

**INTERAKSIE VAN GESELEKTEERDE
TRANSKRIPSIEFAKTORE MET REGULERINGSGBIEDE
VAN DIE MENSGEEN VIR PRO- α 1(I)-KOLLAGEEN**

WILLEMINA PETRONELLA VERGEER

**B.Sc., B.Sc. Honns (Mikrobiologie),
B.Sc. Honns (Biochemie), M.Sc.**

**Proefskrif voorgelê vir die graad Philosophiae Doctor in
die Departement Biochemie aan die Potchefstroomse
Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys**

Promotor: Prof. W.J. de Wet

**Potchefstroom
1994**

***"My hulp kom van die Here
wat hemel en aarde gemaak het."***

Ps. 121:2

Aan my familie

INHOUDSOPGAWE

	Bladsy
ABSTRACT	1
OPSOMMING	4
HOOFSTUK 1 : INLEIDING	7
HOOFSTUK 2 : LITERATUUROORSIG	10
2.1 Inleiding	10
2.2 Transkripsionele elemente in eukariotiese gene	10
2.2.1 <i>Cis</i> -werkende elemente	11
2.2.1.1 Promotors	11
2.2.1.2 Aktiveringsvolgorde	14
2.2.2 <i>Trans</i> -werkende element	16
2.2.2.1 Transkripsiefaktore	16
2.2.2.2 Sp1	17
2.2.2.3 Ap1	23
2.2.2.4 Ap2	26
2.2.3 Struktuur van transkripsiefaktore	29
2.3 Kollageen	32
2.3.1 Inleiding	32
2.3.2 Geenstruktuur	33
2.3.3 Regulering van die prokollageengene	34
2.3.3.1 Promotorgebied	36
2.3.3.2 Introngebied	40
2.4 SV40	46
2.5 Benaderingswyse	49

HOOFSTUK 3 : METODEDES	52
3.1 Inleiding	52
3.2 Konstruksie en isolering van plasmiede	52
3.2.1 Groot skaalse isolering van plasmied-DNA	52
3.2.2 DNA-modifiseringsreaksies	54
3.2.3 Transformerings en klonering van <i>E. coli</i> K12-MC1601	57
3.3 Voorbereiding en radioaktiewe merking van DNA-fragmente	58
3.3.1 Isolering van DNA-fragmente	58
3.3.2 Radioaktiewe merking van DNA-fragmente	59
3.3.2.1 5'-radioaktiewe merking	59
3.3.2.2 Vervangingsmerking	60
3.4 DNase I-afskermingsanalise	61
3.5 Maxam en Gilbert-volgordebepaling	62
3.6 Poli-akrielamiedgelle	64
3.7 Isolering van totale RNA en poli(A)-mRNA	66
3.8 Kwantifisering van spesifieke mRNA	67
HOOFSTUK 4 : KONSTRUKSIE VAN PLASMIEDE	70
4.1 Inleiding	70
4.2 Plasmied pSV40	72
4.3 Konstruksie van plasmiede pSS, pRS en pHR295	76
4.3.1 pHS-int-I	76
4.3.2 pSS, pRS en pHR295	77
4.4 Konstruksie van plasmied pXS	78
4.4.1 pHS-EX-I	78
4.4.2 pXS	86
4.5 Konstruksie van plasmied pCX	86

4.6	Konstruksie van plasmied pEP	92
4.7	Konstruksie van plasmied pHR3'	92
4.8	Konstruksie van pGEM-BB5	96
4.9	Karakterisering van die konstrakte	100
HOOFSTUK 5 : IDENTIFISERING VAN REGULERINGSGEBIEDE IN DIE MENS PRO- α 1(I)-KOLLAGEENGEEN		101
5.1	Inleiding	101
5.2	Die <i>Xenopus laevis</i> oösietsisteem	102
5.2.1	Konstruksie van chimeriese plasmiede	102
5.2.2	<i>Xenopus laevis</i> oösietsisteem	106
5.2.2.1	Inleiding	106
5.2.2.2	Metode	107
5.2.2.3	Eksperimentele data	108
5.3	Die transfeksiesisteem	111
5.3.1	Konstruksie van plasmiede	111
5.3.2	Transfeksie	111
5.3.3	Eksperimentele data	112
5.4	Samevatting	115
HOOFSTUK 6 : IDENTIFISERING VAN BINDINGSGEBIEDE VIR TRANSKRIPSIEFAKTORE IN DIE REGULERINGS- GEBIEDE VAN DIE MENS PRO- α 1(I)-KOLLAGEEN- GEEN		117
6.1	Inleiding	117
6.2	Standaardisering van die DNase I-afskermingstegniek	119
6.2.1	Kwaliteit van die gemerkte fragmente	119
6.2.2	DNase I-konsentrasie	121
6.3	Interaksie van die bindingsproteïene met die DNA-fragmente van die pro- α 1(I)-kollageengeengebied	127

6.3.1	Ruwe kernekstrak	127
6.3.1.1	Optimalisering van die konsentrasie van die ruwe kernekstrakte	127
6.3.1.2	DNase I-konsentrasie	130
6.3.1.3	Poli(dI.dC) konsentrasie	131
6.3.1.4	Identifisering van die proteïen afskermingsge- biede	131
6.3.2	S-300 fraksies	139
6.4	Samevatting	146
HOOFSTUK 7 : DIE INTERAKSIE VAN SP1, AP1 EN AP2 MET DIE REGULERINGSGBIEDE VAN DIE MENS PRO- α 1(I)- KOLLAGEENGEEN		148
7.1	Inleiding	148
7.2	Identifisering van die Sp1-, Ap1- en Ap2-bindingspunte in die regu- leringsgebiede	149
7.2.1	Teoreties waarskynlike bindingspunte	149
7.2.2	Werklike Sp1-, Ap1- en Ap2-bindingspunte	164
7.2.2.1	SV40-vroeë promotorgebied	164
7.2.2.2	Die kollageenfragmente	168
7.2.2.3	Samevatting	194
7.3	Bindingsaffiniteit van die Sp1, Ap1 en Ap2-proteïene vir die kolla- geen-DNA	197
7.3.1	Bindingsaffiniteite van Sp1	197
7.3.1.1	Samevatting	245
7.3.2	Bindingsaffiniteit van Ap1	252
7.3.3	Bindingsaffiniteit van Ap2	259
7.3.3.1	Samevatting	307
7.4	Proteïen-proteïeninteraksies	307
7.5	Bespreking	313

HOOFSTUK 8 :	ELEKTRONMIKROSKOPIESE ANALISE VAN DNA- PROTEÏENINTERAKSIES	317
8.1	Inleiding	317
8.2	Standaardisering van tegniek	318
8.3	Analise van kollageenfragmente	333
8.3.1	Elektronmikroskopiese analise van DNA met Sp1	333
8.3.1.1	Samevatting	362
8.3.2	Elektronmikroskopiese analise van kollageenfragmente met Ap2- proteïene	363
8.3.2.1	Samevatting	398
8.3.3	Elektronmikroskopiese analise van kollageenfragmente met Ap1	398
8.3.3.1	Samevatting	411
8.3.4	Elektronmikroskopiese analise van kollageenfragmente met Sp1 en Ap2	418
8.4	Elektronmikroskopiese analise van lang kollageenfragmente	429
8.4.1	Samevatting	449
8.5	Bespreking	449
HOOFSTUK 9 :	BESPREKING	461
9.1	Inleiding	461
9.2	Identifisering van reguleringsgebiede	461
9.3	Identifisering van die bindingsgebiede van DNA-bindingsproteïene . .	471
9.4	Identifisering van <i>trans</i> -werkende faktore	473
9.4.1	Sp1	474
9.4.2	Ap1	483
9.4.3	Ap2	485

9.5	Voorstelling van die regulering van transkripsie deur die geïdentifiseerde elemente	492
9.6	Slotsom	501
	AFKORTINGSLYS	503
	BIBLIOGRAFIE	508
	BEDANKINGS	530

LYS VAN FIGURE

Figuur 2.1	Die ekson-intronstruktuur van die mens pro- α 1(I)-geen (paneel A) en pro- α 2(I)-geen (paneel B)	35
Figuur 2.2	Volgordemotiewe in die onmiddellike stroom-opgebied en in die eerste intron van die mens pro- α 1(I)-geen.	41
Figuur 2.3	Gebiede en elemente geïdentifiseer in die mens en muis pro- α 1(I)-kollageengeen	45
Figuur 2.4	Binding van transkripsiefaktore aan die minimale SV40-aktiveringsvolgorde	48
Figuur 2.5	Voorstelling van 'n model waarvolgens die promotor en die aktiveringsvolgorde deur proteïen-proteïen interaksies in kontak met mekaar gebring word	51
Figuur 4.1	Diagrammatiese voorstelling van die verdeling in sewe fragmente van die gedeelte van die pro- α 1(I)-kollageengeen onder bestudering	71
Figuur 4.2	Skematiese voorstelling van plasmied pSV40	73
Figuur 4.3	Voorstelling van die konstruksie en die struktuur van pHS-int-I	75
Figuur 4.4	Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pH295 (A); pRS (B) en pSS (C)	81
Figuur 4.5	Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pHS-EX-I	83
Figuur 4.6	Voorstelling van die konstruksie en samestelling van plasmied pXS	85
Figuur 4.7	Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pCX	89
Figuur 4.8	Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pEP	91
Figuur 4.9	Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pHR3'	95
Figuur 4.10	Skematiese voorstelling van plasmied pGEM-11zf(+)	97
Figuur 4.11	Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pGEM-BB5	99

