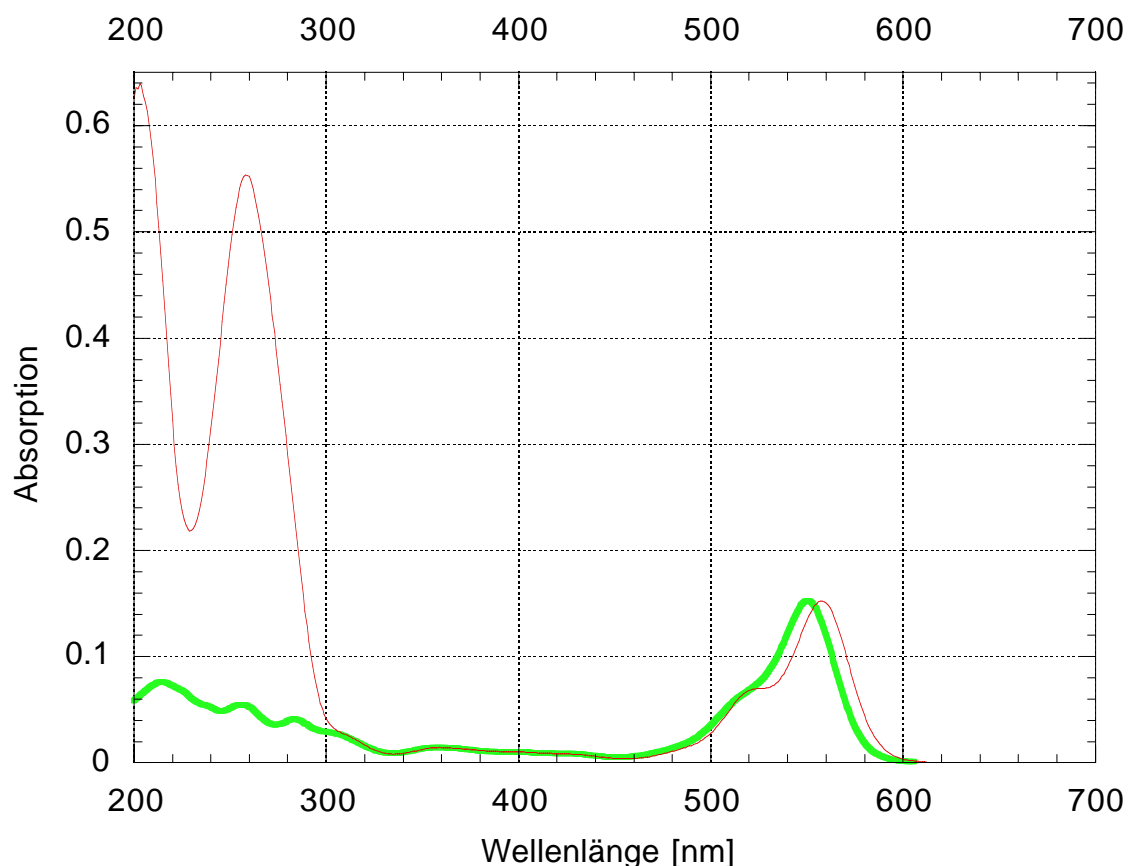


Abbildung 4.1: Absorptionsspektren des rhodaminmarkierten NtrC1-Einzelstranges (schmale Linie) und von Tetramethylrhodaminisothiocyanat (breite Linie) in TE-Puffer.

Die beiden Spektren sind auf das jeweilige Maximum der Rhodaminabsorption normiert. Das Absorptionsmaximum für DNA-gebundenes Rhodamin liegt bei 558 nm, das für freies

Rhodamin bei 551nm. Die Form der Absorptionsspektren ist im sichtbaren Bereich sehr ähnlich, die Flächen des Rhodamin-Peakes stimmen recht gut überein. Im Bereich um 260 nm ändert sich der Absorptionswert des freien Farbstoffes nur sehr langsam, so daß eine eventuelle Verschiebung, wie sie am Emissionsmaximum beobachtet wird, den Untergrund nur geringfügig ändern würde. Außerdem liegt der Untergrund nur im Bereich von 10 % der Gesamtabsorption bei 260nm, so daß ein Fehler von 5 % für den Untergrund sich nur als 0.5 % Fehler für den DNA-Anteil der Absorption bemerkbar machen würde. Die Abschätzung des Untergrundes durch Messung der Absorption des freien Farbstoffes erscheint somit sinnvoll und gerechtfertigt. Der Fehler bei der Berechnung der Extinktionskoeffizienten der DNA-Oligonukleotide beträgt 5 - 10 % , daher ist eine genauere Korrektur des Rhodaminuntergrundes nicht sinnvoll.

Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten einer DNA-Sequenz aus den Absorptionskoeffizienten der Mono- und Dinukleotide nach Puglisi (Puglisi & Tinoco, 1989) setzt voraus, daß die Nukleotide keine Sekundärstrukturen ausbilden, denn diese führen wie die Duplexbildung zur Absenkung des Absorptionswertes. Bilden die Einzelstränge Sekundärstrukturen, so ergeben Temperaturkurven der Absorption der Einzelstränge zunächst einen recht steilen Anstieg der Absorption, bei höheren Temperaturen nimmt sie dann weiter proportional zur Temperatur zu. Der anfängliche Anstieg wird durch das Aufschmelzen der Sekundärstruktur verursacht, während man einen langsamen linearen Anstieg der Absorption mit der Temperatur sowohl bei doppelsträngiger als auch bei einzelsträngiger DNA beobachten kann (Puglisi & Tinoco, 1989). Ein Beispiel einer solchen Kurve ist für den Einzelstrang NtrC1 in Abbildung 4.2 wiedergegeben. Durch Extrapolation des linearen Verlaufes bei höheren Temperaturen auf 25°C erhält man den Absorptionswert sekundärstrukturfreier Oligonukleotide bei 25°C. Aus diesem Wert und dem aus der Sequenz berechneten Extinktionskoeffizienten kann nun die Konzentration bestimmt werden.

Die für die verschiedenen Einzelstränge erhaltenen Korrekturfaktoren sowie die theoretisch berechneten und die korrigierten Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 4.1 aufgeführt (zur Definition siehe Kap. 3.2.2). Sie zeigen in etwa identische Werte f_{sek} für die Sekundärstrukturen der markierten und unmarkierten Einzelstränge. Das Rhodamin scheint hier also keine Veränderung der Struktur hervorzurufen. Bei den einfachen und den doppelten NtrC-Bindungssequenzen kann man auf recht starke Sekundärstrukturbildung schliessen. Ein Blick auf die Basensequenzen zeigt, daß die symmetrischen Bindungsstellen mit ihren komplementären Basensequenzen geeignet sind, um an diesen Einzelsträngen Haarnadelstrukturen (hairpins) auszubilden.

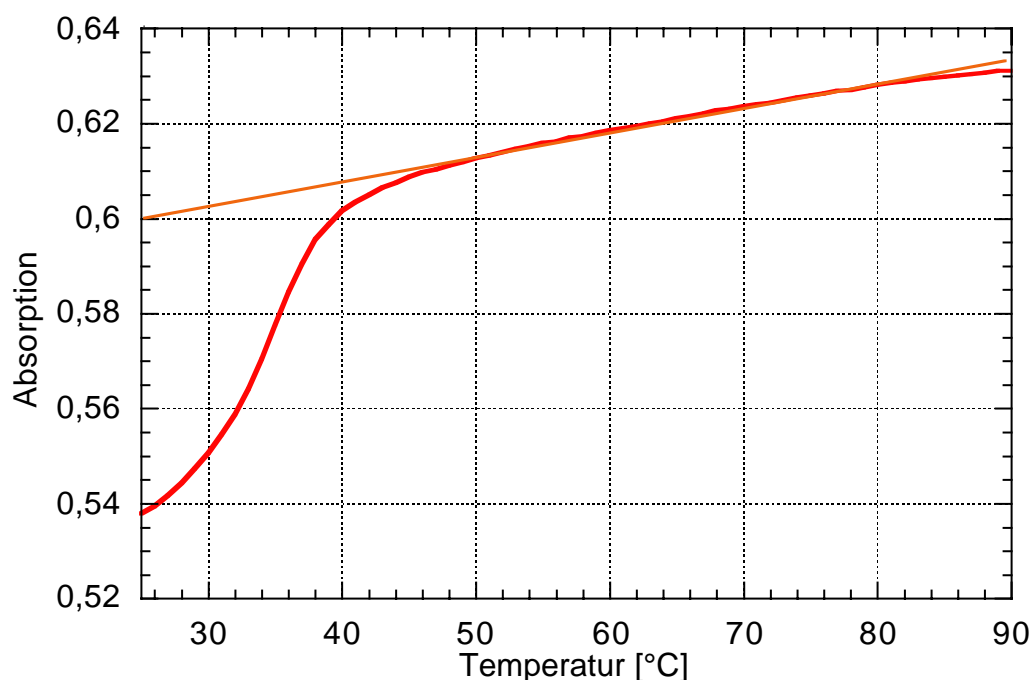


Abbildung 4.2: Schmelzkurve des Einzelstranges NtrC1 (dunkle Kurve). Die Absorption ohne Sekundärstrukturen erhält man durch Extrapolation des linearen Verlaufes bei erhöhter Temperatur nach 25°C (helle Gerade).

Einzelstrang	f_{Sek}	f_{Rh}	$\epsilon_{\text{berech}} [\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	$\epsilon_{\text{korrr}} [\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
NtrC1	1.14	1	599	683
NtrC2	1.09	1	579	631
NtrC1-Rh	1.11	0.903	599	600
NtrC3	1.07	1	328	351
NtrC4	1.02	1	309	315
NtrC3-Rh	1.07	0.898	328	315
RNAP1	1.03	1	583	600
RNAP2	1.02	1	575	587
RNAP1-Rh	1.02	0.944	583	561

Tabelle 4.1: Korrekturfaktoren der Oligonukleotid-einzelstränge für 25°C. Die berechneten Extinktionskoeffizienten ϵ_{berech} (Puglisi & Tinoco, 1989) und die aus den Korrekturfaktoren erhaltenen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{korrr}} = f_{\text{Sek}}f_{\text{Rh}}\epsilon_{\text{berech}}$ sind wiedergegeben.

Der Rhodaminuntergrund der langen Sequenz NtrC1 ist etwa so groß wie der der kurzen Sequenz NtrC3. Der Extinktionskoeffizient scheint also für die beiden DNA-gebundenen Marker unterschiedlich zu sein. Eine andere Anomalie zwischen den beiden Markierungen findet man bei der Anisotropie der Duplexe (Kap. 4.3.3). Die Eigenschaften des DNA-gebundenen Farbstoffes scheinen von der Sequenz abhängig zu sein, an die er gebunden ist.

Insgesamt sind insbesondere die Sekundärstrukturkorrekturen für die NtrC-Bindungssequenzen als auch die Rhodaminhintergrundkorrektur relevant für eine gute Konzentrationsbestimmung der markierten Oligonukleotide. Die Mischung komplementärer Einzelstränge ergab nach diesen Korrekturen Doppelstrangbildung von mehr als 95 % (Abschätzung nach Kontrolle mit Gelelektrophorese).

4.2 Gelretardations-Analyse

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst die Gelretardations-Analyse benutzt. Die Bindungsdissoziationskonstante einer der hier verwendeten sehr ähnlichen NtrC-Bindungssequenz wurde in der Literatur zu 0.2 nM bestimmt (Weiss et al., 1992). Die wesentlich höheren Konzentrationen an DNA und Protein (mikromolar) in dem hier verwendeten Ansatz sollten daher stets zu quantitativer Bindung des Proteins an die DNA führen.

Das Gel in Abbildung 4.3a zeigt von Reihe 1-4 die Referenzbanden mit verschiedenen Mengen an DNA-Duplex ES, die zur Kontrolle der Quantifizierung der DNA-Banden gemacht wurden. Ab Reihe 5 wurden dann wachsende Anteile NtrC^{S160F}-Protein zugesetzt. An der Seite liefen die DNA-Banden etwas nach, aber da die Protein-Banden wesentlich langsamer liefen, konnte zur Quantifizierung die gesamte Fläche der DNA-Bande herangezogen werden. Geschätzt aus den Kontrollbanden der Messung war der Fehler der Quantifizierung etwa 10 % nach dieser Methode. Aus jeder der DNA-Banden 6-10 konnte eine Konzentration der Proteinstammlösung berechnet werden unter der Annahme stöchiometrischer Bindung des zugesetzten Proteins. Dies ergab (unter Einbeziehung zweier weiterer Gele) eine Konzentration von $(2.0 \pm 0.3) \mu\text{M}$ Dimer in der Stammlösung. Eine Abschätzung der Konzentration mittels Absorption des Proteins bei 280 nm hatte nach der Herstellung 5 μM Dimer ergeben. Während der Lagerzeit von ca. 2 Jahren ist also etwa die Hälfte des Proteins deaktiviert worden.

Neben der Hauptbande des DNA-Protein-Komplexes sieht man bei allen Protein enthaltenden Reihen eine zweite, etwas schnellere Bande im Bereich des Protein-DNA-Komplexes, die sich der Bindung eines einzelnen Dimers zuordnen läßt. Ihr Anteil ist jedoch sehr gering, er wurde bei der Analyse der Proteinaktivität vernachlässigt. Dies entspricht anderen Ergebnissen, wo eine hohe Kooperativität bei der Bindung zweier benachbarter NtrC^{S160F}-Mutanten an die Enhancer-Bindungsstelle beobachtet wurde (Porter et al., 1993).

Gelretardations-Analysen mit dem ES/2-DNA-Fragment mit einer Protein-Bindungsstelle wiesen in Übereinstimmung mit dieser Interpretation nur eine langsame Bande auf (Abbildung 4.3b). Das Gel enthält wiederum in den Reihen 1-4 Referenzkonzentrationen an dem kurzen DNA-Fragment ES/2 und dann wachsende Volumina an Protein NtrC^{S160F}. Insgesamt ist die hier beschriebene Gelretardations-Analyse zur Bestimmung der Proteinkonzentration geeignet. Da bei dieser Methode die Proteinaktivität unter völlig anderen Bedingungen als bei den

Fluoreszenzmessungen bestimmt wird und die Quantifizierung nicht so genau war, wurde sie nur zu Beginn bei der Kontrolle der NtrC^{S160F}-Proteinfraktionen eingesetzt.

Um die Aktivität der Proteine in Fluoreszenztitrationen möglichst gut zu bestimmen, ist es besser, diese Aktivität auch unter denselben Bedingungen und mit derselben Quantifizierung zu messen. Daher wurden die Konzentrationen der benutzten Proteinfraktionen im weiteren Verlauf durch stöchiometrische Fluoreszenztitrationen bestimmt.

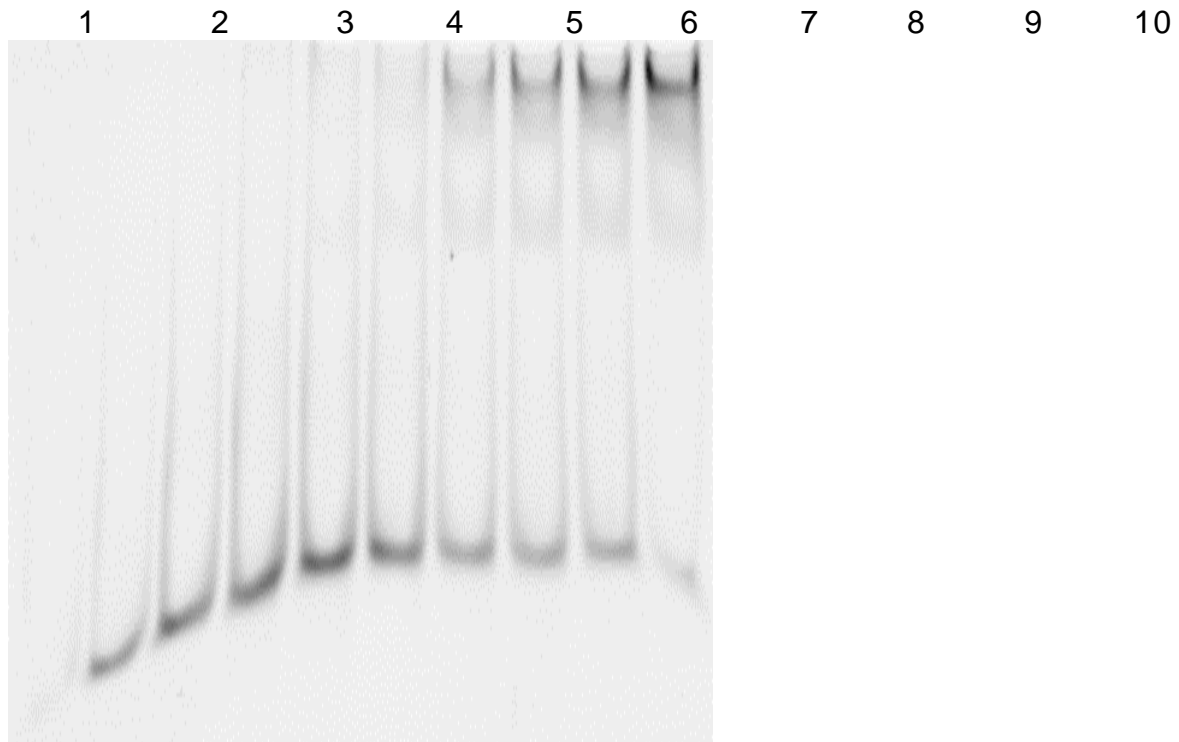


Abbildung 4.3a: Gelretardations-Analyse zur Konzentrationsbestimmung von NtrC. Die ersten vier Banden enthielten 0,2, 0,4, 0,6 und 0,8 pmol DNA-Fragment ES, alle anderen 0,8 pmol ES und von 5 nach 10 0,4, 0,8, 1,6, 2,0, 2,66 und 4,0 μ l an NtrC^{S160F}-Stammlösung. Der Puffer bestand aus TK^{150A}, 1mM DTT und 10 mM Mg. Die Proteinaktivität betrug hier 1,8 μ M.

