

Diss ETH 6251

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF FORM V DNA, THE
DUPLEX DNA RESULTING FROM ASSOCIATION OF COMPLEMENTARY,
CIRCULAR SINGLE-STRANDED DNA

A B H A N D L U N G

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

ULRICH HERMANN STETTLER
Dipl.Naturwissenschaftler ETHZ
geboren am 13.November 1948
von Langnau i./E.

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Th. Koller, Referent

Prof. Dr. Ch. Weissmann, Korreferent

1978

KURZFASSUNG

Komplementäre Einzelstränge des hybriden Plasmids P β G oder der DNS des Bakteriophagen PM 2 assoziieren zu einem zwei-strängigen Komplex unter Bedingungen, die eine Hybridisierung begünstigen. Diese Assoziation konnte mit der einzelsträngigen DNS des Bakteriophagen ϕ X 174 unter den gleichen Bedingungen nicht beobachtet werden, da die ϕ X 174 DNS nur aus Plus-Strängen besteht.

Die aus komplementären Einzelsträngen assoziierte DNS, der wir die Bezeichnung "Form V" geben, hat sehr gut definierte physikalisch-chemische Eigenschaften. In neutralen Saccharose-Gradienten sedimentiert die Form V DNS als eine scharfe Bande. Die elektrophoretische Mobilität in Agarose-Plattengelen liegt zwischen derjenigen von kovalent geschlossener (Form I DNS) und denaturierter DNS. Im Elektronenmikroskop können Form V und Form I DNS nicht von einander unterschieden werden, da beide stark gefaltet aussehen.

Die interkalierende Farbe Ethidiumbromid hat die Eigenschaft, mit steigender Konzentration die superhelikale Form I zuerst zu relaxieren und anschliessend wieder zu einer Superhelix im entgegengesetzten Sinn aufzuwinden. Auf Form V hingegen übt Ethidiumbromid keinen vergleichbaren Effekt aus.

Bei einer Wellenlänge von 260 nm hat Form V P β G DNS eine recht kleine Hypochromizität von 18 %, verglichen mit derjenigen von Form II P β G DNS, die 25 % beträgt. Das thermische Schmelzverhalten von Form V ist nicht kooperativ. Es zeigt eine stufenweise Zunahme der Absorption bei 258 nm, die sehr ähnlich der von einzelsträngiger DNS ist.

Das Zirkulardichroismus Spektrum der Form V unterscheidet sich klar von den Spektren der Form I, Form II (zirkuläre doppelsträngige DNS mit mindestens einem Strangbruch), Form III (lineare doppelsträngige DNS) und der einzelsträngigen ϕX 174 DNS, insofern als bei 293 nm eine negative Bande auftritt und die positive Hauptbande von 273 nm nach 266 nm verschoben ist.

Wir vermuten, dass die Stränge der Form V teilweise in kurzen Abschnitten in rechtshändigen Doppelhelices vom Watson-Crick-Typ angeordnet sind und durch eine gleiche Anzahl linkshändiger Windungen oder linkshändiger Supercoils kompensiert werden. Wir können aber nicht feststellen, ob die linkshändigen Windungen durch Basenstapelung und Wasserstoffbrücken stabilisiert werden - wie in den Modellen von Rodley et al. (1976) oder von Sasisekharan und Pattabiraman (1976) - oder ob die Windungen rein kompensatorisch und ohne eigene Stabilität sind.

ABSTRACT

Complementary circular single strands of hybrid plasmid P β G or bacteriophage PM 2 DNA but not of single-stranded ϕ X 174 DNA associate under hybridization conditions, giving rise to a two-stranded complex. This DNA, which we call form V, has well-defined physico-chemical properties. It sediments as a sharp peak in neutral sucrose gradients; its electrophoretic mobility in agarose gels is between that of covalently closed (form I) and denatured DNA. In the electron microscope form V appears as highly folded duplex molecules indistinguishable from form I. However, increasing concentrations of ethidium bromide which lead to relaxation and recoiling of form I DNA have no comparable effect upon form V. At 260 nm form V P β G DNA has a hypochromicity of 18 %, as compared to 25 % in the case of P β G form II DNA. The thermal melting of form V is non-cooperative with gradual increase in absorbance similar to that of single-stranded DNA. The circular dichroism spectrum of form V DNA differs from that of form I, circular nicked (form II) and single-stranded ϕ X 174 DNA in that it shows a negative band at 293 nm and a shift for the main positive band from 273 to 266 nm. We propose that the strands of form V are partly arranged in short segments of right-handed Watson-Crick type double helices which are compensated by an equal number of left-handed turns and left-handed supercoils. We cannot decide whether the left-handed turns are stabilized by base-stacking and hydrogen bonding as for example in the models described by Rodley et al. (1976) or Sasisekharan and Pattabira-

man (1976), or whether they are merely compensatory turns without inherent stability.