Figuur 5.1	Skematiese uiteensetting van die geengedeeltes van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen betrokke by die konstruksie van die verskillende chimeriese plasmiede	105
Figuur 5.2	Samestelling van die onderskeie chimeriese gene en hul RTL-waardes	109
Figuur 5.3	Dot-Blot-analise van poli(A)-mRNA van pW1000 en pW1001 getransfekteerde soogdiersellyne	113
Figuur 6.1	Ondersoek na die kwaliteit van die 5'-radioaktiefgemerkte peilers	122
Figuur 6.2	Optimalisering van die DNase I-konsentrasie	124
Figuur 6.3	Optimalisering van die ruwe kernekstrakkonsentrasie	128
Figuur 6.4	Optimalisering van die DNase I-konsentrasie in die teenwoordigheid van ruwe kernekstrak	132
Figuur 6.5	Identifisering van proteïenbindingsgebiede in SV40-DNA in die teenwoordigheid van HeLa en BJA-B ruwe kernekstrakte . . .	136
Figuur 6.6	Identifisering van proteïenbindingsgebiede van die CX DNA-fragment	138
Figuur 6.7	DNase I-afskermingsanalise van SV40-DNA in die teenwoordigheid van BJA-B S-300 piekfraksie vir Sp1	142
Figuur 6.8	DNase I-afskermingsanalise met die SV40-DNA-fragmente in die teenwoordigheid van HeLa S-300 fraksie	144
Figuur 7.1	DNA-volgorde van die reguleringsgebiede van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen wat bestudeer is	162
Figuur 7.2	DNA-volgorde van die 300 bp <u>Kpn I</u> - <u>Hind III</u> -fragment van die SV40-vroeë promotorgeen	163
Figuur 7.3	DNase I-afskermingsanalise met die SV40-vroeë promotor . .	167
Figuur 7.4	DNase I-afskermingsanalise met die <u>Eco RV</u> - <u>Pvu II</u> -kollageen-fragment	171
Figuur 7.5	DNase I-afskermingsanalise met die <u>Cla I</u> - <u>Xba I</u> -kollageen-fragment	175

Figuur 7.6	DNase I-afskermingsanalise met die <u>Xba I</u> - <u>Sac I</u> -kollageen-fragment	179
Figuur 7.7	DNase I-afskermingsanalise met die <u>Sma I</u> - <u>Sma I</u> -kollageen-fragment	183
Figuur 7.8	DNase I-afskermingsanalise met die <u>Sma I</u> - <u>Rsa I</u> -kollageen-fragment	187
Figuur 7.9	DNase I-afskermingsanalise van die <u>Rsa I</u> - <u>Hind III</u> -kollageenfragment	191
Figuur 7.10	DNase I-afskermingsanalise met die <u>Hind III</u> - <u>Rsa I</u> -kollageenfragment	193
Figuur 7.11	Kartering van die geïdentifiseerde Sp1, Ap1 en Ap2-bindingsgebiede op die mens pro- α 1(I)-kollageengeen	195
Figuur 7.12	DNase I-afskermingsanalise op die SV40 teenoorgestelde string met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie	198
Figuur 7.13	DNase I-afskermingsanalise op die SV40-DNA met toenemende konsentrasie Sp1-proteïen	199
Figuur 7.14	Drie skanderings van 'n enkele baan voor integrasie na densitometrie	201
Figuur 7.15	Bindingskrommes van Sp1 aan die ses Sp1-bindingsgebiede in pSV40 na berekening van die fraksionele beskerming (<i>f</i>) uit die verkreeë OD-waardes	204
Figuur 7.16	Densitometriese krommes van beide SV40-stringe om Sp1-bindingsgebiede te identifiseer en te kwantifiseer	207
Figuur 7.17	DNase I-afskermingsanalise met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie en die koderende string van die <u>Eco RV</u> - <u>Pvu II</u> -fragment	211
Figuur 7.18	DNase I-afskermingsanalise met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie en die teenoorgestelde <u>Eco RV</u> - <u>Pvu II</u> -fragment	213
Figuur 7.19	DNase I-afskermingsanalise met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie en die koderende <u>Cla I</u> - <u>Xba I</u> -fragment	217
Figuur 7.20	DNase I-afskermingsanalise met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie en die teenoorgestelde <u>Cla I</u> - <u>Xba I</u> -fragment	219

Figuur 7.21	DNase I-afskermingsanalise met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie en die koderende <u>Xba I</u> - <u>Sac I</u> -fragment	221
Figuur 7.22	DNase I-afskermingsanalise met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie en die teenoorgestelde <u>Xba I</u> - <u>Sac I</u> -fragment	223
Figuur 7.23	DNase I-afskermingsanalise met die koderende string van die <u>Sma I</u> -fragment in die teenwoordigheid van toenemende Sp1 .	225
Figuur 7.24	DNase I-afskermingsanalise met die teenoorgestelde DNA-string van die <u>Sma I</u> -fragment in die teenwoordigheid van toenemende Sp1	227
Figuur 7.25	DNase I-afskermingsanalise met die koderende DNA-string van die <u>Sma I</u> - <u>Rsa I</u> -fragment in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene	231
Figuur 7.26	DNase I-afskermingsanalise met die teenoorgestelde DNA-string van die <u>Sma I</u> - <u>Rsa I</u> -fragment en toenemende Sp1-proteïene	233
Figuur 7.27	DNase I-afskermingsanalise met die koderende string van die <u>Rsa I</u> - <u>Hind III</u> -fragment in die teenwoordigheid van toenemende Sp1-proteïene	237
Figuur 7.28	DNase I-afskermingsanalise van die teenoorgestelde DNA-string van die <u>Rsa I</u> - <u>Hind III</u> -fragment in die teenwoordigheid van toenemende Sp1-proteïene	239
Figuur 7.29	DNase I-afskermingsanalise met die koderende string van die <u>Hind III</u> - <u>Rsa I</u> -fragment en 'n toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie	241
Figuur 7.30	DNase I-afskermingsanalise van die teenoorgestelde DNA-string van die <u>Hind III</u> - <u>Rsa I</u> -fragment en toenemende Sp1-proteïene	243
Figuur 7.31	DNase I-afskermingsanalise van die koderende DNA-string van die SV40-fragment en 'n toenemende Ap1-proteïenkonsentrasie	255
Figuur 7.32	DNase I-afskermingsanalise van die teenoorgestelde DNA-string van die SV40-fragment met toenemende Ap1-proteïenkonsentrasies	257
Figuur 7.33	DNase I-afskermingsanalise van die koderende string van die <u>Sma I</u> -fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap1-proteïenkonsentrasie	261

Figuur 7.34	DNase I-afskermingsanalyse van die teenoorgestelde DNA-string van die <u>Sma I</u> -fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap1-proteïenkonsentrasie	263
Figuur 7.35	DNase I-afskermingsanalyse van die koderende DNA-string van die SV40-fragment met toenemende Ap2-proteïene	265
Figuur 7.36	DNase I-afskermingsanalyse van die teenoorgestelde DNA-string van die SV40-fragment met toenemende Ap2-proteïene	267
Figuur 7.37	DNase I-afskermingsanalyse van die koderende string van die <u>Eco RV</u> - <u>Pvu II</u> -fragment met toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie	271
Figuur 7.38	DNase I-afskermingsanalyse van die teenoorgestelde <u>Eco RV</u> - <u>Pvu II</u> -fragment met toenemende Ap2-proteïene	273
Figuur 7.39	DNase I-afskermingsanalyse van die koderende string van die <u>Cla I</u> - <u>Xba I</u> -fragment met toenemende Ap2-proteïenkonsentrasies	277
Figuur 7.40	DNase I-afskermingsanalyse van die teenoorgestelde DNA-string van die <u>Cla I</u> - <u>Xba I</u> -fragment en toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie	279
Figuur 7.41	DNase I-afskermingsanalyse van die koderende string van die <u>Xba I</u> - <u>Sac I</u> -fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie	283
Figuur 7.42	DNase I-afskermingsanalyse van die teenoorgestelde DNA-string van die <u>Xba I</u> - <u>Sac I</u> -fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie	285
Figuur 7.43	DNase I-afskermingsanalyse van die koderende string van die <u>Sma I</u> -fragment met toenemende Ap2-proteïene	287
Figuur 7.44	DNase I-afskermingsanalyse van die teenoorgestelde DNA-string van die <u>Sma I</u> -fragment met toenemende Ap2-proteïene	289
Figuur 7.45	DNase I-afskermingsanalyse van die koderende string van die <u>Sma I</u> - <u>Rsa I</u> -fragment met toenemende Ap2-konsentrasies	293
Figuur 7.46	DNase I-afskermingsanalyse met die teenoorgestelde DNA-string van die <u>Sma I</u> - <u>Rsa I</u> -fragment en toenemende Ap2-konsentrasies	295
Figuur 7.47	DNase I-afskermingsanalyse van die koderende DNA-string van die <u>Rsa I</u> - <u>Hind III</u> -fragment met toenemende Ap2-konsentrasies	299