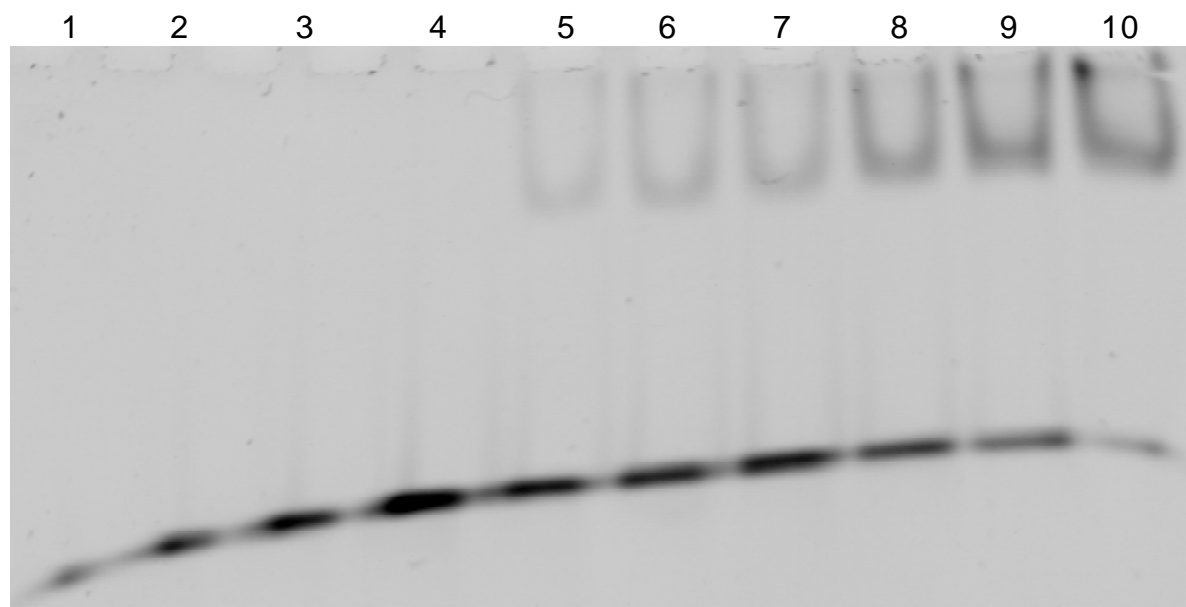


Abbildung 4.3b: Gelretardations-Analyse zur Konzentrationsbestimmung von NtrC. Die ersten vier Banden enthielten 0.25, 0.5, 0.75 und 1.0 pmol DNA-Fragment ES/2, alle anderen 0.8pmol ES/2 und von 5 nach 10 0.5, 1.0, 1.25, 1.67, 2.5 und 4.0 µl an NtrC^{S160F}-Stammlösung. Der Puffer bestand aus TK^{150A}, 1 mM DTT und 10 mM Mg. Die Proteinaktivität wurde aus diesem Gel zu 2.3 µM bestimmt.

4.3 FA-Messungen

Zur Bestimmung der aktiven Proteinkonzentration in den vorhandenen Stammlösungen wurden zunächst Reaktionsbedingungen gewählt, die quantitative Bindung des NtrC-Proteins an die DNA erwarten ließen. Außerdem dient der vorhersagbare Verlauf der Kurven, insbesondere der anfängliche lineare Anstieg der Anisotropie, zur Kontrolle der Richtigkeit der Messungen.

4.3.1 Stöchiometrische Titrations des DNA-Fragmentes ES/2 mit NtrC

Die folgenden Untersuchungen wurden bei mäßigen Salzkonzentrationen und DNA-Konzentrationen durchgeführt, die eine quantitative Bindung des Proteins erwarten ließen.

Für das DNA-Fragment mit einer NtrC-Bindungsstelle ES/2 erwartet man die Bindung mindestens eines NtrC-Protein-Dimers, eventuell weitere Proteine könnten durch Protein-Protein-Wechselwirkungen gebunden werden. Es wurden der nicht-transkriptionsaktive Wildtyp des Proteins und die transkriptionsaktive Mutante NtrC^{S160F} untersucht.

4.3.1.1 NtrC-Wildtyp

In Abbildung 4.4 ist die Titration des DNA-Fragmentes ES/2 mit einer Dimerbindungsstelle mit dem Wildtyp-NtrC-Protein wiedergegeben. Die Kurve zeigt den erwarteten Verlauf der Anisotropie für die Bildung eines definierten Komplexes aus DNA und Protein. Zu Anfang erfolgt quantitative Bindung des Proteins an die DNA, und der Wert der Anisotropie steigt gemäß

$$r = (1 - \Theta)r_1 + \Theta r_2 = r_1 + (r_2 - r_1)\Theta \quad (3.8)$$

linear an, da der Bindungsgrad bei quantitativer Bindung eine lineare Funktion der zugegebenen Proteinmenge ist. Nachdem ein etwa dreifacher Überschuß erreicht ist, wird ein Plateau für die Anisotropie erreicht. Es wird also kein weiteres Protein mehr gebunden.

Man extrapoliert nun die Anfangssteigung der Titration auf den Endwert und erhält eine Konzentration des NtrC-Dimers von (229 ± 17) nM (Fehler aus dem Fehler der Regressionsgeraden, siehe Kap. 3.5.3). Aus insgesamt drei solchen Messungen ergibt sich für die Proteinlösung (243 ± 22) nM (Fehler aus Standardabweichung der drei Mittelwerte). Die Proteinlösung war eine 40-fach verdünnte Lösung der Proteinstammlösung, woraus sich für diese (9.72 ± 0.9) μ M errechnet. Eine Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe der Absorption bei 280 nm ergab 10.0 μ M. Aus Meßreihen, die einige Monate später durchgeführt wurden, ergab sich für die dann aufgetauten Aliquots der Proteinstammlösung (7.6 ± 0.7) μ M,

die Aktivität hatte also deutlich abgenommen. Zu jeder Meßreihe mußten also die Konzentrationen an aktivem Protein neu bestimmt werden.

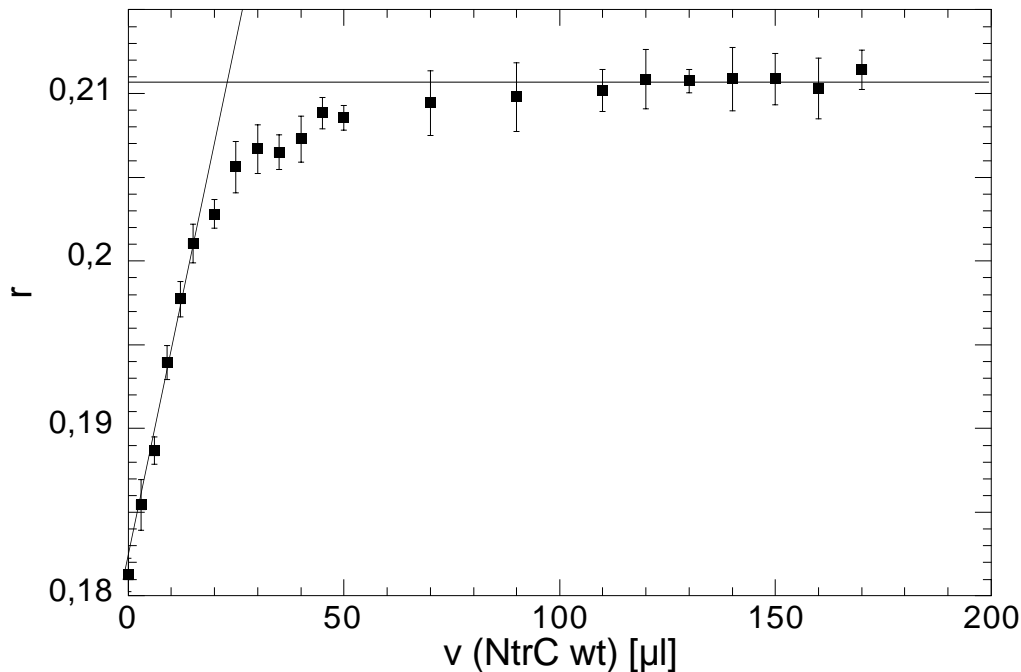


Abb 4.4: Bindung des NtrC-Wildtyp-Proteins an das DNA-Fragment ES/2. Der Puffer war TK¹⁵⁰A, 1 mM DTT und 0.1 mg/ml BSA. Der angegebene Meßfehler der Einzelmeßpunkte ergibt sich aus der Standardabweichung von 5 Meßwerten je Meßpunkt. Die beiden Geraden zeigen die Extrapolation des Äquivalenzpunktes der Titration aus der anfänglich linearen Steigung der Meßpunkte und dem erreichten Endwert.

Daß wirklich genau ein Dimer an das DNA-Fragment gebunden wird, haben Karsten Rippe und Norbert Mücke durch Gleichgewichtsläufe in der analytischen Ultrazentrifuge nachgewiesen (K. Rippe, N. Mücke und J. Langowski unveröffentlicht). Für verschiedene Mischungen von NtrC-wt und nichtrhodaminmarkiertem ES/2 ergaben sich zwei Komponenten mit Massen von 19900 (DNA-Fragment) und 130000 Dalton (DNA + ein Dimer). Die Aktivität der NtrC-wt-Stammlösungen ergab sich zu 6.3 µM. Für diese Messungen wurden weder BSA noch NP 40 dem Puffer zugesetzt, so daß die Proteinaktivität durch unspezifische Bindung etwas erniedrigt sein könnte. Außerdem liefen die Messungen über 24 h, was ebenfalls einen gewissen Aktivitätsabfall hervorrufen könnte. Die Übereinstimmung mit den Aktivitätsmessungen in dieser Arbeit zum selben Zeitpunkt, die 7.6 µM ergeben hat, ist somit gut.

Aus allen mit Anisotropie verfolgten stöchiometrischen Titrationen ergibt sich für das freie ES/2 Fragment ein Anisotropiewert von 0.180 ± 0.002 , für den Komplex aus ES/2 und einem NtrC-wt-Dimer eine Anisotropie von 0.209 ± 0.002 .

4.3.1.2 NtrC^{S160F}

Die Titrations des DNA-Fragmentes ES/2 mit der Mutante NtrC^{S160F} ergeben einen etwas anderen Verlauf der Anisotropieänderung (Abbildung 4.5). Auch hier lässt sich die Titration in mehrere Abschnitte unterteilen: zu Beginn steigt die Anisotropie steil an, im späteren Verlauf steigt sie wesentlich langsamer, aber wieder linear, an.

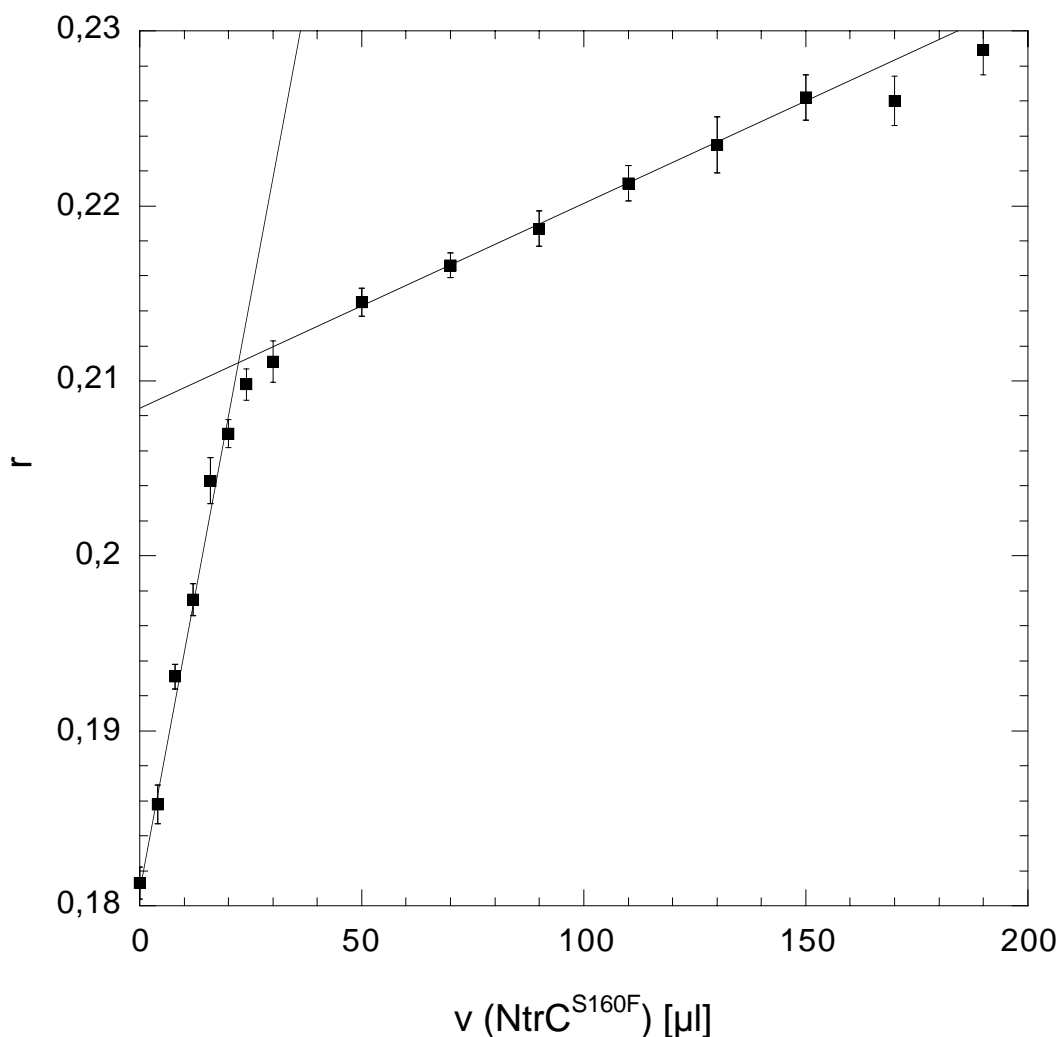


Abbildung 4.5: Bindung von NtrC^{S160F}-Protein an das ES/2-DNA-Fragment (Meßpunkte mit Fehlerbalken). Die beiden Geraden sind eingezeichnet, aus denen der Äquivalenzpunkt extrapoliert wird. Dazu wurden für die linke Gerade die Meßwerte von 0-16 µl verwendet, für die rechte Gerade die Werte von 50-150 µl. Die DNA-Konzentration betrug 10.0 nM.

Legt man durch die beiden Bereiche zwei Geraden und bildet den Schnittpunkt, erhält man für die Anisotropie im Schnittpunkt der beiden Geraden 0.211 ± 0.002 . Dies stimmt mit dem Wert der Anisotropie für den 1:1 Komplex des Wildtyps mit dem DNA-Fragment ES/2 gut überein. Der erste Teil der Kurve zeigt also die Bindung eines Protein-Dimers an. Man kann aus der Meßkurve einen Äquivalenzpunkt bestimmen und daraus die Konzentration des Proteins ableiten. Für die Messung in Abbildung 4.5 ergibt sich die Konzentration des NtrC^{S160F}-

Proteins zu (233 ± 17) nM (Meßfehler aus Schnittpunktfehler der Regressionsgeraden, siehe Kap. 3.5.3). Aus dem Mittelwert von drei Messungen ergibt sich die Konzentration zu (230 ± 14) nM. Da die Proteinlösung eine auf 1/10 verdünnte Lösung der Stammlösung war, war diese also (2.30 ± 0.14) μ M. Die Übereinstimmung mit der Gelretardations-Analyse, die (2.0 ± 0.3) μ M ergab, ist also zufriedenstellend. Der Fehler der Methode erweist sich aber als nur halb so groß und die Anisotropie liefert damit genauere Werte als die Intensitätsmessung der Banden.