Figuur 7.48	DNase I-afskermingsanalise met die teenoorgestelde DNA-string van die <u>Rsa I</u> - <u>Hind III</u> -fragment en toenemende Ap2-konsentrasies	301
Figuur 7.49	DNase I-afskermingsanalise van die koderende DNA-string van die <u>Hind III</u> - <u>Rsa I</u> -fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-konsentrasies	303
Figuur 7.50	DNase I-afskermingsanalise met die teenoorgestelde DNA-string van die <u>Hind III</u> - <u>Rsa I</u> -fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-konsentrasies	305
Figuur 7.51	DNase I-afskermingsanalise van die <u>Rsa I</u> - <u>Hind III</u> -kollageenfragment in die teenwoordigheid van Sp1- en Ap2-proteïene	315
Figuur 7.52	Diagrammatiese voorstelling van die binding van die Sp1-, Ap1 en Ap2-proteïene met ooreenkomstige bindingsaffiniteite aan die pro- α 1(I)-kollageengeen	316
Figuur 8.1	Elektronmikroskopie van Sp1-SV40 DNA komplekse	324
Figuur 8.2	Interne standaarde gebruik tydens elektron mikroskopiese ondersoeke	326
Figuur 8.3	Histogram van die metings van die SV40-DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1	329
Figuur 8.4	Voorbeelde van repliserende DNA-molekules	331
Figuur 8.5	Kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en SV40 DNA	332
Figuur 8.6	Histogram van die metings van die pSP65 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene	335
Figuur 8.7	Elektronmikroskopie van Sp1-pSP65 komplekse	336
Figuur 8.8	Twee verskillende posisies van gebonde Sp1-proteïene aan die 3369 bp pCX DNA-molekules	339
Figuur 8.9	Histogram van die meting van die eindpunte van die DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene	341
Figuur 8.10	A: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en pEP DNA-molekules B: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en pXS DNA-molekules	342 342

Figuur 8.11	Histogram van die metings van die pSS DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1	346
Figuur 8.12	Elektronmikroskopie van 'n enkel kompleks gevorm tussen Sp1-proteïene en 'n pSS DNA-molekule	347
Figuur 8.13	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en pHR295 DNA-molekules	349
Figuur 8.14	Histogram van die metings van die pHR295 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1	350
Figuur 8.15	Elektronmikroskopie van 'n enkel proteïenkompleks gevorm tussen Sp1-proteïene en 'n pHR3' DNA-molekule	351
Figuur 8.16	Histogram van die metings van die pHS-Int1 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap1-proteïene	352
Figuur 8.17	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap1-proteïene en 'n pHS-int1 DNA	353
Figuur 8.18	Histogram van die metings van die pGEM-11zf(+) DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene	356
Figuur 8.19	Histogram van die metings van die pGEM-BB5' DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene	357
Figuur 8.20	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en 'n pGEM-BB5(A) DNA-molekule	359
Figuur 8.21	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en 'n pGEM-BB5(A) DNA-molekule	360
Figuur 8.22	Elektronmikroskopie van Ap2-SV40 DNA-kompleksvorming .	364
Figuur 8.23	Kleiner vorme van aggreëatvorming tussen Ap2-proteïene en SV40 DNA-molekules na verlaging van proteïenkonsentrasie	365
Figuur 8.24	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en pSP72 DNA-molekule	367
Figuur 8.25	Histogram van die metings van die SV40 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene	368
Figuur 8.26	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en pSP65 DNA-molekules	369

Figuur 8.27	Histogram van die metings van die pSP65 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene	370
Figuur 8.28	Elektronmikroskopie van 'n enkel kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en 'n pEP DNA-molekule	372
Figuur 8.29	Histogram van die metings van DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene	375
Figuur 8.30	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en pCX DNA-molekules	376
Figuur 8.31	Histogram van die metings van die pXS DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene	378
Figuur 8.32	Elektronmikroskopie van twee verskillende kompleksvormings tussen Ap2-proteïene en pXS DNA-molekules	380
Figuur 8.33	Histogram van die metings van die pSS DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene	381
Figuur 8.34	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en pSS DNA-molekule	383
Figuur 8.35	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en pRS DNA-molekule	383
Figuur 8.36	A: Aggregaatvorming van Ap2-proteïene met pHR295 DNA-molekules B: Lusvorming deur pHR295 DNA-molekules as gevolg van proteïen-proteïeninteraksies	384 384
Figuur 8.37	Histogram van metings van DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene	387
Figuur 8.38	Elektronmikroskopie van Ap2-pHR295 DNA-kompleksvorming	389
Figuur 8.39	Elektronmikroskopie van lusvorming deur die pHR3' DNA-molekule as gevolg van Ap2-Ap2 interaksie	390
Figuur 8.40	Elektronmikroskopie van Ap2-pHS-ex1 DNA-kompleksvorming	390
Figuur 8.41	Elektronmikroskopie van Ap2-pHS-int1 DNA-kompleksvorming	392
Figuur 8.42	Elektronmikroskopie van AP2-pGEM-11zf(+) DNA-kompleksvorming	392

Figuur 8.43	Histogram van die metings van die pGEM-11zf(+) DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene	393
Figuur 8.44	Elektronmikroskopie van Ap2-pGEM-BB5(A) DNA kompleksvorming	394
Figuur 8.45	Histogram van metings van pGEM-BB5(A) DNA molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene	395
Figuur 8.46	Elektronmikroskopie van Ap1-SV40 DNA-kompleksvorming	400
Figuur 8.47	Aggregaatvorming tussen Ap1-proteïene en pSS DNA-molekules	402
Figuur 8.48	Histogram van die metings van DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap1-proteïene	403
Figuur 8.49	Elektronmikroskopie van Ap1-pSP65 DNA-kompleksvorming	406
Figuur 8.50	Histogram van metings van die pSP65 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap1-proteïene	407
Figuur 8.51	Elektronmikroskopie van Ap1-pHS-ex1 DNA-kompleksvorming	408
Figuur 8.52	Histogram van metings van die pHS-int1 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap1-proteïene	409
Figuur 8.53	Elektronmikroskopie van Ap1-pHS-int1 DNA-kompleksvorming	410
Figuur 8.54	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap1-en pGEM-11zf(+) DNA-molekules	413
Figuur 8.55	Histogram van die metings van pGEM-11zf(+) DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap1-proteïene	414
Figuur 8.56	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap1-proteïene en pGEM-BB5(A) DNA-molekules	415
Figuur 8.57	Histogram van die metings van pGEM-BB5(A) DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap1-proteïene	416
Figuur 8.58	Histogramme van die metings van die pGEM-11zf(+) DNA-molekules in die teenwoordigheid van proteïene	420

Figuur 8.59	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen beide Sp1 en AP2 met pGEM-11zf(+) DNA-molekules	422
Figuur 8.60	Histogramme van die metings van die pGEM-BB5(A) DNA-molekules in die teenwoordigheid van proteïene	425
Figuur 8.61	Elektronmikroskopie van DNA-kompleksvorming tussen Sp1 en Ap2-proteïene met pGEM-BB5(A) DNA-molekules . .	427
Figuur 8.62	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en die 16,9 kb C129-10B DNA-molekules	431
Figuur 8.63	Histogram van die metings van die 16,9 kb C129-10A (paneel A) DNA-molekules met Sp1-proteïene en C129-10B (paneel B) DNA-molekules met Sp1-proteïene	433
Figuur 8.64	Elektronmikroskopie van Ap2-C129-10 DNA-kompleksvorming	434
Figuur 8.65	Histogramme van die metings van die 16,9 kb C129-10A (paneel A) DNA-molekules met Ap2-proteïene en C129-10B (paneel B) DNA-molekules met Ap2-proteïene	437
Figuur 8.66	Twee voorbeelde van aggreëatvorming tussen Ap1-proteïene en C129-10 DNA-molekules	438
Figuur 8.67	Histogram van die metings van die 18 kb Tipe II kollageen DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene	440
Figuur 8.68	Elektronmikroskopie van Sp1-18 kb Tipe II kollageen-DNA-kompleksvorming	441
Figuur 8.69	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en 18 kb Tipe II kollageen DNA-molekules	442
Figuur 8.70	Histogram van die metings van die 18 kb Tipe II kollageen DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene	443
Figuur 8.71	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap1-proteïene en die 18 kb Tipe II kollageen DNA-molekules	446

Figuur 8.72	Histogram van die metings van die 18 kb Tipe II kollageen DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1- en Ap2-proteïene	447
Figuur 8.73	Histogram van die metings van die 30 kb Tipe II kollageen DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene	450
Figuur 8.74	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen die Sp1-proteïene en die 30 kb Tipe II kollageen DNA-molekules	453
Figuur 8.75	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen die Ap2-proteïene en die 30 kb Tipe II kollageen DNA-molekules	454
Figuur 8.76	Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap1-proteïene en die 30 kb Tipe II kollageen DNA-molekule	457
Figuur 9.1	Gebiede van die mens pro- α 1(I)-geen wat met behulp van funksionele analyses ondersoek is om reguleringsgebiede te identifiseer	465
Figuur 9.2	Diagrammatiese voorstelling van alle geïdentifiseerde bindingsproteïene soos verkry uit die literatuur en hierdie studie	489
Figuur 9.3A	Skematiese voorstelling van die hibridisering van die twee pirimidienryke gebiede	496
Figuur 9.3B	Skematiese voorstelling van die interaksie tussen moontlike bindingsproteïene gebonde aan die DNA	496
Figuur 9.3C	Skematiese voorstelling van die binding van RNA polimerase II om transkripsie te begin	496
Figuur 9.4	Diagrammatiese voorstelling van die voorgestelde model met die bindingsproteïene geïdentifiseer in hierdie studie en die literatuur	497