Nach dem vollständigen Absättigen mit einem Dimer wird weiteres Protein gebunden. Da die Bindung eines Dimers an die DNA praktisch quantitativ erfolgt, bevor weiteres Protein gebunden wird, muß die Bindungsdissoziationskonstante für die Bindung weiterer Protein-Dimere wesentlich größer sein als die des ersten Dimers an die DNA. Der lineare erscheinende Anstieg bei der Bindung weiterer Proteine erfolgt über einen sehr langen Bereich, bis etwa 8:1 für das Verhältnis von Protein zu Dimer ist der Anstieg sehr linear und alle Meßpunkte liegen auf einer Geraden. Wieviele Dimere an der weiteren Bindung an das DNA-gebundene Protein beteiligt sind, kann man aus dieser Titration nicht ableiten.

Die Mengen des zugesetzten Proteinstammlösungspuffers waren bei diesen Messungen nicht mehr vernachlässigbar, da die Konzentration der NtrC^{S160F}-Stammlösung nicht sehr hoch war. Um ganz sicherzugehen, daß der spätere Anstieg der Anisotropie nicht auf der Zunahme der Viskosität der Lösung durch den langsam ansteigenden Anteil an Glycerin beruhte, wurde die Anisotropieänderung einer DNA-Lösung durch Zugabe von Protein-Puffer ohne Protein gemessen. Auch die größten bei den Messungen verwendeten Proteinpuffervolumina veränderten die Anisotropie der DNA-Lösung nicht merklich. Die Änderung der Zusammensetzung war also nicht die Ursache des Anisotropieanstieges.

Die aufgenommenen Kurven lassen somit qualitativ den Schluß zu, daß die NtrC^{S160F}-Mutante unter Bedingungen zur Oligomerisierung neigt, unter denen das Wildtyp-Protein an der DNA praktisch keine weiteren Dimere bindet. Diese Oligomerisierung tritt bereits auf, ohne daß eine zweite NtrC-Bindungsstelle an der DNA vorhanden ist.

4.3.2 Bindung von NtrC an das DNA-Fragment ES/2

Die Bindungsdissoziationskonstanten des NtrC-Proteins an eine einzelne Proteinbindungsstelle sind zentral für das Verständnis der Bindung an der Enhancer-Bindungsstelle ES mit zwei Bindungsstellen. Nur wenn die reine Bindungsdissoziationskonstante zwischen der DNA und dem Protein bekannt ist, kann eine kooperative Bindung zweier Proteine, also eine die DNA-Bindung verstärkende Protein-Protein-Wechselwirkung, quantifiziert werden. Die unterschiedliche biologische Wirkung von Wildtyp-NtrC und der Mutante NtrC^{S160F} könnte zum Teil auf einer unterschiedlichen Bindungsstärke an die DNA-Bindungsstellen beruhen. Um diese Frage zu untersuchen, wurden die folgenden Messungen durchgeführt.

4.3.2.1 Bindungsdissoziationskonstante bei niedrigen Salzkonzentrationen

Die zur Bestimmung der Proteinkonzentration gemachten Titrations sollten auch Aufschluß über die Bindungsdissoziationskonstante unter diesen Bedingungen geben. Aus der nun bekannten Konzentration der zutitrierten Proteinlösung läßt sich zu jedem Meßpunkt die Gesamtkonzentration an Protein in der Lösung berechnen. Der Zusammenhang zwischen dem Bindungsgrad und der Gesamtproteinkonzentration ist für den Fall einer DNA mit einer Bindungsstelle durch Gleichung (2.28) gegeben, Gleichung (3.8) gibt den Zusammenhang zwischen der Gesamtanisotropie des Systems und dem Bindungsgrad an. Die Anpassung dieser beiden Gleichungen an die Meßdaten einer Titration ist in Abbildung 4.6 wiedergegeben. Man erhält für die Bindungsdissoziationskonstante (0.91 ± 0.31) nM. Der Fehler setzt sich zusammen aus dem Fehler der Anpassung und dem Fehler, der für die Proteinkonzentration bei der stöchiometrischen Titration bestimmt worden war (Details siehe Kap. 3.5.3). Aus zwei weiteren Messungen erhält man insgesamt für $K_{\text{diss}} = (0.46 \pm 0.32)$ nM.

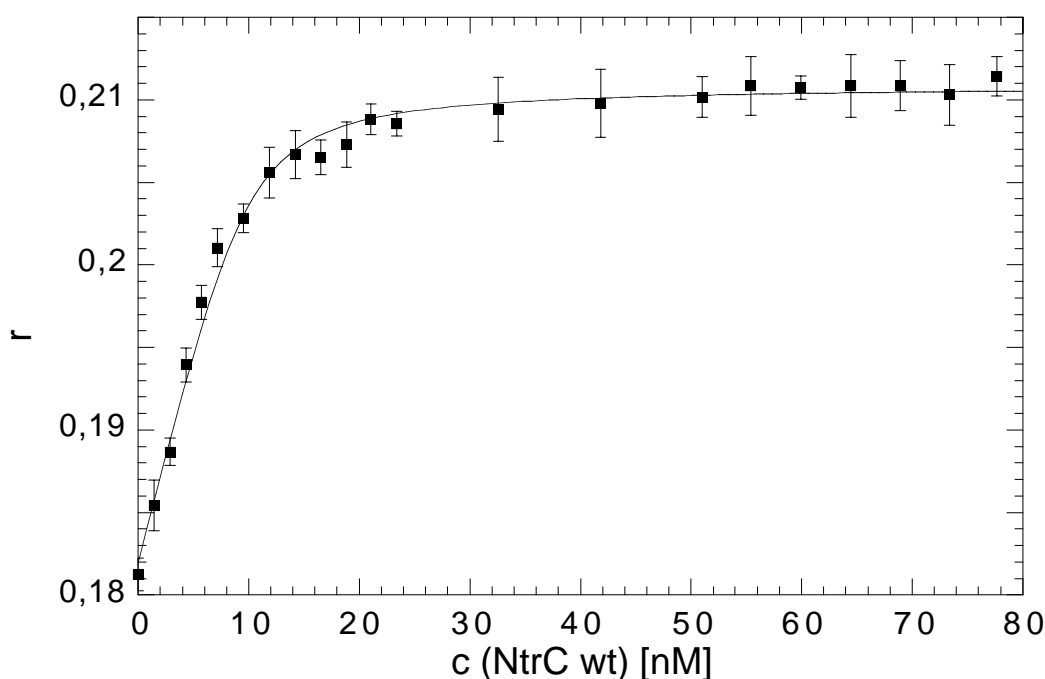


Abbildung 4.6: Titration des DNA-Fragmentes ES/2 mit NtrC-Wildtyp. Der Puffer war TK¹⁵⁰A mit 1 mM DTT und 0.1 mg/ml BSA. Die durchgezogene Linie gibt die beste Anpassung entsprechend der Bindung eines Dimers an die DNA an.

4.3.2.2 Bindungsdissoziationskonstante bei hohem Salzgehalt

Die Bindungsdissoziationskonstanten an das DNA-Fragment ES wurden für NtrC-Wildtyp und NtrC^{S160F} bei 600 mM [K⁺] bestimmt. Aus dem Verlauf der Meßkurve für eine 2.5 nM Lösung von DNA mit 600 mM [K⁺] 150 mM erkennt man sofort die Veränderung der Bindungskurve (Abbildung 4.7 für das NtrC^{S160F}-Protein).

Der Anstieg ist bereits zu Beginn recht flach und ist bei äquimolaren Mengen von DNA und Protein (hier 2.5 nM) noch weit entfernt von quantitativer Bindung. Es ergibt sich bis zum Ende der Meßkurve keine quantitative Bindung, so daß man näherungsweise die weitere Bindung von NtrC^{S160F} Proteinen vernachlässigen und die Meßdaten unter Annahme des 1:1 Bindungsmodelles anpassen kann.

Aus der Anpassung der Meßdaten erhält man für die Bindungsdissoziationskonstante (4.7 ± 1.1) nM. In Abbildung 4.7a wurde auf der Ordinate der Bindungsgrad aufgetragen, so daß man den Verlauf der Bindung besser bewerten kann als bei einem Auftrag der Anisotropie. Der Bindungsgrad läßt sich für jeden Meßpunkt aus dem Wert für die Anisotropie der freien und gebundenen DNA nach Gleichung (3.8) bestimmen.

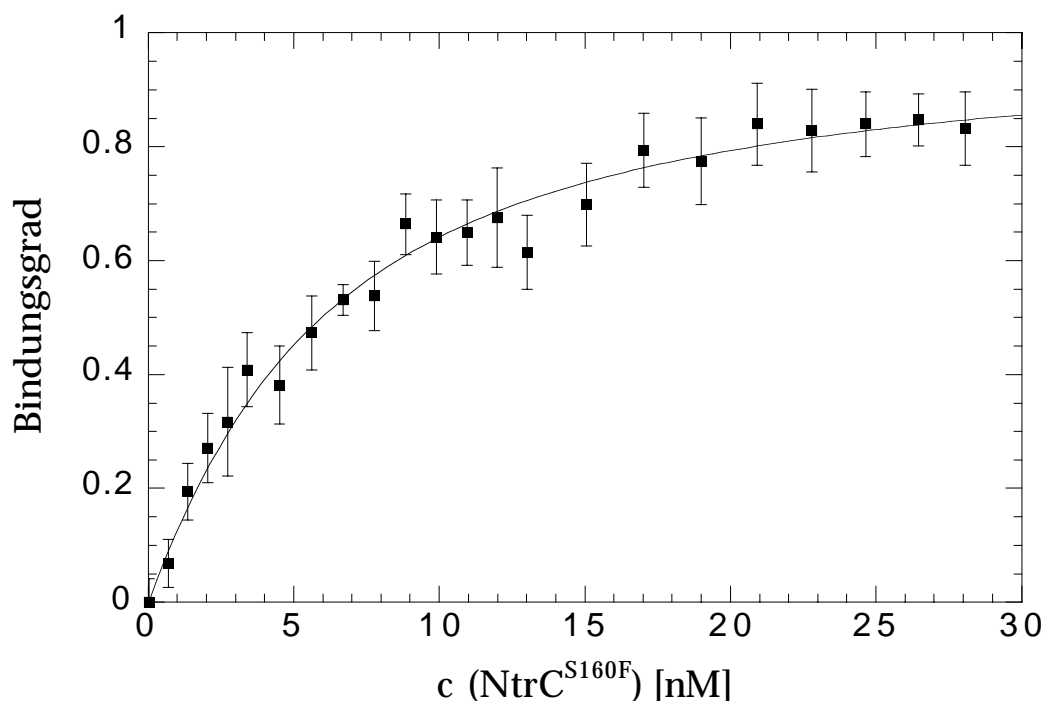


Abbildung 4.7: Titration von 2.5 nM DNA-Fragment ES/2 mit NtrC^{S160F}. Der Puffer war TK^{600A} mit 1 mM DTT und 0.1 mg/ml BSA. Die durchgezogene Linie gibt die beste Anpassung der Daten an.

Der Anfangs- und Endwert der Anisotropie waren Parameter bei der Anpassung der Meßdaten, für die Meßpunkte wurde dann der Bindungsgrad berechnet und in ein neues Diagramm aufgetragen. Der durch die Anpassung gefundene Anfangswert für die Anisotropie fällt in etwa mit dem ersten Meßpunkt zusammen. Er liegt mit 0.183 ± 0.002 bei den Messungen mit 600 mM [K⁺] etwas höher als bei den Messungen mit 150 mM [K⁺]. Auch der Endwert der Anisotropie aus der Anpassung ist geringfügig nach oben verschoben, er beträgt 0.211 ± 0.001 . Die Ursache für diesen Effekt ist nicht sicher geklärt, sie liegt vermutlich in einer ionenstärkeabhängigen Wechselwirkung zwischen dem Rhodamin und der DNA. Insgesamt liegen die Werte aber sehr nahe bei den anderen gemessenen Werten.

Drei Messungen ergaben einen Mittelwert für die Bindungsdissoziationskonstante des NtrC^{S160F}-Proteins von (5.2 ± 0.5) nM.

Durch analoge Titrations erhält man für das NtrC-Wildtyp-Protein eine Bindungsdissoziationskonstante von (4.2 ± 0.9) nM. Bei diesem Protein wurde auch eine Titration bei 10 nM DNA-Konzentration durchgeführt. Dies ist dort methodisch unbedenklich, da ja kein weiteres Protein mehr nach quantitativer Bindung gebunden wird. Wie erwartet, ist der Verlauf der Bindungskurve etwas steiler (Abbildung 4.8). Wie vorher, wurde auch für dieses Diagramm der Bindungsgrad aus den angepaßten Daten der Anisotropie berechnet. Unter diesen Bedingungen wird ein größerer Anteil des zugegebenen Proteins gebunden. Die Anpassung der Meßdaten ist gut. Damit ist gezeigt, daß die gefundene Bindungsdissoziationskonstante nicht von der vorgelegten DNA-Konzentration abhängt.

Innerhalb des Fehler sind also die Bindungsdissoziationskonstanten von NtrC-Wildtyp und NtrC^{S160F} identisch. Die isolierte DNA-Protein-Wechselwirkung der beiden Proteine ist gleich stark!

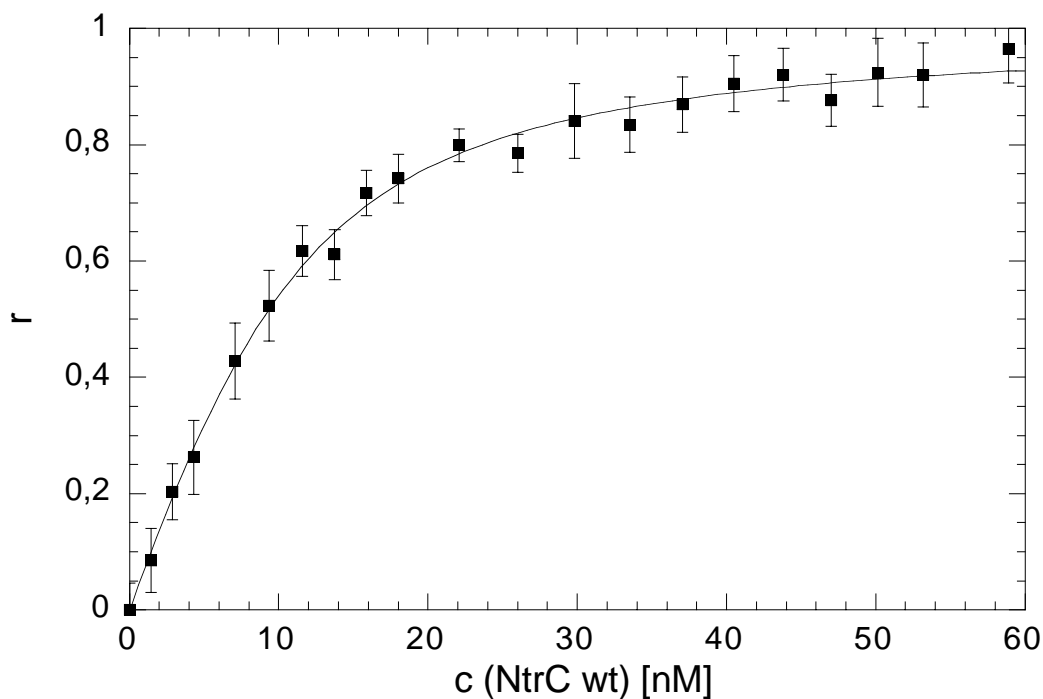


Abbildung 4.8: Titration von 10.0 nM DNA-Fragment ES/2 mit Wildtyp-NtrC. Der Puffer war TK^{600A} mit 1 mM DTT und 0.1 mg/ml BSA. Die durchgezogene Linie gibt die beste Anpassung der Meßdaten an.

4.3.3 Stöchiometrische Titrations des DNA-Fragmentes ES mit NtrC

Der Verlauf der Anisotropie bei der Bindung von NtrC an die Enhancer-Site ES mit zwei Bindungsstellen sollte auf die Anzahl der gebundenen NtrC-Dimere schließen lassen, wenn sich geeignete Bedingungen für eine stöchiometrische Titration finden lassen.

Dazu wurden die gleichen DNA-Konzentrationen von 10 nM eingesetzt wie bei der Titration der einfachen Bindungsstelle. Die Konzentrationen der verwendeten Lösungen der Proteine wurden in jeweils vorangehenden stöchiometrischen Titrations mit einer Bindungsstelle geeicht. Daraus ließ sich für jede Titration zu jedem Meßpunkt das Verhältnis von NtrC-Dimer zu DNA berechnen. Dieses Verhältnis ist in Abbildung 4.9 auf der Abszisse gegen die Anisotropie aufgetragen.