LYS VAN TABELLE

Tabel 5.1	Samevatting van die RTL-waardes van die mutante gene verkry na inspuiting in <i>X. laevis</i> oösiete	110
Tabel 5.2	Relatiewe transkripsievlakke van die mutante gene in soogdiersellyne	114
Tabel 6.1	Optimale DNase I-konsentrasies vir die SV40- en kollageenfragmente	126
Tabel 7.1	Bindingsvolgordes vir Sp1 soos verkry uit die literatuur	151
Tabel 7.2	Bindingsvolgordes vir Ap1 soos verkry uit die literatuur	156
Tabel 7.3	Bindingsvolgordes vir Ap2 soos verkry uit die literatuur	157
Tabel 7.4	Sp1, Ap1 en Ap2-bindingspunte op die kollageenfragment vanaf -445 tot +1697	196
Tabel 7.5	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Sp1 in die <u>Eco RV</u> - <u>Pvu II</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	208
Tabel 7.6	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Sp1 aan die <u>Cla I</u> - <u>Xba I</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	214
Tabel 7.7	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Sp1 in die <u>Xba I</u> - <u>Sac I</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	215
Tabel 7.8	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Sp1-bindingsgebiede in die <u>Sma I</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	228
Tabel 7.9	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Sp1-bindingsgebiede in die <u>Sma I</u> - <u>Rsa I</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	229
Tabel 7.10	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Sp1-bindingsgebiede in die <u>Rsa I</u> - <u>Hind III</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	235

Tabel 7.11	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Sp1-bindingsgebiede in die <u>Hind III</u> - <u>Rsa I</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	244
Tabel 7.12	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Sp1-binding in die SV40-DNA en kollageengeenfragmente na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	246
Tabel 7.13	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Ap1-bindingsgebiede in die SV40-fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	253
Tabel 7.14	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Ap1-bindingsgebiede in die <u>Sma I</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	258
Tabel 7.15	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Ap2-bindingsgebiede in die SV40-fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	268
Tabel 7.16	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Ap2-bindingsgebiede in die <u>Eco RV</u> - <u>Pvu II</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	274
Tabel 7.17	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Ap2-bindingsgebiede in die <u>Cla I</u> - <u>Xba I</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	280
Tabel 7.18	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Ap2-bindingsgebiede in die <u>Xba I</u> - <u>Sac I</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	281
Tabel 7.19	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Ap2-bindingsgebiede in die <u>Sma I</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	290
Tabel 7.20	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Ap2-bindingsgebiede in die <u>Sma I</u> - <u>Rsa I</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	296
Tabel 7.21	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Ap2-bindingsgebiede in die <u>Rsa I</u> - <u>Hind III</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	297
Tabel 7.22	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Ap2-bindingsgebiede in die <u>Hind III</u> - <u>Rsa I</u> -fragment na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	306

Tabel 7.23	Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Ap2-binding in die SV40-DNA en kollageengeenfragmente na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie	308
Tabel 8.1	DNA-proteïenkompleksvorming met Sp1 en die kollageenfragmente	361
Tabel 8.2	DNA-proteïenkompleksvorming met Ap2 en die kollageenfragmente	397
Tabel 8.3	DNA-proteïenkompleksvorming met Ap1 en die kollageenfragmente	417
Tabel 8.4	DNA-proteïenkompleksvorming met Sp1 en Ap2 en die kollageenfragment pGEM-BB5(A)	428
Tabel 8.5	DNA-proteïenkompleksvorming met Sp1-, Ap2 en Ap1 en die langer kollageenfragmente	455
Tabel 8.6	Frekwensie van kompleksvorming by die verskillende kollageenfragmente	458
Tabel 9.1	Sp1, Ap1 en Ap2-bindingspunte op die kollageenfragment vanaf -445 tot +1697 met hul onderskeie bindingsaffiniteite	490

ABSTRACT

INTERACTION OF SELECTED TRANSCRIPTION FACTORS WITH REGULATORY REGIONS OF THE HUMAN PRO- α 1(I) COLLAGEN GENE

Original title: Interaksie van geselekteerde transkripsiefaktore met reguleringsgebiede van die mensgeen vir pro- α 1(I)-kollageen

The fibrillar collagen Type I is abundant in a variety of connective tissue. Type I collagen is first assembled as two pro- α 1(I) and one pro- α 2(I) chains and the genes are under coöordinated control. Preliminary studies in the elucidation of the transcriptional regulation of the collagen genes, showed that the human pro- α 1(I) collagen gene contains a strong promoter as well as an enhancer-like element in the first intron (Rossouw *et al.*, 1987). Publication of negative elements in the identified enhancer-like region, however, led to much controversy surrounding the existence of this enhancer-like element in the first intron of the human pro- α 1(I) gene. Little knowledge about *cis*-acting sequences and their interaction with *trans*-acting elements in the human pro- α 1(I) gene is available in the literature. Therefore the aim of this study was to clarify the controversy surrounding the enhancer-like element in the first intron of the human pro- α 1(I) collagen gene and to further delineate the transcription regulatory regions in this gene between -442 and +1697.

The first part of this study deals with the functional data obtained from two different functional assays, the *X. laevis* oocyte system and the transfection system. Results from these experiments showed the existence of an enhancer-like region as well as negative elements in the first intron of the human pro- α 1(I) gene. The negative effect of these negative elements, however, is neutralized depending on the promoter region tested together with the intron region. In the second part of this study the nature and characteristics of the interaction between the *cis*-acting sequences and *trans*-acting elements between -442 and +1697 of the human pro- α 1(I) gene was determined. DNase I footprinting with crude nuclear extracts from BJA-B and HeLa cells as well as S-300 fractions from BJA-B and HeLa cells, revealed long stretches of masked sequences. These long stretches of masked sequences indicate that there are regions where transcription factors overlap. To delineate

the interaction of specific factors, purified transcription factors are necessary. For this purpose three commercial available transcription factors: Sp1, Ap1 and Ap2 were used to analyze the gene region between -442 and +1697 systematically, employing DNase I footprinting.

In a first step of delineation a computer search was done to determine all potential binding sites for the three selected transcription factors whereafter the DNase I footprinting experiments were performed. During these experiments sixteen Sp1, one Ap1 and twenty-two Ap2 binding sites were identified in the human pro- α 1(I) gene between -442 and +1697 and mapped. An indication of the binding affinities of each binding protein to its related binding site was obtained by the use of increasing protein concentrations with a constant DNA concentration during DNase I footprinting. Quantitative determination of each affinity binding constant was obtained by utilizing densitometry and liquid scintillation spectrometry as well as Marquard's method of non linear least square analysis. Detection of DNA-protein binding via transmission electron microscopy (TEM) supports the results obtained via DNase I footprinting. Analysis of DNA-protein binding via TEM also emphasized the ability of this technique to identify DNA-protein binding regions on long DNA-molecules at low resolution.

A looping model was proposed during this study to elucidate the transcriptional regulation of the human pro- α 1(I) collagen gene, using the results obtained in this study. The basis of this model is the binding of the homologous pyrimidine-rich regions in the promoter and first intron of the gene with one another, bringing the promoter and enhancer in near proximity to one another while looping out the intervening DNA. The identified Sp1 and Ap2 binding sites in the enhancer can then bind to the Ap2 binding sites in the promoter region via protein-protein interaction thereby enhancing the transcription activity from the promoter. Protein-protein interaction between different proteins, as well as protein selfassociation, while looping out the intervening DNA, was observed during the electron microscopy study supporting the proposed model in this study.

This study makes a real contribution to the elucidation of the transcriptional regulation of the human pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene. Part of the functional data was incorporated in the following paper:

Rossouw, C.M.S., Vergeer, W.P., du Plooy, S.J., Bernard, M.P., Ramirez, F. & de Wet, W.J. (1987).

"DNA sequences in the first intron of the human pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene enhance transcription"

Journal of Biological Chemistry 262, 15151-15157.

The rest of the results emanating from this study are in preparation for publication. Various facets of this work have also been presented at the following meetings:

de Wet, W.J., de Vries, W.N., Koedood, R., Rossouw, C.M.S. & Vergeer, W.P.

"Interaction of nuclear factors with the enhancer and promoter regions of the human pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene"

Second International Conference on Molecular Biology and Pathology of Matrix. Philadelphia, USA (June 1988).

Vergeer, W.P., Rossouw, C.M.S. & de Wet, W.J.

"Sequences in the first intron of the human pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene enhance transcription in transfected fibroblasts"

Ninth Congress of the South African Biochemical Society: Wilderness (27-31 March 1988).

Vergeer, W.P., de Vries, W.N. & de Wet, W.J.

"In vitro binding of Sp1, Ap1 and Ap2 to regulatory regions of human pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene"

Eleventh Congress of the South African Biochemical Society: Sun City (28 June - 1 July 1992).

OPSOMMING

INTERAKSIE VAN GESELEKTEERDE TRANSKRIPSIEFAKTORE MET REGULERINGSGBIEDE VAN DIE MENS- $\alpha 1(I)$ -KOLLAGEEN

Die fibrille kollageen Tipe I kom algemeen in 'n verskeidenheid bindweefselstrukture voor. Tipe I kollageen word aanvanklik uit twee pro- $\alpha 1(I)$ - en een pro- $\alpha 2(I)$ -kettings saamgestel en die gene staan onder gekoördineerde beheer. Aanvanklike studies om die regulering van transkripsie van hierdie gene op te klaar het onder andere getoon dat die mens pro- $\alpha 1(I)$ -geen oor 'n sterk promotor en 'n aktiveringsvolgorde-element in die eerste intron beskik. Die waarneming van negatiewe elemente in die geïdentifiseerde aktiveringsvolgordegebied het tot heelwat teenstrydighede ten opsigte van die aktiveringsvolgorde-element in die eerste intron van die mens pro- $\alpha 1(I)$ -geen gelei. Min kennis aangaande *cis*-regulerende elemente in die mens pro- $\alpha 1(I)$ -geen en *trans*-werkende faktore wat aan die *cis*-gebiede bind is in die literatuur bekend. Hierdie studie is onderneem om meer duidelikheid oor die aktiveringsvolgorde-element in die eerste intron van die mens pro- $\alpha 1(I)$ -geen te verkry en om die leemtes aangaande *cis*-werkende reguleringsgebiede en *trans*-werkende faktore wat daaraan bind, te ondervang. Laasgenoemde is ondervang deur die gebied tussen -442 en +1697 van die mens pro- $\alpha 1(I)$ -geen sistematies te analiseer en te karakteriseer vir die binding van die transkripsiefaktore Sp1, Ap1 en Ap2 aan die DNA.

Die eerste deel van hierdie ondersoek het gehandel oor die funksionele data wat verkry is uit die *X. laevis* oösietsistiem en die transfeksiesistiem. Negatiewe elemente wat in die eerste intron voorkom se negatiewe invloed word opgehef afhangend van die promotorgebied wat tesame met die introngebied getoets word en transkripsionele aktivering van die geen word so verkry. In die tweede deel van hierdie ondersoek is die mens pro- $\alpha 1(I)$ -geengebied tussen -442 en +1697 gefragmenteer en in die teenwoordigheid van ruwe kernekstrakte van BJA-B of HeLa selle of S-300 fraksies van BJA-B en HeLa selle aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Groot gebiede van afskerming is waargeneem wat aantoon dat daar gebiede in die geen voorkom waar 'n verskeidenheid van transkripsiefaktore oorvleuelend bind. Individuele afskermingsgebiede vir spesifieke transkripsiefaktore was moeilik in hierdie analises onderskeibaar, wat die gebruik van suiwer transkripsiefaktore genoodsaak het. Drie

suiwer transkripsiefaktore naamlik Sp1, Ap1 en Ap2 is aangekoop en binding van hierdie faktore aan die reguleringsgebiede tussen -442 en +1697 van die mens pro- α 1(I)-geen is op 'n sistematiese wyse met behulp van DNase I-afskermingsanalise ondersoek.

Potensiële Sp1-, Ap1- en Ap2-bindingsvolgordes in die geengebied is met behulp van rekenaaranalises geïdentifiseer, waarna DNase I-afskermingsanalise uitgevoer is. Sestien Sp1-, een Ap1- en twee-en-twintig Ap2-bindingsgebiede is in die gebied tussen -442 en +1697 van die mens pro- α 1(I)-geen geïdentifiseer en gekarteer. Deur die gebruik van toenemende proteïenkonsentrasie tesame met 'n konstante DNA-konsentrasie tydens DNase I-afskermingsanalise is 'n tendens van die bindingsaffiniteit van elke bindingsproteïen aan sy spesifieke bindingsvolgorde verkry. Kwantitatiewe bepalinge van die bindingsaffiniteit konstantes is verkry uit densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie tesame met Marquart se metode van nie-linieêre regressie. Binding van Sp1, Ap1 en Ap2 is verder onder die transmissie-elektronmikroskoop ondersoek. Analise van hierdie elektronmikroskopiese resultate ondersteun die resultate wat verkry is met die DNase I-afskermingsanalise en toon verder die vermoë van die elektronmikroskooptechniek aan om DNA-proteïenbindingsgebiede op lang DNA-molekules aan te toon by lae resolusie.

Om die regulering van die mens pro- α 1(I)-geen te probeer verklaar is 'n model van lusvorming in hierdie studie voorgestel deur gebruikmaking van die data verkry uit hierdie studie. Die basis van hierdie model is geleë in die binding tussen die twee homoloë pirimidienryke gebiede. Binding van die pirimidienryke gebiede met mekaar bring die promotor en die aktiveringsvolgorde in die eerste intron teenoor mekaar te staan. Die geïdentifiseerde Sp1 en Ap2 bindingsgebiede teenwoordig in die aktiveringsvolgorde kom dan in aanraking met die Ap2 bindingsgebiede in die promotor deur proteïen-proteïen interaksie en aktiveer waarskynlik op hierdie wyse die transkripsie van die geen vanaf die promotor. Lusvorming tussen verskillende proteïene sowel as selfassosiasie tussen dieselfde proteïene soos waargeneem met die elektronmikroskoop, ondersteun die voorgestelde model van regulering van die mens pro- α 1(I)-geen soos voorgestel in hierdie studie.

Hierdie studie maak 'n daadwerklike bydrae tot die opklaring van die regulering van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen. 'n Gedeelte van die funksionele data is in die volgende publikasie vervat:

Rossouw, C.M.S., Vergeer, W.P., du Plooy, S.J., Bernard, M.P., Ramirez, F. & de Wet, W.J. (1987).

"DNA sequences in the first intron of the human pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene enhance transcription"

Journal of Biological Chemistry 262, 15151-15157.

Verdere resultate van hierdie studie is tans in voorbereiding vir publikasie. Resultate van hierdie studie is ook by verskeie kongresse voorgedra soos hieronder vermeld:

de Wet, W.J., de Vries, W.N., Koedood, R., Rossouw, C.M.S. & Vergeer, W.P.

"Interaction of nuclear factors with the enhancer and promoter regions of the human pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene"

Second International Conference on Molecular Biology and Pathology of Matrix. Philadelphia, USA (Junie 1988).

Vergeer, W.P., Rossouw, C.M.S. & de Wet, W.J.

"Sequences in the first intron of the human pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene enhance transcription in transfected fibroblasts"

Negende Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemie Vereniging: Wildernis (27-31 Maart 1988).

Vergeer, W.P., de Vries, W.N. & de Wet, W.J.

"In vitro binding of Sp1, Ap1 and Ap2 to regulatory regions of human pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene"

Elfde Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemie Vereniging: Sun City (28 Junie - 1 Julie 1992).

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Kollageen is 'n belangrike strukturele proteïen wat wydverspreid in bindweefselstrukture en die ekstrasellulêre matriks voorkom. Die meer as dertien verskillende tipes kollagene wat reeds bekend is, word in twee groepe verdeel, naamlik die fibrille- en die nie-fibrille-kollagene. Ongeveer 90% van alle kollagene wat voorkom, is Tipe I kollageen, wat veral in been, vel, tendons, ligamente en ander bindweefselstrukture aangetref word. Aanvanklik word Tipe I kollageen, wat 'n heterotrimeriese proteïen is, as prokollageen gesintetiseer. Hierdie prokollageen is uit twee identiese pro- α 1(I)-polipeptiedkettings en een pro- α 2(I)-polipeptiedketting saamgestel (Vuorio en De Crombrughe, 1990). Die sintese van hierdie twee proteïene staan onder streng gekoördineerde beheer (De Wet *et al.*, 1983). Om die meganisme van hierdie gekoördineerde beheer beter te begryp, is dit noodsaaklik om die regulering van transkripsie van die Tipe I prokollageengene te bestudeer.

Twee sleutelkonsepte het tot die daarstel van 'n molekulêre verklaringsbasis vir geenregulering in eukariote gelei (Jones *et al.*, 1988; Mitchell en Tjian, 1989 oorsigartikels). Die eerste is die spesifisiteit en vlak van geenuitdrukking wat deur die aard en rangskikking van *cis*-werkende DNA-reguleringsvolgordes in en om 'n spesifieke geen bepaal word. Tweedens word hierdie reguleringspotensiaal van 'n spesifieke geen, soos bepaal deur die aard en rangskikking van die *cis*-werkende DNA-volgordes, tot uitdrukking gebring deur die uitkenning van die DNA-volgordes deur *trans*-werkende volgorde-spesifieke DNA-bindingsproteïene. 'n Groot verskeidenheid *trans*-werkende volgorde-spesifieke DNA-bindingsproteïene is aanvanklik deur die bestudering van reguleringsgebiede van 'n aantal eukariotiese DNA-virusse ontdek, maar is kort daarna in die reguleringsgebiede van die eukariotiese gene geïdentifiseer. Hierdie bindingsproteïene tree meestal as transkripsiefaktore op wat tydens veral die inisiasie van transkripsie op 'n samewerkende wyse die differensiële uitdrukking van 'n bepaalde geen reguleer. Sommige van dié DNA-bindingsproteïene kom as algemene transkripsiefaktore in selle voor, terwyl ander DNA-bindingsproteïene weer 'n selspesifieke verspreiding openbaar (Faisst en Meyer, 1992).

Bestudering van die transkripsionele regulering van die kollageengene is hoofsaaklik op die twee gene van die Tipe I kollageen gerig. Hierdie twee gene wat vir die pro- α 1(I)- en pro- α 2(I)-kettings van Tipe I kollageen kodeer, is reeds gekloneer en gekarakteriseer (De Wet *et al.*, 1987; D'Allesio *et al.*, 1988), en derhalwe is die primêre struktuur van die twee gene goed bekend. Gegewens wat tot op datum ten opsigte van die transkripsionele regulering van die twee gene verkry is, is egter in sommige gevalle teenstrydig en vaag en dikwels oppervlakkig uitgevoer. 'n Breedvoerige bespreking van die gegewens oor die reeds bekende transkripsionele regulering van hierdie twee gene asook enkele van die ander kollageengene, volg in Hoofstuk 2 van hierdie studie.