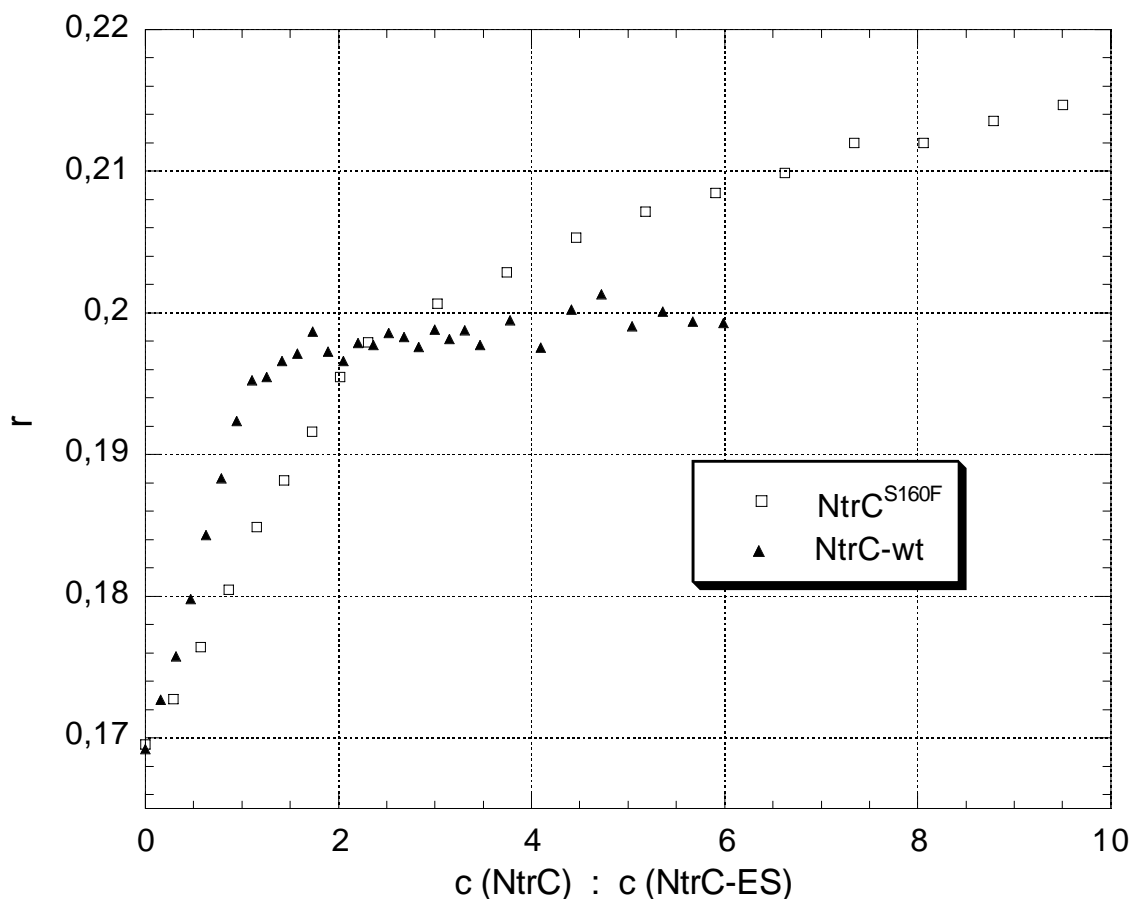


Abbildung 4.9: Titrationskurven für die Bindung von NtrC an die Enhancer-Bindungsstelle ES. Die DNA-Konzentration betrug 10 nM in TK¹⁵⁰A-Puffer mit 1 mM DTT und 0.1mg/ml BSA. Die gefüllten Dreiecke geben eine Titration des Wildtypes, die leeren Vierecke eine Titration der Mutante NtrC^{S160F} wieder. Beide Titrations sind auf jeweils gleiche Verhältnisse zugegebenen Proteins normiert. Der Übersichtlichkeit halber wurden die Meßfehler der Einzelmeßpunkte nicht angegeben, sie liegen um $\Delta r = \pm 0.001$.

Die Titrationskurve für den Wildtyp zeigt qualitativ den erwarteten Verlauf. Ein linearer starker Anstieg zu Beginn und dann das Erreichen eines Plateaus, das Absättigung der Bindung anzeigt. Extrapoliert man den linearen Anstieg auf den Endwert erhält man nicht das erwartete Verhältnis 2 : 1, sondern nur einen Wert von 1.20 ± 0.21 . Für zwei andere Messungen wurden 1.19 ± 0.21 und 1.36 ± 0.13 gefunden.

Der Endwert der erreichten Anisotropie entspricht dem, den man bei der Bindung von zwei Dimeren für das NtrC^{S160F} erreicht. Dann erfolgt ein weiterer etwas flacherer Anstieg, der beim Verhältnis 2 : 1 dem Endwert schon recht nahe kommt und dann nur noch sehr langsam weiter steigt. Wenn man für das Wildtyp-Protein eine nur geringe Kooperativität der Bindung des zweiten Dimers an die DNA annimmt, läßt sich der gefundene Verlauf der Anisotropie erklären. Die detaillierte Analyse des Kurvenverlaufes findet sich in Kapitel 5.3.

Die Bindungskurve für die NtrC^{S160F}-Mutante an die Enhancerbindungsstelle ES zeigt einen völlig anderen Verlauf (Abbildung 4.9). Er ist ähnlich dem Verlauf für die Bindung eines Dimers an die Bindungsstelle. Bis zu etwa einem Verhältnis von 2:1 Protein zu DNA findet ein recht starker linearer Anstieg der Anisotropie statt, dann erfolgt ein langsamerer weiterer Anstieg, der jedoch keinen längeren linearen Verlauf sondern eine langsam abfallende Steigung aufweist wie eine Bindungskurve unter nur teilweiser Absättigung der DNA. Wie bei einer Bindungsstelle findet man also auch hier zwei Abschnitte für die Bindung des Proteins an die DNA. Da der erste Bereich bis etwa zur Zugabe von 2 Proteinen pro DNA reicht, wird dieser der quantitativen Bindung von 2 Proteindimeren zugeschrieben. Der gerade Verlauf in diesem Bereich ist nur zu erwarten, wenn eine hohe Kooperativität der Bindung des zweiten Proteindimers besteht. Zu Beginn des zweiten Abschnittes ist der Anisotropieanstieg näherungsweise linear und man erhält für den Äquivalenzpunkt durch Schneiden dieser Geraden mit der Geraden der Steigung zu Beginn ein Verhältnis von $(2.28 \pm 0.25) : 1$. Für zwei andere Messungen ergab sich $1.93 : 1$ bzw. $2.18 : 1$, was in allen Fällen im Einklang mit der Bindung von zwei Dimeren ist.

Schließlich findet sich für die Anisotropie des freien DNA-Fragmentes ein Wert von $r = 0.1700 \pm 0.0012$ (Mittelwert aus 8 Messungen) und für den Komplex mit zwei Dimeren $r = 0.200 \pm 0.003$ (Mittelwert aus 6 Messungen). Eigentlich hätte man erwartet, daß die beiden Anisotropien größer sind, da ja das kurze DNA-Fragment bereits eine Anisotropie von 0.18 aufwies und sein Komplex mit einem Dimer eine Anisotropie von 0.21. Dies ist ein weiteres Indiz, daß die Basensequenz, an die der Chromophor gebunden ist, die Eigenschaften des Farbstoffes beeinflusst (siehe auch Diskussion in Kapitel 5.4).

4.3.4 Bindungsdissoziationskonstanten von RNA-Polymerase

Neben dem Verständnis des Aufbaues des Komplexes von NtrC an der Enhancer-Bindungsstelle ist an dem Transkriptionskomplex auch die Wechselwirkung der RNA-Polymerase mit der DNA und dem NtrC-Komplex wichtig zum Verständnis des Aktivierungsprozesses. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit stand eine kleine Menge des RNA-Polymerase- σ^{54} Holoenzymss zur Verfügung. Die Bindung mit der Promoter-Sequenz wurde in der Literatur bereits durch Footprinting-Experimente untersucht und ergab eine Bindungsdissoziationskonstante von 15 nM (Cannon et al., 1993). Dabei wurden etwas andere Salzkonzentrationen im Puffer benutzt (8 mM Magnesiumacetat, 10 mM Kaliumchlorid, 25 mM Tris-Puffer). Eine stöchiometrische Titration war mit den vorhandenen Proteinmengen nicht möglich und so wurde näherungsweise die durch Absorptionsspektroskopie bei 280 nm bestimmte Konzentration verwendet. Diese stellt eine Obergrenze für die mögliche Proteinaktivität dar. Die Aktivität könnte sich durch die Lagerung (ca. 2 Jahre) verringert haben. Bei der Datenanpassung wurden daher auch geringere Konzentrationen an Protein angenommen.

4.3.4.1 Promotorbindungsstelle PS

Die Konzentration der Promoter-Bindungsstelle wurde in der Größenordnung der in der Literatur gefundenen Bindungsdissoziationskonstanten gewählt. Es ergab sich eine Bindungskurve durch Zugabe von RNA-Polymerase zu der Lösung (Abbildung 4.10), die allerdings ein Plateau aufzuweisen hatte. Der auf dem Plateau erreichte Wert der Anisotropie ist bereits sehr hoch, gemessen an den Werten, die bei der Multimerisierung von NtrC gefunden wurden (ein Vier-Dimer-NtrC-DNA-Komplex hätte etwa dieselbe Masse wie der RNA-Polymerase-DNA-Komplex). Daher könnte es sich bei dem weiteren Anstieg um eine zweite unspezifische Bindung von RNA-Polymerase handeln.

Sowohl die Berücksichtigung aller Meßpunkte, als auch das Abschneiden der hinteren Meßpunkte führten bei der Anpassung an einen 1 : 1 Komplex zu Bindungsdissoziationskonstanten in einem Bereich von 5 - 45 nM. Dabei ergaben sich sinnvolle Anpassungen nur für angenommene Polymerase-Aktivitäten von 50 - 100 %. Bei der Anpassung unter Berücksichtigung aller Meßpunkte (wenn man annimmt, daß das "Plateau" aus zwei schlechten Meßpunkten gebildet wird) lagen die extrapolierten Anisotropien für den 1 : 1 Komplex etwas höher, insgesamt lagen sie zwischen 0.27 und 0.32.

Die Größenordnung der ermittelten Bindungsdissoziationskonstanten ist in Einklang zu bringen mit den in der Literatur gefundenen Werten.

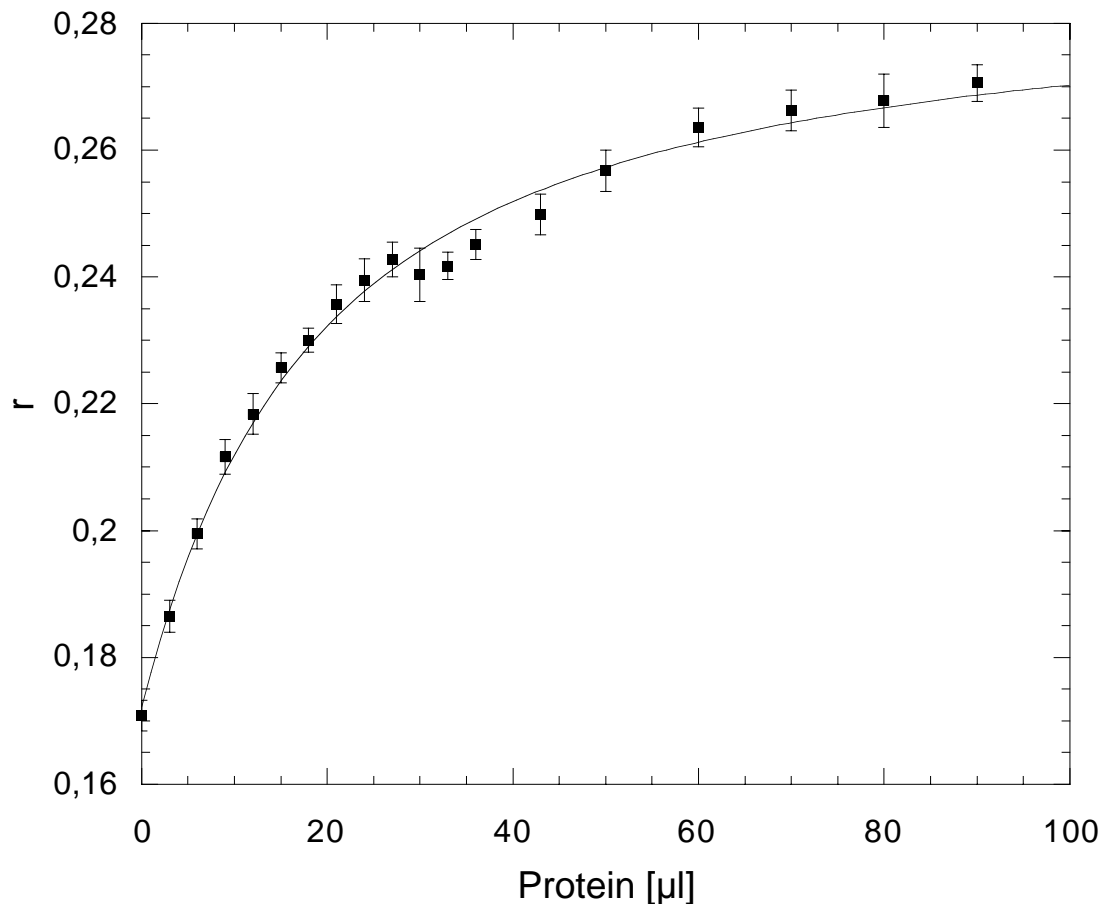


Abbildung 4.10: Titration von 50 µl 10 nM DNA-Fragment PS, Puffer TK¹⁵⁰A, 1 mM DTT, 0.1mg/ml BSA mit RNA-Polymerase- σ^{54} . Die angegebene Anpassung verwendet nur die Meßpunkte bis 36 µl Zugabe. Sie setzt eine Konzentration von 70 nM an zugegebener RNA-Polymerase voraus. Das ergibt einen Wert der Anisotropie für den Komplex von 0.287 und für K_{diss} 14 nM, am Ende der Titration wäre das Verhältnis von RNA-Polymerase zu DNA etwa 7 : 1.

4.3.4.2 Enhancerbindungsstelle-NtrC-Komplex

Die Bindung der RNA-Polymerase an den Komplex aus NtrC-Dimeren an der Enhancer-Bindungsstelle wurde in der Literatur bisher nur durch Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie qualitativ gezeigt. Die Anisotropie könnte die Möglichkeit bieten, diese Protein-Protein-Wechselwirkung zu quantifizieren.

Dazu wurde die Enhancerbindungsstelle mit zwei Äquivalenten NtrCS^{160F}-Dimer in einer Konzentration von 35 nM gemischt. Unter diesen Bedingungen sollte praktisch quantitative Bindung an die DNA erfolgen. Der Anisotropiewert dieser Lösung erreichte mit 0.197 fast den Wert des Äquivalenzpunktes der Titration mit zwei Dimeren. Die Zugabe der RNA-Polymerase führte dann zu einem weiteren Anstieg der Anisotropie. Die sich ausbildende Bindungskurve wurde mit dem Modell einer 1:1 Komplexbildung angepaßt.

Sinnvolle Anpassungen wurden nur für Polymeraseaktivitäten von 50 - 100 % gefunden, im Einklang mit den Ergebnissen der Bindung an die Promotorbindungsstelle. Dabei ergaben sich

für K_{diss} Werte von etwa 30 - 90 nM. Bei der nichtlinearen Anpassung führen Ausreißer oft zu schlechten Anpassungen. Man erkennt, daß sich keine Kurve durch alle Meßpunkte legen läßt, zum Beispiel sind die beiden letzten Meßpunkte nicht miteinander vereinbar. Das zeigen auch die Ergebnisse der Fehler der nichtlinearen Anpassung, die Fehlergrenzen für K_{diss} sind jeweils mehr als 100 %. Das Weglassen des letzten oder vorletzten Punktes ändert den extrapolierten Wert der Anisotropie des Gesamtkomplexes um etwa 0.03.

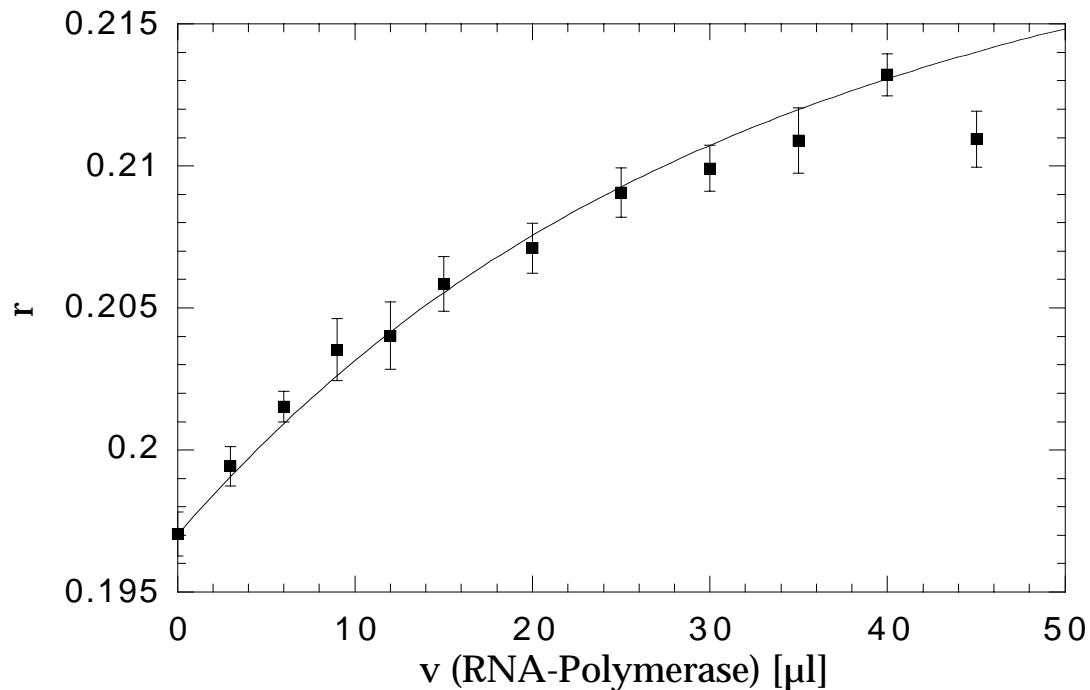


Abbildung 4.11: Titration von 72 µl 35 nM DNA-Fragment ES, 70 nM NtrC^{S160F}-Dimer in Puffer TK^{150A} 1 mM DTT und 0.1mg/ml BSA mit einer Lösung von RNA-Polymerase- σ^{54} . Die wiedergegebene Anpassung setzt eine Konzentration von 90 nM an zugegebenem Komplex voraus und ergibt einen Wert der Anisotropie für den Gesamtkomplex aus ES, 2 Dimeren NtrC und RNA-Polymerase- σ^{54} von 0.238. K_{diss} ist dann 35 nM.

4.4 FCS-Messungen

Die Bindung des NtrC-Wildtyp-Proteins an das ES/2-Fragment mit einer Dimer-Bindungsstelle wurde zum Vergleich mit Hilfe der FCS untersucht. Da bei diesem Dimer nur 1:1 Komplexe beobachtet wurden, erfordert die Analyse der einzelnen Titrationspunkte nur das Berücksichtigen zweier Komponenten.

Da die FCS die Messung sehr niedriger Konzentrationen ermöglicht, wurde eine Konzentration von 1 nM für die DNA gewählt. Um eine quantitative Bindung des Proteins bei der niedrigen DNA-Meßkonzentration von 1 nM zu erreichen, wurde für die stöchiometrischen Titrations die Salzkonzentration auf 15 mM Kaliumacetat erniedrigt.

4.4.1 Korrelationsfunktionen

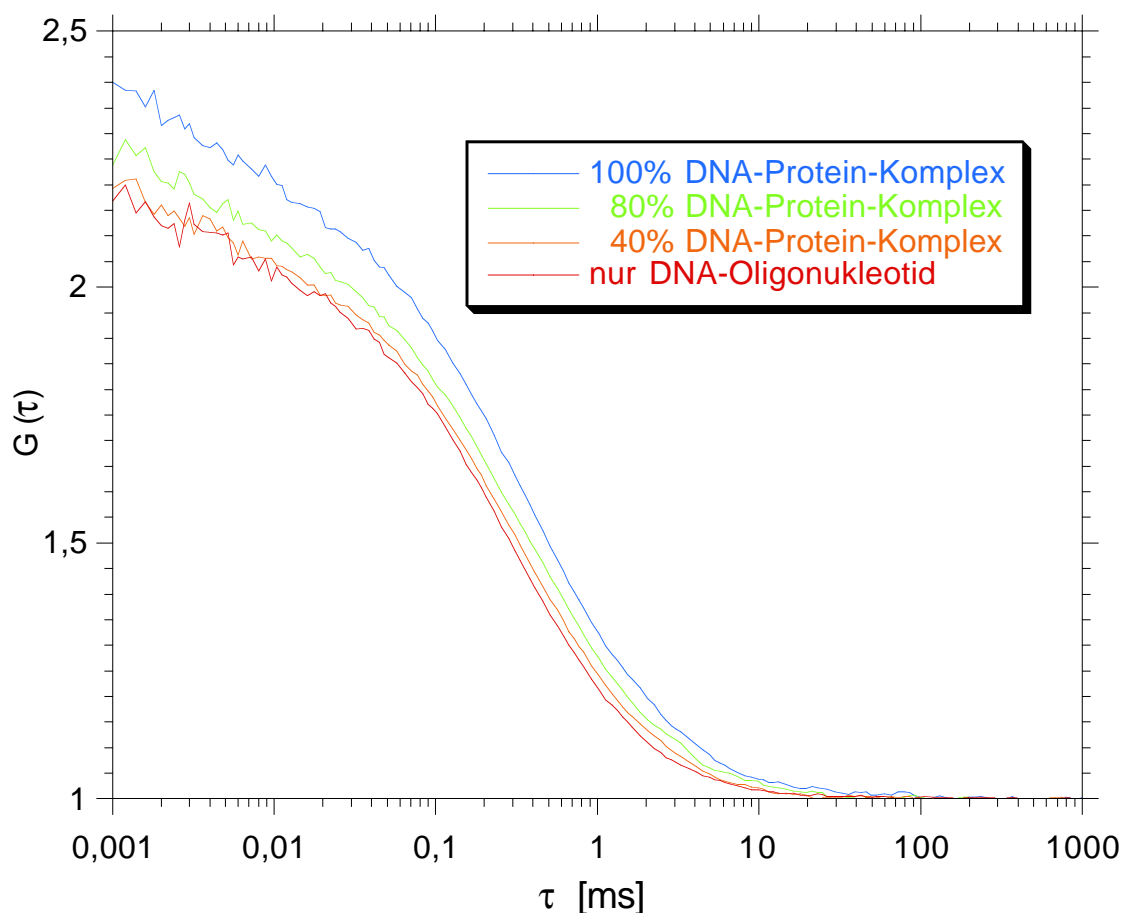


Abbildung 4.12: Experimentell bestimmte Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ von Gemischen mit verschiedenen Verhältnissen von DNA-Fragment ES/2 und DNA-NtrC-Komplex. Die Gesamtkonzentration an DNA betrug jeweils 1 nM. Die Anteile von freier und gebundener DNA wurden durch Anpassung der Korrelationsfunktionen an ein Zweikomponentenmodell bestimmt. Für jede Kurve wurde die Korrelationsfunktion 100 s gemessen.

Vier Korrelationsfunktionen, die bei verschiedenen Anteilen von freier DNA und DNA-Protein-Komplex aufgenommen wurden, sind in Abbildung 4.12 wiedergegeben. Auf der Abszisse ist dabei die Korrelationszeit τ aufgetragen.

Man erkennt in allen Korrelationsfunktionen den Abfall im Bereich von $\tau = 1 - 50 \mu\text{s}$, der durch die Tripletbildung im Fokus hervorgerufen wird. Die charakteristischen Diffusionszeiten der fluoreszierenden Teilchen finden sich bei etwa $\tau = 0.5 \mu\text{s}$, dort findet sich der zweite Abfall der Korrelationsfunktionen.

Die Ausbildung von immer mehr DNA-Protein-Komplex verschiebt die Kurve zu längeren Korrelationszeiten. Da durch die Proteinzugabe die Lösung auch verdünnt wird, nimmt der Ordinatenabschnitt der Korrelationsfunktion bei höheren Komplexkonzentrationen zu. Dies läßt die blaue Kurve (100 % Komplex) von den anderen stärker abgesetzt erscheinen, da bei ihr die Volumenvergrößerung wesentlich stärker ist als bei den anderen drei Messungen.

4.4.2 Diffusionszeiten des DNA-Duplexes ES/2 und seines Komplexes mit NtrC

Die Unterschiede in der Diffusionszeit zwischen der freien und gebundenen DNA sind relativ klein. Durch die stöchiometrisch gewählten Reaktionsbedingungen sollte man durch Titrations die Diffusionszeiten der Einzelkomponenten erhalten. Man findet, daß die Diffusionszeit zunächst etwas ansteigt, wenn man Korrelationsfunktionen von Lösungen wachsenden Proteingehaltes als Einkomponentensysteme anpaßt, und dann ein Plateau der Diffusionszeit erreicht wird. Die gewählten Reaktionsbedingungen führen also tatsächlich zu stöchiometrischer Bindung des Proteins und die Diffusionszeit der zweiten Komponente läßt sich aus Korrelationsfunktionen der Lösungen hohen Proteingehaltes bestimmen. Aus der Korrelationsfunktion ohne Protein ergibt sich die Diffusionszeit der freien DNA. Die Diffusionszeiten beider in der Lösung befindlichen Spezies sind damit bekannt.

Das Verhältnis der Diffusionszeiten zweier Spezies sollte nur vom Verhältnis ihrer Diffusionskoeffizienten abhängen.

$$\frac{\tau_2}{\tau_1} = \frac{D_1}{D_2} \quad (3.10)$$

Für vier verschiedene Messungen sind die gemessenen Diffusionszeiten für das DNA-Fragment ES/2 und den Komplex aus einem Dimer NtrC wt und ES/2 sowie ihr Verhältnis in Tabelle 4.2 wiedergegeben. Die absoluten Werte der Diffusionszeit sind etwas unterschiedlich, darin zeigt sich die unterschiedliche Justage des Meßgerätes mit verschieden guter Fokussierung des Meßvolumens. Die Reproduzierbarkeiten sind für alle Diffusionszeiten ähnlich, die der freien DNA sind etwas besser, da hier längere Meßzeiten zugrunde lagen. Für den Quotient ergibt sich 1.46 ± 0.11 (Fehler aus Standardabweichung der vier Quotienten).

Messung Nr.	τ_D [μ s]	τ_{DP} [μ s]	τ_{DP}/τ_D
1	323 ± 6	459 ± 8	1.421
2	383 ± 6	521 ± 3	1.612
3	259 ± 5	387 ± 6	1.494
4	283 ± 5	374 ± 9	1.322

Tabelle 4.2: Diffusionszeiten von ES/2 (τ_D) und seinem Komplex mit NtrC-wt (τ_{DP}) für vier verschiedene Messungen. Die Diffusionszeiten sind jeweils Mittelwerte aus fünf Messungen.

Mit einigen vereinfachenden Annahmen läßt sich dies auch theoretisch abschätzen. Für die Bestimmung verschiedener einfacher Formen von Teilchen sind theoretische Diffusionskoeffizienten hergeleitet worden. Für globuläre Teilchen gilt (Cantor & Schimmel, 1980)

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (4.1)$$

Dabei ist k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur, η die Viskosität und r der Radius der Teilchen. Der Radius von Teilchen läßt sich näherungsweise aus der Molmasse und dem spezifischen Volumen der Teilchen herleiten. Für den DNA-Protein-Komplex wird ein globuläres Teilchen als Näherung angesetzt, das Gesamtvolumen, das den Radius liefert, ergibt sich der Einfachheit halber durch Addition des DNA-Volumens und des Protein-Volumens. Man erhält für das NtrC-Dimer von 113 kD mit einem DNA-Fragment ES/2 von 19.64 kD einen Radius von 3.65 nm und einen Diffusionskoeffizienten von $5.9 \cdot 10^{-11}$ m²/s. Ein kurzes DNA-Fragment kann als unbiegsamer Stab betrachtet werden. Für einen Stab ergibt sich eine ähnliche Form wie Gleichung (4.1) für den Diffusionskoeffizienten, der Radius wird jedoch ersetzt durch

$$r = \frac{L}{2Q} \quad (4.2)$$

wobei L die Länge des Zylinders und Q ein vom Verhältnis von Länge zu Durchmesser d des Zylinders abhängiger Korrekturfaktor ist, der zum Beispiel von Broersma (Broersma, 1960) und später von de la Torre und Bloomfield (de la Torre & Bloomfield, 1981) berechnet wurde:

$$Q = \ln\left(\frac{L}{d}\right) + 0.312 + 0.565\left(\frac{L}{d}\right)^{-1} - 0.1\left(\frac{L}{d}\right)^{-2} \quad (4.3)$$

Man erhält eine Diffusionskonstante von $7.7 \cdot 10^{-11}$ m²/s für ein DNA-Fragment aus 32 Basenpaaren. Das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten von freier und gebundener DNA ergibt sich nach diesem theoretischen Ansatz aus Gleichung (3.10) zu 1.3. Da die Form des DNA-Protein-Komplexes sehr grob angenähert wurde, ist die Übereinstimmung mit dem gemessenen Wert sehr gut. Die Diffusionskonstanten nicht globulärer Teilchen sind immer

größer als die kugelförmiger Teilchen, somit würde eine unregelmäßige Form des Komplexes zu einem etwas größeren Verhältnis der Diffusionszeiten führen, wie es auch gefunden wurde.

4.4.3 Analyse der Korrelationsfunktionen

Nur wenn beide Diffusionszeiten aus anderen Messungen fest vorgegeben wurden, gelang eine Anpassung der gemessenen Korrelationskurven an zwei Komponenten mit sinnvollem Ergebnis. Wurden beide Diffusionszeiten freigegeben, ergaben sich keine zwei sinnvollen und in sich gleichbleibenden Diffusionskoeffizienten und die Anteile der "gefundenen" Komponenten machten für den erwarteten Verlauf der Titration keinen Sinn. Die schwerere Komponente nahm dabei während der Titration nicht konstant zu. Auch eine Anpassung mit einer festen Komponente, der leicht zu bestimmenden Diffusionszeit der freien DNA, brachte keine sinnvollen Ergebnisse.

Der Strukturparameter und die Tripletzeitkonstante sind während einer Titration ebenfalls konstant. Zu Beginn jeder Titration wurden durch längere Messungen mit dem freien Oligonukleotid diese Parameter sowie die Diffusionszeit der freien DNA bestimmt und dann für alle Anpassungen konstant gehalten. Insbesondere der konstante Strukturparameter verbesserte weiter die Konsistenz der erhaltenen Anteile an freier und gebundener DNA.

4.4.4 Stöchiometrische Titration des DNA-Fragmentes ES/2 mit NtrC

Man erhält direkt den Bindungsgrad des DNA-Protein-Komplexes für jeden Meßpunkt aus der Anpassung der einzelnen Korrelationskurven. Der Bindungsgrad entspricht dem Anteil der gebildeten schwereren Komponente an der Korrelationsfunktion. Eine Titrationskurve ist in Abbildung 4.13 wiedergegeben.

Die ersten 9 Meßpunkte liegen sehr gut auf einer Geraden (die Regressionsgerade ist eingezeichnet). Das bestätigt die vorgenommene Methode der Auswertung. Der extrapolierte Schnittpunkt für den Endpunkt der Titration liegt bei $(38.6 \pm 1.6) \mu\text{l}$. Aus der Verdünnung der verwendeten Proteinlösung (1/650) ergibt sich eine Konzentration der Proteinstammlösung von $(6.74 \pm 0.28) \mu\text{M}$. Der Mittelwert aus drei Titrationsen ergab sich zu $(6.64 \pm 0.12) \mu\text{M}$.

Weiter wurde bei diesen Titrationsen das Verhältnis der Diffusionszeiten von freier und gebundener DNA ermittelt (Daten siehe Tabelle 4.2, Kapitel 4.4.2). Für die Titrationskurven, die dann später aufgenommen wurden (Kap. 4.4.5) muß dieses Verhältnis bekannt sein, um die Korrelationsfunktion auszuwerten.

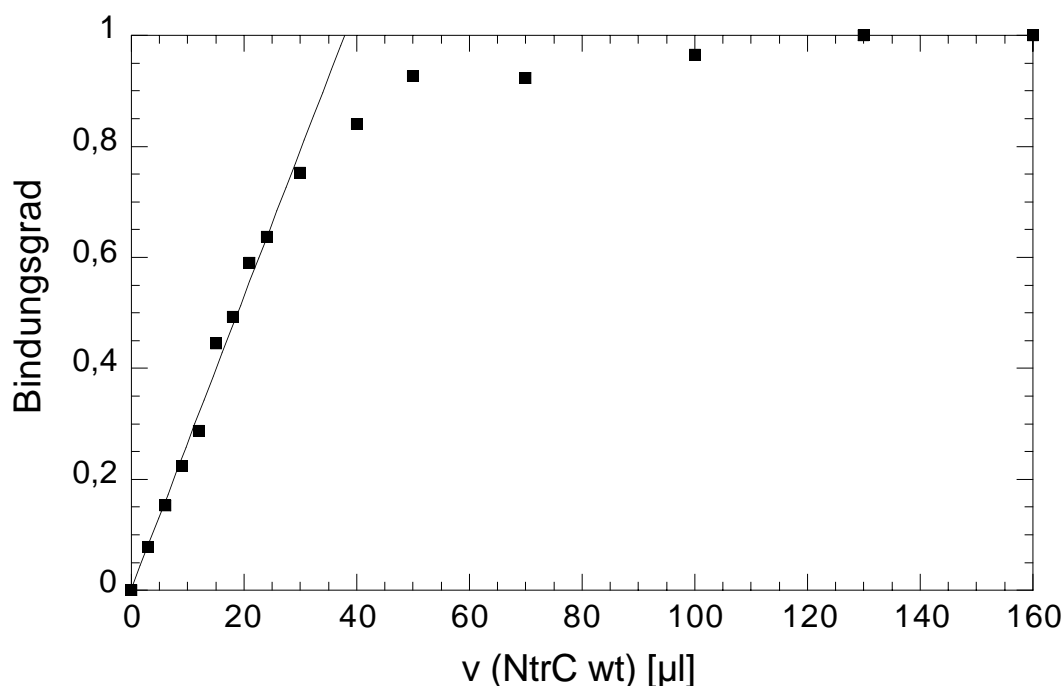


Abbildung 4.13: Titration von 400 µl einer 1 nM DNA-Fragment ES/2 Lösung mit dem Protein NtrC-wt. Auf der Ordinate ist direkt der Bindungsgrad aufgetragen. Die Gerade ergibt sich aus einer linearen Anpassung der ersten neun Meßpunkte. Der Puffer war TK¹⁵A mit 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA und 0,1 % NP 40.