In vergelyking met die omvattende gegewens wat reeds bekend is oor die interaksie van DNA-bindingsfaktore met transkripsionele beheergebiede in geselekteerde DNA-virusse en eukariotiese gene, bestaan daar 'n aantal opvallende leemtes in die huidige kennis van die transkripsionele regulering van die Tipe I prokollageengene. Die opvallendste hiervan is die gebrek aan 'n volledige beeld van die binding van reeds bekende transkripsiefaktore aan potensiële *cis*-werkende DNA reguleringsvolgordes. Daarom is daar in hierdie studie eerstens deur 'n sistematiese analise van die reguleringsgebiede van die mens pro- α 1(I)-geen vasgestel vir watter van die geselekteerde transkripsiefaktore, naamlik Sp1, Ap1 en Ap2, daar bewese uitkenningevolgordes teenwoordig is. Tweedens is vasgestel wat die bindingsaffiniteit van elke *trans*-werkende faktor tot sy spesifieke DNA-bindingsvolgorde is en derdens die aard en rangskikking van die DNA-elemente wat tot die transkripsionele regulering van die mens pro- α 1(I)-geen bydra.

Die benaderingswyse vir hierdie ondersoek was soos volg: Die pro- α 1(I)-geengebied wat die reguleringsgebiede tot en met die tweede ekson bevat, is met behulp van beskikbare restriksie-ensiemsnitpunte in kleiner fragmente verdeel en in pSP64-vektore ingebou (Hoofstuk 4). Die rol wat elk van dié fragmente moontlik in die regulering van die geen op funksionele vlak mag speel, is vervolgens nagegaan deur verskeie metodes en dit word volledig in Hoofstuk 5 bespreek. Hierna is die binding van transkripsiefaktore aan die reguleringsgebiede nagegaan met behulp van DNase I-afskermingsanalise (Engels: footprinting). Aanvanklik is die binding van sodanige faktore bevestig deur gebruik te maak van ruwe sowel as gefraksioneerde kernekstrakte (Hoofstuk 6). Bewese bindingspunte is op

grond van die resultate in Hoofstuk 6 aan die hand van die rekenaaranalise en Maxam en Gilbert se volgordebepaling geïdentifiseer.

Die identifisering van spesifieke bindingsgebiede van die geselekteerde gesuiwerde transkripsiefaktore Ap1, Ap2 en Sp1 in die kollageenfragmente is verder met DNase I-afskermingsanalise nagegaan en die bindingsaffiniteit van elk aan sy onderskeie uitkenningpunte in die reguleringsgebiede is kwantitatief bepaal (Hoofstuk 7). Ten slotte is die binding van laasgenoemde drie faktore en hul bydrae tot die vorming van funksionele komplekse met behulp van die transmissie-elektronmikroskoop ondersoek. Dié resultate word volledig in Hoofstuk 8 bespreek. Deurgaans is daar in hierdie studie van die SV40-vroeë promotorgebied (Mitchell *et al.*, 1987) as vergelykende standaard gebruik gemaak. Die resultate van hierdie studie word in hul onderlinge verband en met die gegewens wat reeds bekend is, vanuit die literatuurondersoek (Hoofstuk 2), in Hoofstuk 9 volledig bespreek. Ten slotte word 'n model wat die interaksie tussen die promotor en die eerste intrangebied met die geïdentifiseerde transkripsiefaktore voorstel, voorgelê en geëvalueer.

HOOFTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1 INLEIDING

'n Deeglike literatuuroorsig oor die verskillende transkripsionele elemente wat betrokke is by die regulering van transkripsie in die algemeen, sowel as meer agtergrond oor Tipe I kollageen en die regulering van die onderskeie gene, is 'n noodsaaklike voorvereiste vir die bestudering van die interaksie van geselekteerde transkripsiefaktore met die reguleringsgebiede van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen.

In hierdie literatuuroorsig oor transkripsionele elemente is daar hoofsaaklik na twee hoofpunte gekyk, naamlik *cis*-werkende en *trans*-werkende elemente. In die geval van die *trans*-werkende elemente is daar op die drie transkripsiefaktore wat in hierdie studie ondersoek is, naamlik Sp1, Ap1 en Ap2, gekonsentreer. Die regulering van transkripsie van die pro- α 1(I)-geen en die rol van bekende faktore hierby, word in besonderhede bespreek. Die literatuuroorsig word afgesluit met die benaderingswyse en 'n moontlike model waarvolgens binding tussen die reguleringsgebiede in die mens pro- α 1(I)-kollageengeen kan plaasvind.

2.2 TRANSKRIPSIONELE ELEMENTE IN EUKARIOTIESE GENE

Regulering van geenaktiwiteit vind hoofsaaklik op die transkripsionele vlak plaas en beheer van die snelheid van transkripsionele inisiasie is 'n belangrike element in die regulering van geenuitdrukking. Verskeie reguleringselemente soos promotors en aktiveringsvolgordes beïnvloed die transkripsie van eukariotiese gene. Hierdie elemente is weer uit bepaalde DNA-volgordemotiewe saamgestel wat bindingspunte vir volgorde-spesifieke DNA-bindingsproteïene daarstel. Promotors en aktiveringsvolgordes oorvleuel dikwels op fisiese sowel as funksionele gebied. So byvoorbeeld word na die invoeging van 'n aktiveringsvolgorde-element direk stroom-op van die TATA-motief transkripsie gestimuleer, terwyl nie elke afsonderlike promotorelement in staat is om transkripsie oor lang afstande te aktiveer nie (Maniatis *et al.*, 1987).

2.2.1 CIS-WERKENDE ELEMENTE

2.2.1.1 PROMOTORS

Een van die basiese *cis*-werkende reguleringselemente is promotors. Promotors word vir die presiese en effektiewe inisiasie van transkripsie benodig en kom gewoonlik onmiddellik stroom-op van die inisiasiepunt vir transkripsie voor. Eukariotiese promotors waarby transkripsie deur die ensiem RNA-polimerase II betrokke is, bestaan tipies uit 'n patroon van stroom-op promotorelemente, 'n AT-ryke gebied bekend as die TATA-motief en die inisiasiepunt vir transkripsie. Transkripsie kan verder versnel word deur groepe stroom-op bindingsgebiede vir verskillende transkripsiefaktore wat naby of ver van die inisiasiepunt geleë is. Die meer distaal promotorelemente word ook aktiveringsvolgordes genoem (Wasylyk, 1988). Heelwat stroom-op promotorelemente wat gewoonlik uit 8 tot 12 bp bestaan, is al geïdentifiseer, waarvan die CCAAT-motief seker die bekendste is. Hierdie CCAAT-motief met 'n konsensusvolgorde van GG^C/TCAATCT word in 'n groot aantal verskillende promotors van verskeie gene aangetref en is gewoonlik 80 bp stroom-op van die transkripsie-inisiasiepunt geleë. Die funksie van hierdie stroom-op promotorelemente is hoofsaaklik om die tempo van transkripsie te verhoog. Deur middel van mutasiestudies is waargeneem dat die sterkte van promotors deur die aantal en tipe stroom-op promotor-elemente bepaal word en dat hulle oriëntasie-onafhanklik ten opsigte van die TATA-motief optree (Fromm en Berg, 1982; Maniatis *et al.*, 1987; Serfling *et al.*, 1985a).

Die TATA-motief word gewoonlik 20 tot 30 bp stroom-op van die inisiasiepunt vir transkripsie aangetref. Hierdie motief bestaan uit die 8 bp konsensusvolgorde TATA^T/AA^T/AA. Hoewel die TATA-motief die mees prominente promotorelement in verskeie promotors is, het baie gene ook nog addisionele inisiasie-elemente of slegs inisiasie-elemente in plaas van die TATA-motief. Waargenome TATA-lose promotors toon geen duidelike effek op die transkripsie van die geassosieerde geen nie. Die inisiasie-elemente is dus waarskynlik belangrik vir die bepaling van die ware inisiasiepunt eerder

as vir die inisiasie self. So het Roeder (1991) in 'n oorsigartikel aangetoon dat 'n faktor gevind is wat onafhanklik maar spesifiek aan sowel inisiasie-elemente in die TATA-lose terminale deoksie-nukleotidiel transferasepromotor bind as aan die TATA-bevattende HIV-1 en AdML promotors. 'n Studie deur Xu *et al.* (1991) het verder aangetoon dat die assimetrie van die TATA-motief nie die primêr bepalende faktor van die polariteit van transkripsie is nie, maar dat dit eerder deur die lineêre orde van die stroom-op elemente relatief tot die TATA-motief bepaal word. Hulle het ook waargeneem dat die nukleotiedvolgorde in die inisiasiegebied die presiese en effektiewe inisiasie beïnvloed.

Die transkripsie van gene is baie meer kompleks as wat aanvanklik verwag is. Goeie vordering in die opklaring van geentranskripsie is egter die afgelope tyd gemaak. Inisiasie van geentranskripsie deur RNA-polimerase II benodig buiten die ensiem ook die interaksie van 'n aantal algemene faktore (wat 'n spesifieke multiproteïenkompleks naby die inisiasiepunt vir transkripsie vorm) met die promotorelemente sodat 'n pre-inisiasiekompleks gevorm kan word. Die vorming van so 'n pre-inisiasiekompleks vir eukariotiese promotors staan in kontras met die prokariotiese promotors waar RNA-polimerase-holoënsiem dikwels genoeg is vir promotorherkenning en stabiele binding (Roeder, 1991).