4.4.5 Bindungsdissoziationskonstante von NtrC am DNA-Fragment ES/2

Die Auswertung der Titrationskurven erfolgt analog zu den Anisotropiemessungen durch Anpassen von Gleichung (2.28). Bei der Anpassung der stöchiometrischen Titrationsen ergeben sich auch hier stärker streuende Werte. Die Anpassung der abgebildete Titration (Abbildung 4.14) liefert für K_{diss} einen Wert von (0.02 ± 0.006) nM. Für eine andere Titrationsen ergab sich (0.007 ± 0.003) nM, im Mittel also (0.014 ± 0.007) nM. Der große Meßfehler zeigt wie bei den Anisotropiemessungen, daß der Informationsgehalt der Kurve für die Bestimmung von K_{diss} gering ist. Die Größenordnung der Ergebnisse zeigt aber, daß man für diese sehr starke Bindung eine außerordentlich niedrige DNA-Konzentration titrieren müßte, um eine besser auswertbare Bindungskurve mit nur partieller Bindung des zugegebenen Proteins zu erreichen.

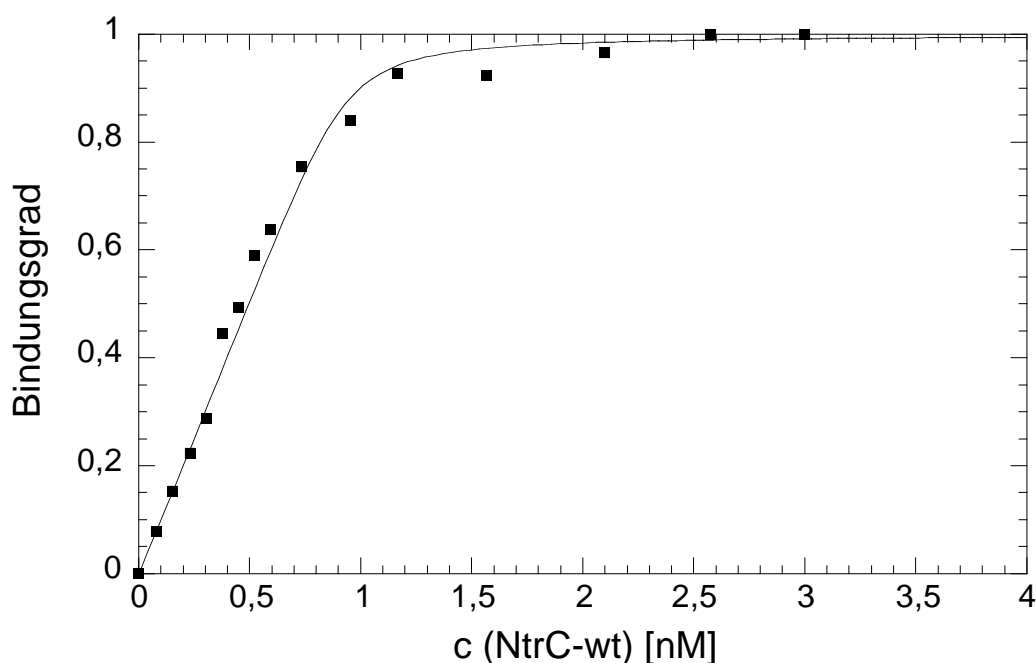


Abbildung 4.14: Titration von 1 nM DNA-Fragment ES/2 in TK¹⁵A-Puffer, 1 mM DTT, 0.1mg/ml BSA, 0.1% NP40 mit Wildtyp NtrC. Aus der Anpassung an die theoretische Bindungskurve ergibt sich K_{diss} zu (0.02 ± 0.006) nM.

Um Messungen von K_{diss} mit der FCS direkt mit Daten zu vergleichen, die bei den Anisotropiemessungen erhalten wurden, wurde die Bindungsdissoziationskonstante des Wildtyp NtrC bei 600 mM $[K^+]$ untersucht. Dabei wurden wieder 1 nM DNA vorgelegt. Die Bindungskurven sind in Abbildung 4.15 wiedergegeben. Wie man erwartet, ist der Bindungsgrad im Bereich äquimolarer Mengen etwas geringer als bei 2.5 nM DNA, wie sie bei den FA-Messungen vorgelegt wurde. Die Streuung der Punkte deutet auf einen Meßfehler der Einzelmeßpunkte von $\Delta\Theta = \pm 0.08$ hin. Das ist etwa doppelt so groß wie die Fehler der Einzelmeßpunkte der Anisotropiemessungen.

Für K_{diss} wurden für zwei verschiedene Messungen beide Male (7.3 ± 2.5) nM ermittelt. Der Fehler enthält dabei neben dem Anpassungsfehler noch einen Anteil für die Unsicherheit der Bestimmung der zweiten Diffusionszeit, die ja direkt nur bei den stöchiometrischen Titrations bestimmt werden konnte. Dieser Fehler trägt wesentlich zu der Unsicherheit der Bestimmung von K_{diss} bei. Im Vergleich mit der FA ergeben sich hier Bindungsdissoziationskonstanten der gleichen Größenordnung, sie werden aber bei der FCS etwa 1.7 mal größer gefunden.

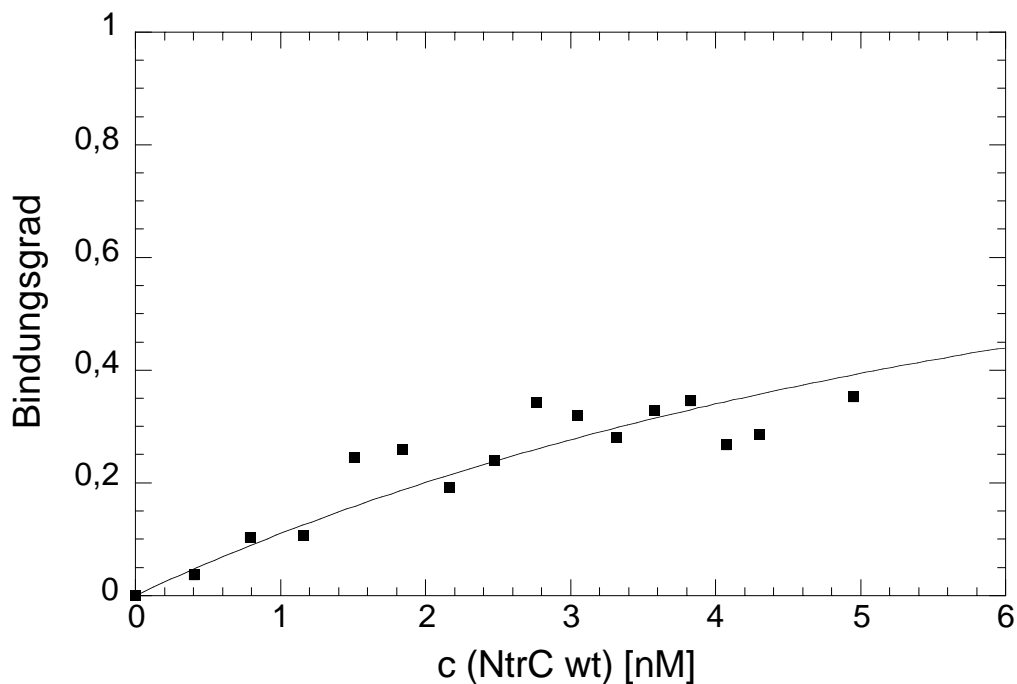


Abbildung 4.15: Titration von 1 nM DNA-Fragment ES/2 in TK⁶⁰⁰A-Puffer, 1 mM DTT, 0.1mg/ml BSA, 0.1% NP40 mit Wildtyp NtrC. Aus der Anpassung an die theoretische Bindungskurve ergibt sich K_{diss} zu (7.3 ± 2.5) nM

4.5 Ionenpaarbildung bei der NtrC-DNA-Bindung

Die Analyse der Abhängigkeit der DNA-Protein-Bindungskonstanten von der Konzentration monovalenter Ionen in der Lösung liefert die Zahl der Ionenpaare, die bei der Bildung des DNA-Protein-Komplexes ausgebildet werden (siehe Kap. 2.4.3). Der doppeltlogarithmische Auftrag der Bindungskonstanten gegen die Ionenkonzentration sollte eine Gerade ergeben. In Tabelle 5.1 (Kapitel 5.2) sind alle in dieser Arbeit gemessenen Bindungsdissoziationskonstanten K_{diss} für das Wildtyp-Protein wiedergegeben. In Abbildung (4.16) findet sich die graphische Auftragung dieser Meßwerte. Dabei berechnet sich die aufgetragene Bindungskonstante K gemäß

$$K = \frac{1}{K_{\text{diss}}}. \quad (4.3)$$

Die Werte liegen sehr gut auf einer Geraden, die Steigung beträgt 1.62. Gemäß

$$\frac{-\partial \log K}{\partial \log [M^+]} = m' \psi \quad (2.34)$$

erhält man mit dem bekannten Wert für $\psi=0.88$ für die Zahl der gebildeten Ionenpaare $m'=1.84$. Es werden also zwei Ionenpaare bei der DNA-Protein-Bindung für ein Dimer ausgebildet, je eines pro NtrC-Monomer.

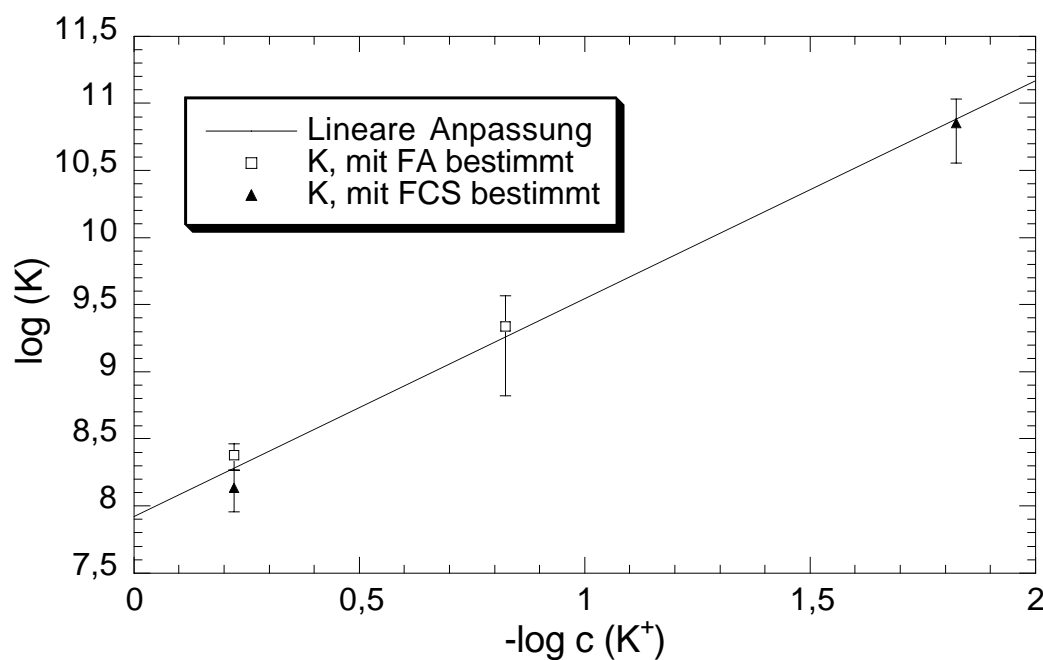


Abbildung 4.16: Doppelt logarithmischer Auftrag der Bindungskonstanten K gegen die Konzentration an Kaliumionen K^+ .

5 Diskussion

Mit der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Bindung des NtrC-Proteins an seine Enhancer-Bindungsstelle an der DNA mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden untersucht. Alle bisher in der Literatur beschriebenen Untersuchungen dieser Protein-DNA-Wechselwirkung beruhen auf Methoden (Gelretardations-Analyse, Nitrozellulose-Filter-Bindung, Rasterkraftmikroskopie), die nur mit Einschränkungen die Situation im thermodynamischen Gleichgewicht wiedergeben.

FA und FCS ermöglichen als nicht-invasive Methoden, das System im thermodynamischen Gleichgewicht zu analysieren. Qualitative und quantitative Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen zeigen, daß beide Methoden zur Untersuchung der Bindungseigenschaften des NtrC-Proteins an seine Enhancerbindungsstelle eingesetzt werden können.

Bisher sind keine FCS-Studien zur Bindung von Proteinen an DNA-Fragmente veröffentlicht worden. Die hier durchgeführten Messungen stellen auf diesem Gebiet somit eine neue Anwendung dieser Technik dar.

5.1 Aktivitätsbestimmungen der Proteine

Es wurden eine Reihe verschiedener Methoden zur Aktivitätsbestimmung der verwendeten Proteine NtrC-Wildtyp und NtrC^{S160F} eingesetzt. Im Abstand von einigen Monaten wurden für beide Proteine abnehmende Aktivitäten festgestellt. Daher wurden für Meßreihen, die in solchen Abständen vorgenommen wurden, die Aktivitäten der einzelnen Proteinfractionen neu bestimmt.

Mit den verschiedenen Methoden wurden um 10 - 20 % verschiedene Aktivitäten gemessen, die sich auf systematische Unterschiede bei der Vorbereitung der Proteinlösungen und der Titrationsdurchführungen zurückführen lassen. Die Übereinstimmung der Aktivitäten ist damit zufriedenstellend. Für die Analyse von Bindungskurven und anderer aktivitätsabhängiger Messungen wurden daher stets die Aktivitäten benutzt, die mit dem selben methodischen Ansatz bestimmt worden waren. Damit sollten systematische Fehler dieser Methoden in den Aktivitäten berücksichtigt sein und die angenommenen Aktivitäten gut die realen Aktivitäten der Proteine unter den jeweiligen Versuchsbedingungen wiedergeben.

5.2 Bindung des NtrC-Dimers an eine einzelne DNA-Bindungsstelle

Für Wildtyp NtrC ergab sich aus den durchgeführten Experimenten, daß genau ein Dimer an die einzelne Erkennungssequenz bindet. Die Stärke der Bindung wurde für drei verschiedene Ionenstärken quantifiziert. Die Bindungsdissoziationskonstanten bei den verschiedenen Salzkonzentrationen sind in Tabelle 5.1 zusammengefaßt. Dabei erfolgte die Bestimmung der Daten teilweise mit Hilfe der FA, teilweise mit Hilfe der FCS.

Die Bindungsdissoziationskonstanten bei $[K^+] = 600 \text{ mM}$ wurden mit beiden Methoden bestimmt. Innerhalb der Fehlergrenzen lassen sich die Werte gerade in Einklang bringen. Eine Ursache für die Abweichung könnte sein, daß bei der FCS bei niedrigeren Konzentrationen in Gefäßen aus Glas und Plastik gemessen wurde. Eine dabei systematisch aufgetretene DNA-Absorption an den Gefäßwänden würde eine niedrigere reale DNA-Konzentration in der Lösung ergeben. Dies könnte eine stärkere Bindung des Proteins vortäuschen. Insgesamt ist die Übereinstimmung der Bindungsdissoziationskonstanten jedoch zufriedenstellend.

Für eine DNA-Sequenz, die bis auf eine Base mit der hier untersuchten übereinstimmt, wurden bei 50 mM Kaliumchlorid und 5 mM Magnesiumchlorid 0.2 nM für K_{diss} des Wildtyp NtrC ermittelt (Weiss et al., 1992). Dies stimmt in der Größenordnung mit dem hier gemessenen Wert bei 150 mM Kaliumacetat überein.

c (K ⁺) [M]	K _{diss} [nM]	
	FA	FCS
0.015		0.014 ± 0.07
0.150	0.46 ± 0.32	
0.600	4.2 ± 0.9	7.3 ± 2.5

Tabelle 5.1: Bindungsdissoziationskonstanten für Wildtyp-NtrC bei verschiedenen Konzentrationen von Kaliumionen. Die Ergebnisse aus der FA und der FCS sind in getrennten Spalten wiedergegeben.

Die Bindungsdissoziationskonstanten K_{diss} wurden dabei aus zwei verschiedenen Typen von Bindungskurven bestimmt. Bei den stöchiometrischen Titrationskurven war die Genauigkeit der Messung von K_{diss} nicht so hoch wie bei den Messungen bei 600 mM. Die Ursache dafür liegt darin, daß die Information über die Bindungskonstante sich nur aus der kleinen Krümmung in der Umgebung des Äquivalenzpunktes ergibt. Für verschieden große K_{diss} unterscheiden sich diese Kurven nur geringfügig. Das kann man an Abbildung 2.7 erkennen, wo die Bindungskurven für DNA-Konzentrationen, die um jeweils eine Zehnerpotenz verschieden sind, für eine bestimmte Bindungskonstante aufgetragen wurden. Ein analoger Verlauf dieser Kurven ergibt sich für die hier bestehende Situation verschiedener Bindungskonstanten bei konstanter DNA-Konzentration. Im Bereich der stöchiometrischen Bindung liegen die Kurven

für Vielfache der Bindungskonstanten dicht beisammen. Die Verläufe der Kurven unterscheiden sich im mittleren Bereich (Bindungsdissoziationskonstante und DNA-Konzentration von gleicher Größenordnung) am stärksten und werden dann wieder ähnlicher im Bereich der schwachen Bindung. Daher ergeben die Meßfehler der Einzelmeßpunkte im Bereich der stöchiometrischen Bindungskurven wesentlich größere Abweichungen bei den Bindungskonstanten als im Bereich der mäßigen Bindung.

Für die Titrations der Mutante lassen sich die stöchiometrischen Kurven nicht nach dieser Methode auswerten, da bei ihnen ja die Bindung von weiteren Proteinen beobachtet wird. Der Beginn dieser weiteren Bindung liegt genau im interessanten Bereich für die Bindungskonstante kurz vor Erreichen des Endpunktes. Man sieht dies am steileren Verlauf der Meßkurve kurz vor dem Äquivalenzpunkt in Abbildung 4.5 verglichen mit Abbildung 4.4.

Die Bestimmung der Bindungsdissoziationskonstanten der Mutante NtrC^{S160F} gelang jedoch bei 600 mM [K⁺], wo nur noch ein Teil des zugegeben Proteins gebunden wurde und bis zum Endpunkt nur etwa 80 % der DNA mit einem Dimer besetzt waren. Bei der Analyse dieser Titration wurde daher die Bindung weiterer Proteine vernachlässigt. Damit ergab sich:

$$K_{\text{diss}} = (5.2 \pm 0.5) \text{ nM} \quad \text{für das NtrC}^{\text{S160F}}$$

$$K_{\text{diss}} = (4.2 \pm 0.9) \text{ nM} \quad \text{für das NtrC-Wildtyp-Protein}$$

Der geringfügig größer gefundene Wert für NtrC^{S160F} könnte auf der vereinfachenden Annahme beruhen, daß keine weitere Proteinbindung unter den Reaktionsbedingungen stattfand. Innerhalb des Meßfehlers sind die Werte aber praktisch identisch.

Die intrinsische DNA-Protein-Wechselwirkung ist also für die Mutante und das Wildtyp-Protein gleich stark. Das Ergebnis steht in Einklang mit anderen Resultaten (Porter et al., 1993). Aus den Ergebnissen von Gelretardationsexperimenten folgerten die Autoren, daß das phosphorylierte Wildtyp-NtrC-Protein, das noch größere Transkriptionsaktivierung aufweist als NtrC^{S160F}, an die DNA mit derselben Bindungskonstante wie das unphosphorylierte Wildtyp-Protein bindet.

Zusammen mit den anderen in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen ergibt sich daraus die wichtige Schlußfolgerung, daß die Transkriptionsaktivierung der Mutante NtrC^{S160F} nicht auf einer verstärkten Bindung des Proteins an die DNA beruht.

Während die intrinsische DNA-Protein-Wechselwirkung von NtrC und NtrC^{S160F} demnach identisch ist, deuten die Titrations der beiden Spezies bei niedrigem Salz auf wesentliche Unterschiede für die Protein-Protein-Wechselwirkungen hin. Man findet für beide stöchiometrische Bindung eines Dimers an das DNA-Fragment ES/2 mit einer Protein-Dimer-Bindungsstelle. Beim Wildtyp-NtrC bleibt aber dann bei weiterer Proteinzugabe der Anisotropiewert der Lösung konstant, der Komplex bleibt also unverändert. Im Gegensatz dazu

steigt die Anisotropie der Lösung mit NtrC^{S160F} und dem DNA-Fragment ES/2 auch nach der Zugabe äquimolarer Proteinmengen noch langsam an. Dieser weitere Anstieg läßt sich durch die weitere Vergrößerung des DNA-Protein-Komplexes durch die Bindung weiterer Protein-Dimere erklären. Da das DNA-Fragment mit einem Protein abgesättigt und bedeckt ist, sollte eine Bindung weiterer Proteine durch Protein-Protein-Wechselwirkungen zustande kommen.

Der Verlauf der Titrationskurve zeigt, daß die Bindung weiterer Protein-Dimere erst nach Abschluß der quantitativen Bindung eines Proteins an die DNA erfolgt, diese Bindung ist also wesentlich schwächer als die DNA-Protein-Wechselwirkung.

Aus den inzwischen hergeleiteten Eigenschaften der beiden Proteine können wir eine Abschätzung vornehmen, ob eine quantitative Bindung weiterer NtrC-Dimere unter den hier vorliegenden Reaktionsbedingungen möglich ist. Nimmt man an, daß beide Proteine auch bei veränderter Salzkonzentration gleich an die DNA binden, ergibt sich die Bindungskonstante des NtrC^{S160F}-Proteins bei 150 mM [K⁺] zu 0.4 nM. Die Bindungsdissoziationskonstante für die Bindung eines weiteren Proteins sollte etwa um den Faktor 100 höher liegen, damit die Bindung erst nach der quantitativen Bindung des ersten Proteins in Erscheinung tritt. Damit kann sie minimal etwa 50 nM betragen. Die Bindungsdissoziationskonstante für die Bindung eines zweiten Proteins liegt also im Bereich der vorliegenden DNA-Konzentration und die Bindung zugegebenen Proteins erfolgt nicht stöchiometrisch. Eine Bestimmung der Anzahl der insgesamt gebundener Proteine durch stöchiometrische Titration kann daher nur unter anderen Reaktionsbedingungen als den hier gewählten erfolgen.

Aus der Abhängigkeit der Bindungsdissoziationskonstante von der Ionenstärke läßt sich für DNA-Protein-Wechselwirkungen die Zahl der beteiligten Ionenpaare bestimmen. Der Auftrag der Ionenstärke gegen die Bindungskonstante im doppelt logarithmischen Plot ergab für die gemessenen Werte eine Gerade. Unter Annahme des Modells von Record (Record et al., 1976) wurde aus deren Steigung die Zahl der bei der Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes an der DNA verdrängten Kationen zu 2 bestimmt.

Die Abhängigkeit der Bindungsstärke von der Salzkonzentration ist für das NtrC-Protein relativ gering. Für die unspezifische Bindung des Lac-Repressor-Proteins an DNA wurde eine Verdrängung von 12 ± 2 monovalenten Ionen, für seine spezifische Bindung eine Verdrängung von 6 ± 2 Ionen gefunden (deHaseth et al., 1977; Mossing & Record, 1985; Record & Spolar, 1991). Die geringe ionische Wechselwirkung mit dem Phosphat-Rückgrat der DNA steht in Einklang mit der sehr hohen spezifischen Bindung des NtrC-Proteins an die hier untersuchte DNA-Bindungssequenz.

Jedes Monomer im NtrC-Dimer sollte nach den hier erhaltenen Daten ein Ionenpaar mit der DNA ausbilden. Röntgenstrukturdaten der DNA-bindenden C-terminalen Domäne des NtrC-Proteins wurden bisher nicht erhalten. Die Domäne ist aber homolog zum FIS-Protein, dessen Struktur vor kurzem durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurde (Kostrewa et al., 1991;

Kostrewa et al., 1992; Yuan et al., 1991). Die DNA-bindende Sequenz wurde als eine Helix-Schleife-Helix-Struktur erkannt (siehe Abbildung 2.1). Eine Röntgenstrukturanalyse mit gebundener DNA wurde bisher nicht durchgeführt, durch molekulares Modellieren wurde aber ein Vorschlag für die räumliche Anordnung des DNA-Protein-Komplexes gemacht (Yuan et al., 1991). Danach befindet sich die D-Helix in der großen Furche der DNA, sie besitzt fünf positiv geladene Aminosäurereste Arg-85, Thr-87, Arg-89, Lys-90 und Lys-91. Einer dieser Reste könnte demnach derjenige sein, der eine Ionenpaarbindung mit dem Phosphatrückgrat der DNA eingeht und dabei ein an die DNA thermodynamisch gebundenes Gegenion verdrängt.

5.3 Bindung des NtrC-Proteins an die Enhancer-DNA-Sequenz mit zwei Bindungsstellen

Die Anzahl der an die Enhancer-Bindungsstelle gebundenen Proteine scheint eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsaktivierung durch das NtrC-Protein zu spielen. Die höhere Kooperativität transkriptionsaktivierender NtrC-Spezies wurde bereits gezeigt (Details siehe weiter unten).

Die mit FA beobachtete Titrationskurve für NtrC-Wildtyps wies einen komplexen Verlauf auf. Extrapoliert man einen "Äquivalenzpunkt" aus linearer Anfangssteigung und Endwert der Titrationskurve erhält man ihn bei ca. 1.20-1.36 Äquivalenten NtrC-Wildtyp.

Für die Bindung von zwei Dimeren spricht, daß die Stöchiometrie an der untersuchten Sequenz bereits zu zwei bestimmt wurde und daß der Endwert der Anisotropie dem Anisotropiewert der analogen Titration mit NtrC^{S160F} nach der Zugabe von zwei Äquivalenten Dimer entspricht.

Wenn man annimmt, daß die Kooperativität der Bindung zwischen zwei Dimeren Wildtyp-NtrC recht gering ist und daß die Anisotropie der DNA-Spezies, die nur ein Proteindimer gebunden hat, in die Nähe der Anisotropie der DNA-Spezies mit zwei Dimeren liegt, kann man die gefundene Titrationskurve erklären.

Das intermediäre Auftreten von DNA-Komplexen mit einem gebundenen Protein wurde für das Wildtyp-NtrC-Protein nachgewiesen (Porter et al., 1993). Der Kooperativitätsfaktor f_{koop} wurde dort für das Wildtyp-NtrC-Protein aus Gelretardationsexperimenten zu 20 ± 6 bestimmt. Er ist definiert als

$$f_{koop} = \frac{K_{diss,1}}{K_{diss,2}} \quad (5.1)$$

mit $K_{diss,1}$ und $K_{diss,2}$ als der mikroskopischen Bindungsdissoziationskonstante für die Bindung des ersten bzw. zweiten Proteins. Da aus den hier vorgenommenen Messungen dieser Kooperativitätsfaktor nicht hervorging, ist ein quantitativer Vergleich mit diesen Literaturdaten nicht möglich. Der Vergleich wäre auch nur eingeschränkt durchführbar, weil dort andere Ionenstärken und eine höhere Temperatur vorgelegen haben (siehe dazu auch die Besprechung der Kooperativität von NtrC^{S160F}).

Aus der Theorie der Anisotropie erscheint es durchaus wahrscheinlich, daß die Spezies mit einem Dimer einen größeren Anisotropieanstieg aufweist als dann der Übergang zur Endspezies. Die Massenzunahme ist bei der Bindung des zweiten Dimeres wesentlich geringer. Bei der Bindung des ersten Dimeres kommt man von 40 kD (DNA) zu 150 kD, ein weiteres Protein ergibt dann eine Gesamtmasse von 260 kD, also nur noch weniger als eine Verdopplung der Masse im Gegensatz zu einer vorherigen Verdreifachung. Der Wert der Anisotropie ändert sich aber in erster Näherung mit dem Volumen, also proportional zur Masse. Unter den genannten Voraussetzungen kann man also den beobachteten Verlauf der Titrationskurve wie folgt deuten: da die Kooperativität gering ist, bildet sich bei der Zugabe von etwas Protein zunächst bevorzugt der Komplex, der nur ein Protein pro DNA aufweist. Der relativ große Anisotropieunterschied zwischen der freien DNA und der Spezies mit einer Bindungsstelle führt zu einem relativ steilen Anstieg zu Beginn der Titration. Bei einer Zugabe von 2 Äquivalenten Protein sollte dann die intermediäre Spezies wieder verschwunden sein und die Anisotropie erreicht den Wert für den ternären Komplex aus DNA und zwei Proteinmolekülen. Im Einklang mit dieser Interpretation steht auch, daß die Anpassung von Geraden an die anfängliche Steigung schlechter ist als die bei den stöchiometrischen Titrationsen mit einer Bindungsstelle (etwa 20% Fehler für den Äquivalenzpunkt verglichen mit 10% Fehler, jeweils auf die Auswertung einer einzelnen Messung bezogen). Denn diesen Anstieg enthält ja auch die langsame Bildung der Spezies mit zwei Bindungen. Weitere Untersuchungen könnten die vorgenommene Interpretation absichern. So könnte man ein Oligonukleotid mit gleicher Länge aber nur einer NtrC-Bindungsstelle synthetisieren und durch Titrationsen die Anisotropie der Spezies mit nur einem gebundenen Protein bestimmen.

Für die Mutante NtrCS^{160F} findet man einen ähnlichen Verlauf der Kurve wie bei der Bindung an eine Bindungsstelle. Man kann die Kurve in zwei Bereiche unterteilen, von denen im ersten die quantitative Bindung zweier Dimere angenommen wird und im zweiten eine Bindungskurve für die Bindung weiterer Proteine. Damit erhält man den Äquivalenzpunkt für den ersten Bereich nach einer Zugabe von 2 Äquivalenten Protein, in Übereinstimmung mit den Erwartungen. Diese Analyse ist nur bei hoher Kooperativität möglich. Von Porter (Porter et al., 1993) wurde die Kooperativitätskonstante für die NtrCS^{160F}-Mutante zu 52 ± 20 bestimmt. Dies würde bedeuten, daß die Kooperativität nur 2.6 ± 1.3 mal höher ist als die von Wildtyp-NtrC. Es läßt sich aber abschätzen, daß der bei uns gefundene Unterschied der Kooperativität deutlich größer sein muß, sonst könnten die beiden Kurven sich nicht so stark unterscheiden. Dies könnte an den etwas unterschiedlichen Meßbedingungen (Ionenstärke, Temperatur) liegen, oder auch ein systematischer Unterschied zwischen den beiden Methoden sein.

Wie auch bei der Titration mit einem Dimer lassen sich keine Rückschlüsse auf die Zahl der im zweiten Bereich der Titrationskurve gebundenen Proteine ziehen. Es wird kein Plateau für die Anisotropiewerte erreicht bis zu einer Zugabe von 10 Äquivalenten Proteindimer. Aufgrund der

Rasterkraftmikroskopuntersuchungen der Komplexe aus NtrC^{S160F}, RNA-Polymerase- σ^{54} und einer die Enhancerbindungsstelle enthaltenden DNA würde man Komplexe von 4 oder maximal 8 Dimeren NtrC an der Enhancerbindungsstelle erwarten (Rippe et al., 1997). Für diese beiden Fälle soll der Kurvenverlauf noch etwas weiter analysiert werden:

Unter der Annahme, daß vier Dimere gebunden werden, zeigt die gemessene Titrationskurve sicher keine stöchiometrische Bindung, denn sie steigt bis zur Zugabe von acht Äquivalenten noch deutlich an. Sollten acht Dimere gebunden werden, könnte hier noch eine stöchiometrische Bindung von zuerst zwei und dann sechs Dimeren vorliegen. Die Anisotropie des Gesamtkomplexes wäre dann allerdings nur 0.218 ± 0.001 . Dies ergibt sich aus der Extrapolation des anfänglichen linearen Anstieges im zweiten Teil der Bindungskurve zum Äquivalenzpunkt bei 8 : 1.

Aus dem Verlauf der Titrationskurven für die Enhancerbindungsstelle und das NtrC^{S160F} kann geschlossen werden, daß insgesamt mehr als zwei Dimere Protein gebunden werden und daß diese Oligomerisierung in zwei Schritten abläuft. Die Bindung der ersten zwei Dimere ist wesentlich stärker als die Bindung weiterer Dimere.