Die bogenoemde algemene faktore wat by die pre-inisiasiekompleks betrokke is en goed gekarakteriseer is, is onder meer TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF en TFIIH. Slegs TFIID beskik oor 'n intrinsieke vermoë om aan spesifieke gebiede in die DNA te bind. Die TATA-motief word dan ook deur TFIID herken (Buratowski 1994) hoewel hierdie faktor selfs by inisiasie van transkripsie by TATA-lose promotors betrokke is (Sharp, 1992). Interaksie tussen die promotor en TFIID sorg vir die herkenning en binding van twee ander algemene inisiasiefaktore, naamlik TFIIB en TFIIF. Hierdie twee faktore kan nie in die afwesigheid van TFIID aan die promotor bind nie. Ook die ensiem RNA-polimerase II is nie in staat om op sy eie aan die promotor te bind nie. Die kompleks wat deur TFIID, TFIIB en TFIIF gevorm word,

word egter wel deur RNA-polimerase II gebind. Nadat die ensiem aan die kompleks gebind het, bind faktore TFIIE en TFIIH aan die ensiem sodat transkripsie geïnisieer kan word. 'n Ander algemene faktor bekend as BTF3 is ook in staat om aan polimerase II te bind, maar dit is tans nog onduidelik met watter van die TFII-faktore hierdie faktor ooreenkom (Greenblatt, 1991; Roeder 1991). Nadat die totale kompleks gevorm is, word 'n ATP-afhanklike aktiveringstap benodig vir transkripsie om plaas te vind. Faktore TFIIA bind aan die promotor TFIIID-kompleks, maar is nie noodsaaklik vir basiese transkripsie met suiwer proteïene nie. Hierdie faktor sorg egter vir die handhawing van die gevormde kompleks, onder meer fisiologiese toestande en werk negatiewe reguleerders van transkripsie teen deurdat TFIIA so nou met die kompleks gebonde is (Buratowski, 1994).

Die algemene faktor TFIIID wat in die eerste stap van die vorming van die pre-inisiasiekompleks aan die TATA-motief bind, bestaan self weer uit 'n universele TBP (TATA-bindingsproteïen) en 'n groot aantal geassosieerde faktore wat tot spesie en selspesifieke variasies lei. Daar is ook waargeneem dat TBP met hoë affiniteit afsonderlik aan die TATA-motief kan bind. Onlangs het Kim *et al.* (1993) deur middel van X-straal kristallografie die driedimensionele struktuur van TBP opgeklaar en het hulle ook 'n dramatiese verandering in die konformasie van die DNA dubbelheliks aangetoon. Interaksie van die TBP met die 8 bp TATA-volgorde lei daartoe dat die DNA met 'n hoek van 80° gedraai word, sodat die TATA-volgorde die DNA-heliks 110° afwentel. Hierdie afwenteling van die DNA-heliks is waarskynlik die stap wat aanleiding gee tot die volgende stap in die oopmaak van die DNA-heliks in die rigting van die inisiasiepunt, wat dan lei tot die moontlike skeiding van die twee DNA-stringe wat 'n vereiste is vir die inisiasie van transkripsie. Die buiging van die DNA wat veroorsaak word deur die binding van TBP aan die DNA het verder ook tot gevolg dat ander inisiasiefaktore nader aan die lineêre DNA gebring word. Hierdie driedimensionele opklaring van die binding van TBP aan die TATA-motief lei tot heelwat nuwe opwindende moontlikhede vir die opklaring van die driedimensionele struktuur van die pre-inisiasiekompleks.

Soos Klug in sy oorsigartikel (1993) opmerk:

"Whatever the subsequent events in the formation of the TBP complex, there is little doubt that in these changes in the TATA-element we see the opening of the gateway to transcription."

2.2.1.2 AKTIVERINGSVOLGORDE

Aktiveringsvolgordes wat ook as distale promotorelemente beskou word, is oorspronklik gekarakteriseer as *cis*-werkende DNA-elemente wat betrokke is by die aktivering van transkripsie deur RNA-polimerase II en wat van ander reguleringsvolgordes verskil deurdat hulle oriëntasie-onafhanklik kan funksioneer. In 'n oorsigartikel het Serfling *et al.* (1985a) die volgende kriteria vir aktiveringsvolgordes geformuleer:

- * Dit moet die transkripsie van 'n gekoppelde geen vanaf die korrekte inisiasiepunt vir transkripsie sterk aktiveer;
- * dit moet transkripsie onafhanklik van sy oriëntasie aktiveer;
- * dit moet die vermoë hê om oor afstande langer as 1 kb stroom-op of stroom-af van die inisiasiepunt vir transkripsie te funksioneer; en
- * dit moet in die geval waar twee promotors voorkom, die transkripsie van die mees proksimale promotor stimuleer.

Latere ondersoeke het ook aangetoon dat aktiveringsvolgordegebiede bindingsgebiede vir proteïene is en dat hulle betrokke mag wees by beide positiewe en negatiewe regulering van transkripsie. Transkripsionele aktiveringsvolgordes, sowel as die bindingsproteïene wat aan hierdie volgordes bind, speel 'n belangrike rol in die beheer van differensiasie en die ontwikkeling van die eukariotiese organisme sowel as in die regulering van hul metabolisme (Müller *et al.*, 1988; Serfling *et al.*, 1989).

Aktiveringsvolgordes is aanvanklik in SV40-virusse waargeneem, maar later ook in verskeie ander virusse (Banerji *et al.*, 1981). Waarneming van die eerste sellulêre aktiveringsvolgorde in die geen van die immunoglobien-swaarketting het getoon dat aktiveringsvolgordes nie net tot virusse beperk is nie. In die geval van die immunoglobulienaktiveringsvolgorde is aangetoon dat, hoewel aktiveringsvolgordes gewoonlik 100 tot 300 bp stroom-op van die inisiasiepunt vir transkripsie geleë is, dit ook stroom-af binne die promotor kan voorkom. Verder stimuleer die immunoglobulien aktiveringsvolgorde transkripsie volgens 'n seltipe-selspesifisiteit wat waarskynlik 'n rol in die weefselspesifieke uitdrukking van immunoglobuliengene speel (Gough, 1985, Serfling *et al.*, 1985b). In teenstelling met die immunoglobuliengene wat net in β -limfosiete uitgedruk word, vind transkripsie van baie ander gene in verskillende weefsels plaas (Dynam, 1987).

Om te probeer verklaar hoe aktiveringsvolgordes transkripsie oor 'n afstand kan aktiveer, het Ptashne (1986) twee modelle voorgestel, naamlik die lusvormingmodel (Engels: looping model) en die aftasmodel (Engels: scanning model). Die lusvormingmodel berus daarop dat bindingsproteïene van die aktiveringsvolgorde 'n volgorde-onafhanklike interaksie met die bindingsproteïene van die promotor ondergaan om 'n lus te vorm sodat die promotor- en aktiveringsvolgordes bymekaar uitkom. In die geval van die aftasmodel word van die standpunt uitgegaan dat polimerase II aan die aktiveringsvolgorde bind van waar die ensiem dan die DNA tot by die promotor aftas en transkripsie inisieer. Uit data wat sedert die voorstelling van hierdie model bekend geword het, wil dit voorkom asof die lusvormingmodel die mees waarskynlike wyse van aktivering is (Müller en Schaffner, 1990). 'n Soortgelyke voorstel van interaksie tussen die promotor en die aktiveringsvolgorde by die Tipe I kollageengeen is deur Bornstein *et al.* (1988) gemaak en sal in breër trekke in Afdeling 2.3.3.2 bespreek word. 'n Verdere bydrae tot die lusvorming-model as voorkeurmodel, is deur Sharp (1992) gemaak, wat gepostuleer het dat hoewel die presiese teiken van die aktiveringsvolgordebindingsproteïene (Engels: enhancer binding proteïen) nog nie bepaal is nie, die algemene

transkripsiefaktore TFIIB en TFIID sulke teikens is. Die aktiveringsvolgorde-bindingsproteïene wat aan een of meer van hierdie faktore bind, stimuleer dan die binding van die faktore aan die promotors en oorkom dan sodoende die snelheidsbeperkende stap tydens die inisiasie van transkripsie. Lusvorming is ook waargeneem by heelwat prokariotiese sisteme (Schleif, 1987).

In hierdie studie sal daar ook 'n lusvormingmodel voorgestel word om die interaksie tussen die promotor en die eerste intron, waarin die aktiveringsvolgorde geleë is, van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen, aan te dui.

2.2.2 TRANS-WERKENDE ELEMENT

2.2.2.1 TRANSKRIPSIEFAKTORE

Die reguleringspotensiaal van 'n spesifieke geen soos dit bepaal word deur die aard en rangskikking van die bogenoemde *cis*-werkende motiewe, word tot uitdrukking gebring deur die uitkenning van die DNA-motiewe deur *trans*-werkende volgorde-spesifieke DNA-bindingsproteïene. Die bindingsproteïene tree meestal as transkripsiefaktore op. Van die eerste eukariotiese transkripsiefaktore wat geïsoleer en gekarakteriseer is, was teenwoordig in giste. Daar is waargeneem dat die basiese aktivering van transkripsie in die geval van giste en die mens grootliks ooreenstem. So byvoorbeeld bind faktor GCN4 van gis en faktor Ap1 (c-jun) van die mens spesifiek aan dieselfde DNA-volgordes (Wasylyk, 1988). Sedert die isolering van die eerste eukariotiese transkripsiefaktore het daar 'n ontploffing gekom in die isolering en karakterisering van 'n groot verskeidenheid transkripsiefaktore en groei die lys steeds. Om hierdie rede is dit 'n onbegonne taak om elke transkripsiefaktor wat reeds bekend is, in hierdie oorsig te beskryf. Daarom is daar in hierdie literatuuroorsig net gekonsentreer op die drie proteïene wat in hierdie studie gebruik is, naamlik Sp1, Ap1 en Ap2. Inligting oor ander transkripsiefaktore kan in die oorsigartikel van Faisst en Meyer (1992) verkry word. Transkripsiefaktore kan in twee groepe verdeel word, naamlik die algemene faktore en die weefsel-spesifieke faktore.