Dies legt folgenden Mechanismus für den Aktivierungsprozess der Transkription nahe: Durch die Phosphorylierung werden die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den NtrC-Dimeren verstärkt. Dadurch bilden sich außer den zwei-Dimer-Komplexen noch größere Multimere an der Enhancerbindungsstelle und nur diese können die Aktivierung der RNA-Polymerase ausführen. Um die Stöchiometrie der Oligomerisierung aufzuklären, sollten weitere Titrations durchgeführt werden. Die Verwendung höherer DNA-Konzentrationen und/oder niedrigerer Salzkonzentrationen könnten dabei zur Schaffung von Reaktionsbedingungen eingesetzt werden, die quantitative Bindung auch für die erst nach Absättigung der DNA gebundenen Proteine ergibt.

5.4 Bindung von RNA-Polymerase

Die Bindung des Holoenzym RNA-Polymerase- σ^{54} an seine Promotor-Bindungssequenz wurde auf die methodisch gleiche Weise mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropiemessungen untersucht wie die Bindung des NtrC-Proteins an die Enhancer-Bindungssequenz. Eine Quantifizierung der Aktivität des Enzyms mit Hilfe der FA wurde nicht vorgenommen, da dazu die vorhandenen Mengen nicht ausreichten. Stattdessen wurde für die Konzentration näherungsweise der Wert aus der Absorption der Proteinlösung bei 280 nm verwendet. Dieser Wert entspricht der höchstmögliche Aktivität des Proteins. Daher wurden bei der Anpassung der Meßdaten verschiedene Aktivitäten an Protein angenommen, sinnvolle Anpassungen erhielt man nur für Aktivitäten zwischen 50 und 100 %. Eine weitere Unsicherheit für die Interpretation der Daten ergab sich aus dem Kurvenverlauf, der über einige Meßpunkte hinweg stark abzuflachen schien (die Meßpunkte bildeten also ein "Plateau") und dann wieder stärker

anstieg. Dies könnte ein Indiz sein, daß die Meßkurve die Bindung erst eines und dann eventuell eines weiteren RNA-Polymerase-Moleküles zeigte. Für die verschiedenen diskutierten Möglichkeiten wurden Anpassungen an die Meßdaten durchgeführt. Insgesamt ergab sich aus allen Anpassungen eine Bindungsdissoziationskonstante im Bereich von (5 - 45) nM. Dieser Wert liegt in der selben Größenordnung wie eine Untersuchung dieser Bindung mit Hilfe von Footprinting-Experimenten (Cannon et al., 1993). Dort wurden 15 nM für die Bindungsdissoziationskonstante abgeschätzt.

Damit wurde an einem weiteren DNA-Protein-System die Anwendbarkeit der FA-Messungen zur Bestimmung von Bindungskonstanten demonstriert.

Mit FA-Messungen wurde auch die Bindung der RNA-Polymerase an einen Komplex aus der Enhancer-Bindungssequenz ES und zwei Dimeren NtrC^{S160F} beobachtet. Der Anstieg der Anisotropie durch die Zugabe der Polymerase wurde unter der Annahme der Bildung eines 1:1 Komplexes analysiert. Neben der nicht genau bekannten Konzentration der RNA-Polymerase war eine weitere Unsicherheit bei der Anpassung der Meßdaten, daß sich nie alle Punkte durch eine Anpassung gut beschreiben ließen. Dies zeigten auch die berechneten Fehler für die Anpassungen, die immer über 100 % lagen. Aus der geringen Zahl der Meßpunkte konnte nicht darauf geschlossen werden, welche Meßwerte eventuell Ausreißer sein könnten. Das Weglassen einzelner etwas "exotisch" erscheinenderer Punkte bei der Anpassung ergab eine weitere Unsicherheit für die Bindungsstärke. Unter Einbeziehung dieser Fehlermöglichkeiten ergab sich insgesamt K_{diss} zu ca. (30 - 90) nM für die Bindung von RNA-Polymerase- σ^{54} an einen Komplex aus DNA mit zwei gebundenen NtrC^{S160F}-Dimeren.

Diese Bindung wurde bisher in der Literatur nur qualitativ durch Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie beschrieben. Mit diesen Methoden ist auch keine thermodynamische Analyse der Bindung möglich. Die Protein-Protein-Wechselwirkung von RNA-Polymerase- σ^{54} und NtrC-Multimeren ist am Übergang vom geschlossenen in den offenen Promotorkomplex beteiligt. Daher könnte eine Quantifizierung dieser Wechselwirkung mit Hilfe der Anisotropie das Verständnis dieses Schrittes verbessern.

Mit den hier vorgenommenen Messungen wurde die Bindungsdissoziationskonstante dieser Wechselwirkung erstmals im thermodynamischen Gleichgewicht bestimmt. Wenn die Bedingungen für die quantitative Bildung verschieden großer Enhancer-Komplexe von NtrC-Dimeren bekannt sind, könnte man die Bindungsstärke dieser verschiedenen Spezies vergleichen. Interessant wäre auch ein Vergleich der verschiedenen NtrC-Spezies bzw. Mutanten.

5.5 Vergleich der FA- und FCS-Messungen

FA- und FCS-Messungen haben sich als geeignet erwiesen, um das von uns gewählte Meßsystem aus einem kurzen markierten Oligonukleotidfragment und einem daran bindenden Protein zu bestimmen. Die Genauigkeit der Bestimmung des Bindungsgrades war bei der Anisotropie etwa um den Faktor 2 größer. Dabei dürfte der geringe Unterschied der Diffusionszeiten der untersuchten Spezies eine Rolle gespielt haben. Die quantitative Unterscheidung zweier Spezies mit solch geringem Unterschied in der Diffusionszeit war nur durch separate Bestimmung der Einzeldiffusionszeiten der in der Lösung vorliegenden Spezies möglich. Für eine Analyse der Anisotropieverläufe ist ebenfalls die Kenntnis der Anisotropie beider Komponenten nötig. Daher war der benötigte Aufwand zur Bestimmung von Bindungsgraden bei beiden Methoden vergleichbar. Die Anfangs- und Endwerte der Titrations mußten mit Hilfe stöchiometrischer Titrations separat bestimmt werden.

Bei der Anisotropie ist eine Vorhersage der Anisotropien der verschiedenen Komponenten schwierig. So wurde die Anisotropie des kurzen DNA-Fragmentes zu 0.180 ± 0.002 gefunden. Sie ist größer als die des langen DNA-Fragmentes, die zu 0.1700 ± 0.0012 bestimmt wurde. Dieser Befund ist mit bisherigen Erkenntnissen über die Eigenschaften fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide in Einklang zu bringen. Der C₆-Linker erlaubt dem Rhodamin Kontakte mit den 5 - 6 benachbarten DNA-Basenpaaren. Eine verschieden starke Bindung des Farbstoffes an diese Basensequenzen und/oder eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer durch die Wechselwirkung mit der DNA können die oben gefundenen Werte plausibel machen.

Für unsere Untersuchungen von Bindungsgleichgewichten des NtrC-Proteins bedeutet dies keine Einschränkung der Interpretation, da für die Einzelspezies die Anisotropien experimentell ermittelt werden konnten. Bei Messungen, bei denen dies nicht möglich war (RNA-Polymerase, Analyse der stöchiometrischen Titration des DNA-Fragmentes ES mit NtrC-Wildtyp) war die Interpretation der Daten aber mit wesentlich mehr Unsicherheit behaftet.

In der FCS spielen diese Farbstoffeigenschaften keine Rolle, da die Messung auf der Zählung von Teilchen beruht. Eine grobe Abschätzung der Diffusionszeiten verschiedener Spezies ist hier leichter möglich und wurde auch vorgenommen.

Die Untersuchung der Bindung weiterer Dimere nach der Absättigung der DNA mit Hilfe der FCS erscheint wenig sinnvoll. Für die dann zu unterscheidenden Teilchen würden sich noch kleinere Diffusionszeitunterschiede ergeben, als sie bei der einfachen Bindung vorliegen und die Meßgenauigkeit dürfte daher eher geringer sein als bei den bisherigen Messungen. Außerdem müssen bei den komplizierteren Bindungsgleichgewichten mehr als zwei Komponenten zur Anpassung berücksichtigt werden.

5.6 Ausblick

Die Anisotropiemessungen zur Untersuchungen der Stöchiometrie des NtrC-Multimers an der Enhancer-Bindungsstelle haben gezeigt, daß von der Mutante NtrC^{S160F} Komplexe gebildet werden, die mehr als zwei Dimere enthalten. Die Größe des dabei aufgetretenen Effektes läßt erwarten, daß weitere Messungen mit etwas variierten Reaktionsbedingungen die Stöchiometrie aufklären können.

Aus ersten Untersuchungen mit RNA-Polymerase- σ^{54} -Holoenzym ergab sich, daß die Bindung der RNA-Polymerase an den NtrC-Multimerkomplex der Enhancerbindungsstelle mit Hilfe der Anisotropie verfolgt werden kann. Mit weiteren Messungen sollten sich erstmals quantitative Untersuchungen dieser Protein-Protein-Wechselwirkung durchführen lassen, von der vermutet wird, daß ihr für die Bildung des offenen Komplexes an der Promotorbindungsstelle zentrale Bedeutung zukommt.

Literatur

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1989). *Molecular Biology of the cell*. 2nd Edition edit, Garland Publishing, Inc., New York & London.

Aragón, S. R. & Pecora, R. (1976). Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics. *J. of Chem. Phys.* **64**, 1791-1803.

Bailey, M., Hagmar, P., Millar, D. P., Davidson, B. E., Tong, G., Haralambidis, J. & Sawyer, W. H. (1995). Interaction between the Escherichia coli Regulatory protein TyrR and DNA: a fluorescence footprinting study. *Biochemistry* **34**, 15802-15812.

Broersma, S. (1960). Viscous Force Constant for a Closed Cylinder. *J. Chem. Phys.* **32**, 1626.

Cannon, W., Claverie-Martin, F., Austin, S. & Buck, M. (1993). Core RNA polymerase assists binding of the transcription factor σ^{54} to promoter DNA. *Molec. Microbiol.* **8**, 287-298.

Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980). *Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*, 2. 3 vols, Freeman, New York.

Carey, J. (1991). Gel Retardation. *Meth. Enzymol.* **208**, 103-115.

Chen, P. & Reitzer, L. J. (1995). Active contribution of two domains to cooperative DNA binding of the enhancer-binding protein nitrogen regulator I (NtrC) of *Escherichia coli*: Stimulation by phosphorylation and the binding of ATP. *J. Bacteriol.* **177**, 2490-2496.

de la Torre, G. & Bloomfield, V. A. (1981). Hydrodynamic Properties of complex, rigid, biological macromolecules: theory and applications. *Quart. Rev. Biophys.* **14**, 81-139.

deHaseth, P. L., Lohman, T. M. & Record, M. T., Jr. (1977). Nonspecific interaction of lac repressor with DNA: an association reaction driven by counterion release. *Biochemistry* **16**, 4783-90.

Ehrenberg, M. & Rigler, R. (1974). Rotational Brownian Motion and fluorescence intensity fluctuation. *Chem. Phys.* **4**, 390-401.

Eigen, M. & Rigler, R. (1994). Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 5740-5747.

Elson, E. L. & Magde, D. (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* **13**, 1-27.

Flashner, Y., Weiss, D. S., Keener, J. & Kustu, S. (1995). Constitutive forms of the enhancer-binding protein NtrC: evidence that essential oligomerization determinants lie in the central activation domain. *J. Mol. Biol.* **249**, 700-713.

-
- Hagmar, P., Bailey, M., Tong, G., Haralambidis, J., Sawyer, W. H. & Davidson, B. E. (1995). Synthesis and characterisation of fluorescent oligonucleotides. Effect of internal labelling on protein recognition. *Biochim-Biophys-Acta* **1244**, 259-268.
- Heyduk, T. & Lee, J. C. (1990). Application of fluorescence energy transfer and polarization to monitor Escherichia coli cAMP receptor protein and lac promoter interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1744-1748.
- Heyduk, T., Lee, J. C., Ebright, Y. W., Blatter, E. E., Zhou, Y. & Ebright, R. H. (1993). CAP interacts with RNA polymerase in solution in the absence of promoter DNA. *Nature* **364**, 548-549.
- Klose, K. E., Weiss, D. S. & Kustu, S. (1993). Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J. Mol. Biol.* **232**, 67-78.
- Koppel, D. (1974). Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. A* **10**, 1938-1945.
- Kostrewa, D., Granzin, J., Koch, C., Choe, H. W., Raghunathan, S., Wolf, W., Labahn, J., Kahmann, R. & Saenger, W. (1991). Three-dimensional structure of the E. coli DNA-binding protein FIS. *Nature* **349**, 178-80.
- Kostrewa, D., Granzin, J., Stock, D., Choe, H. W., Labahn, J. & Saenger, W. (1992). Crystal structure of the factor for inversion stimulation FIS at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **226**, 209-226.
- Lakowicz, J. R. (1983). *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York, London.
- LeTilly, V. & Royer, C. A. (1993). Fluorescence anisotropy assays implicate protein-protein interactions in regulating trp repressor DNA binding. *Biochemistry* **32**, 7753-8.
- Magasanik, B. (1988). Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 475-479.
- Manning, G. S. (1969). Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. I. Colligative properties. *J. Chem. Phys.* **51**, 924-933.
- Mettke, I., Fiedler, U. & Weiss, V. (1995). Mechanism of activation of a response regulator: interaction of NtrC-P dimers induces ATPase activity. *J. Bacteriol.* **177**, 5056-5061.
- Morett, E. & Segovia, L. (1993). The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* **175**, 6067-6074.

-
- Mossing, M. C. & Record, T. M., Jr. (1985). Thermodynamic origins of specificity in the lac repressor-operator interaction: Adaptability in the recognition of mutant operator sites. *J. Mol. Biol.* **186**, 295-305.
- Ninfa, A. J., Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1987). Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. *Cell* **50**, 1039-1046.
- Perez-Howard, G. M., Weil, P. A. & Beechem, J. M. (1995). Yeast TATA binding protein interaction with DNA: fluorescence determination of oligomeric state, equilibrium binding, on-rate, and dissociation kinetics. *Biochemistry* **34**, 8005-8017.
- Porter, S. C., North, A. K., Wedel, A. B. & Kustu, S. (1993). Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. *Genes & Dev.* **7**, 2258-2273.
- Puglisi, J. D. & Tinoco, J., I. (1989). Absorbance melting curves of RNA. *Meth. Enzymol.* **180**, 304-325.
- Rawitch, A. B. & Weber, G. (1972). The reversible association of Lysozyme and thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* **10**, 680-685.
- Record, M. T., Jr., Lohman, M. L. & De Haseth, P. (1976). Ion Effects on Ligand-Nucleic Acid Interactions. *J. Mol. Biol.* **107**, 145-158.
- Record, M. T., Jr. & Spolar, R. S. (1991). Some thermodynamic principles of nonspecific and site-specific protein-DNA interactions. *CRC Critical Reviews In Biochemistry and Molecular Biology*.
- Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1986). Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* **45**, 785-792.
- Rigler, R. & Mets. (1992). Diffusion of single molecules through a Gaussian laser beam. *SPIE. Laser Spectroscopy of Biomolecules* **1921**, 239-248.
- Rigler, R., Mets, Widengren, J. & Kask, P. (1993). Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.* **22**, 169-175.
- Rigler, R. & Widengren, J. (1990). Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy. *BioScience* **3**, 180-183.
- Rigler, R., Widengren, J. & Mets. (1992). *Interaction and kinetics of single molecules as observed by fluorescence correlation spectroscopy*. Fluorescence Spectroscopy (Wolfbeis, O. S., Ed.), Springer, Berlin.

-
- Rippe, K., Guthold, M., von Hippel, P. H. & Bustamante, C. (1997). Transcriptional activation via DNA-looping: Visualization of intermediates in the activation pathway of E. coli RNA polymerase- σ^{54} holoenzyme by scanning force microscopy. *J. Mol. Biol.* **270**, 125-138.
- Völcker, M., Schnetz, A. & Grub, R. (1996). Mikroskopgestützte Fluoreszenz-Photonen-Korrelation. *Technisches Messen* **63**, 128-135.
- Volkman, B. F., Nohaile, M. J., Amy, N. K., Kustu, S. & Wemmer, D. E. (1995). Three-dimensional solution structure of the N-terminal receiver domain of NTRC. *Biochemistry* **34**, 1413-24.
- Weber, G. (1952). Polarization of the fluorescence of macromolecules II. Fluorescence conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin. *Biochem. J.* **51**, 155-167.
- Weiss, V., Claverie-Martin, F. & Magasanik, B. (1992). Phosphorylation of nitrogen regulator I of Escherichia coli induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5088-5092.
- Widengren, J., Mets & Rigler, R. (1995). Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study. *J. Phys. Chem.* **99**, 13368-13379.
- Yuan, H. S., Finkel, S. E., Feng, J.-A., Kaczor-Grzeskowiak, M., Johnson, R. C. & Dickerson, R. E. (1991). The molecular structure of wild-type and a mutant Fis protein: relationship between mutational changes and recombinational enhancer function on DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9558-9562.