2.2.2.2

Sp1

Sp1 is een van die algemene faktore en word in 'n groot aantal gene aangetref. Hierdie faktor beskik oor 'n baie losse bindingsvolgorde met 'n konsensusvolgorde wat bestaan uit $5'-\text{G/T/A GGC G/T/A G/T}-3'$ (Faisst en Meyer, 1992). Die isolering en karakterisering van hierdie proteïen is kortliks soos volg:

Gedurende 1982 het McKnight en Kingsbury 'n volgordemotief stroom-op van die verwagte transkripsie-inisiasiepunt vir die timidienkinasegeen (tk-geen) van die Herpes Simplex-virus (HSV) waargeneem. Hierdie motief van tussen 47 en 61 nukleotiede lank, word deur 'n guanosienrykegebied gekenmerk, naamlik $5'-\text{GGGGCGGCGCGG}-3'$. Mutasies in hierdie volgorde het 'n tienvoudige verlaging in transkripsie tot gevolg gehad. In 1983 is hierdie komponent uit HeLa ruwe selekstrakte geïsoleer. Buiten die RNA-polimerase II, is twee ander faktore ook waargeneem. Die een faktor, genoem Sp1, word slegs vir die transkripsie van die Simian-virus 40 (SV40)-promotor nodig, terwyl die tweede faktor, genoem Sp2, 'n algemene faktor vir die selektiewe transkripsie van al die getoetsde promotors is. Sp1 is dus promotorspesifiek. Sp1 is verder ook in selekstrakte wat nie met SV40 geïnfekteer is nie, waargeneem. Dit impliseer dat Sp1 ook by die herkenning van sellulêre promotors betrokke is (Dylan en Tjian, 1983).

In die 21 bp-herhalingsgebied van SV40, 'n belangrike element van die SV40-vroeë promotor, is ses GC-ryke volgordemotiewe waargeneem. Deur middel van DNase I-afskermingsanalise (Engels: footprinting) is afskerming van spesifieke volgordes, wat in beide rigtings voorkom, binne die SV40-promotorgebied waargeneem. Hierdie afskerming kom op dieselfde posisie voor as wat die 21 bp-herhalingsgebied in die SV40-promotor geleë is. Soortgelyke eksperimente met die tk-geen van HSV het twee distale gebiede, maar omgekeerd in volgorde ten opsigte van mekaar, aangetoon. Mutasies in die eerste gebied lei tot 'n gedeeltelike inaktivering van die tweede gebied,

terwyl mutasies in die tweede gebied, binding van Sp1 aan die eerste gebied algeheel inaktiveer. Koöperatiewe interaksie moet dus plaasvind, dit wil sê die tweede bindingsgebied moet eers volledig beset word alvorens aan die eerste bindingsgebied gebind kan word. Sp1-affiniteit is dus sterker vir die tweede bindingsgebied as vir die eerste en maksimale aktivering van transkripsie vind plaas wanneer beide bindingsgebied beset is (Everett *et al.*, 1983; McKnight *et al.*, 1984).

Die ses waargenome Sp1-bindingspunte in die SV40-promotor vertoon verskillende bindingsaffiniteite vir Sp1-binding. Deur middel van DMS-afskermingsanalise is waargeneem dat sterk binding van Sp1 by bindingspunte III en V, gemiddelde binding by II en VI, swak binding by I en baie min binding by IV, plaasvind. Mutasies in bindingspunt V lei egter tot 'n toename in binding van Sp1 aan bindingspunt IV. Geen koöperatiewe binding tussen Sp1-proteïene van naasliggende GC-volgordes is onder hierdie toestande waargeneem nie. Metileringbeskermingseksperimente het bevestig dat daar verskillende onafhanklike bindingspunte vir Sp1 in die SV40 vroeë promotor voorkom. Elk van die ses GC-volgordes is in staat om Sp1 te bind en die affiniteit van Sp1 vir die verskillende GC-volgordes varieër. 'n Moontlike verklaring van die hoë bindingsaffiniteit van bindingspunt V en die swak bindingsaffiniteit van bindingspunt IV, is dat hierdie twee bindingspunte die enigste twee bindingspunte is wat mekaar oorvleuel. Bindingspunt V verhoed waarskynlik as gevolg van steriese hindernisse binding van Sp1 aan bindingspunt IV. Uit verdere eksperimentele resultate wil dit voorkom of daardie Sp1 bindingsgebiede wat proksimaal geleë is ten opsigte van die beginpunt van transkripsie, die grootste invloed op die aktivering van RNA-sintese in beide rigtings het (Gidoni *et al.*, 1984; 1985). Ander voorbeelde van affiniteitsverskille vir binding van Sp1 is in die literatuur beskryf. So neem Jones *et al.* (1985) waar dat twee identiese Sp1-bindingspunte in die tk-geen verskillende bindingsaffiniteite vir Sp1 het. Swakker binding van Sp1 vind aan die gebied naaste aan die TATA-motief plaas. In eksperimente waar die Sp1-bindingsgebiede en die tk-promotorelemente verbind is, het transkripsie aktiwiteit *in vitro*

verhoog. Dit is 'n moontlike aanduiding dat die posisie van die TATA-motief interaksie tussen Sp1 en ander proteïene wat noodsaaklik is vir transkripsionele aktivering, vergemaklik (Dyanan *et al.*, 1985). Net so is die lae Sp1-affiniteitsbindingspunte van die SV40-vroeë promotor ook die naaste aan die TATA-motief geleë. Mutasies in bindingspunt I lei egter tot 'n groter afname in transkripsie-aktiwiteit as wanneer mutasies in die hoë affiniteitsgebiede voorkom. Hieruit wil dit dus voorkom of die swakker binding 'n bepalende stap in die transkripsionele aktivering van die promotors verteenwoordig en dat die spesifieke rangskikking van die bindingspunte tot groter buigsaamheid in die beheer van promotoraktiwiteit aanleiding gee (Jones en Tjian, 1985). In die geval van gene soos die adenosiesdeaminasegeen en die mens insulienreseptorgeen waar geen klassieke TATA- en CCAAT-motiewe voorkom nie, kom egter baie GC-ryke gebiede voor waaraan Sp1 kan bind. Die twee genoemde gene het onderskeidelik vyf en sewe Sp1-bindingsgebiede (Lee *et al.*, 1992, Valerio *et al.*, 1985).

Verskil in die bindingsaffiniteit van Sp1 vir die verskillende Sp1-bindingsgebiede word ook in ander gene aangetref. Een van hierdie gene is die HSV-onmiddellik vroeë promotor (ICP-4). Hierdie geen beskik selfs oor 'n perfekte konsensus Sp1-bindingsgebied, waaraan Sp1 nie bind nie. In die HSV-promotor se korterhalingsgebied is agt Sp1-bindingspunte waargeneem. Hierdie punte kom egter meer verspreid voor as die ses Sp1-bindingspunte van die SV40-vroeë promotor. Die Sp1-bindingspunte in die HSV-promotor kom in albei oriëntasies voor en elkeen bedek 18 tot 20 bp wat gesentreerd is om 'n enkele GC-volgorde, onafhanklik van die bindingspunt se oriëntasie. Aangesien nie alle Sp1-bindingsgebiede deur Sp1 herken word nie, impliseer dit dat die GGGCGG-volgorde *per se* nie genoeg is om 'n herkenningspunt vir Sp1 te bepaal nie. Op grond van 'n vergelyking van die volgordes van verskillende Sp1-gebiede is die volgende Sp1-herkenningsvolgorde soortgelyk aan die van Faisst en Meyer (1992) voorgestel, naamlik:



(Briggs *et al.*, 1986; Jones en Tjian, 1985). Samevattend kan gesê word dat die volgorde van die Sp1-bindingsgebiede geen palindroom bevat nie en opmerklik assimetries in basesamestelling is. Die Sp1-bindingsgebiede in die HIVirus, naamlik bindingsgebiede I en III, was die eerste gekarakteriseerde Sp1-bindingsgebiede wat van die konsensusvolgorde 5'-GGGCGG-3' afgewyk het, naamlik:

I = 5'-GGGAGT-3' en

III = 5'-AGGCGT-3'.

(Jones *et al.*, 1986)

Gedurende 1986 is Sp1 met behulp van affiniteitschromatografie in 'n suiwer vorm geïsoleer en met behulp van SDS-gelelektroforetiese analise as twee prominente polipeptiedspesies van 95 en 105 kd waargeneem. Minder prominente polipeptiede met groottes van 109, 110, 115 en 90 kd is ook waargeneem. Die twee prominente Sp1-spesies ontstaan as gevolg van 'n verskil in fosforilering van 'n enkele proteïen. Eksperimenteel is vasgestel dat Sp1 tydens binding aan die GC-volgorde van die DNA verskeie kere in die selkern deur dubbelstring DNA-afhanklike kinase gefosforileer word. Hierdie kinase gebruik DNA as ko-faktor. Sp1 word *in vivo* en *in vitro* hoofsaaklik op die serien-residue deur kinase gefosforileer. Dit is egter onwaarskynlik dat die binding van Sp1 deur fosforilering nadelig beïnvloed word, aangesien gefosforileerde en nie-gefosforileerde derivate van Sp1 *in vitro* identiese DNA-bindingseienskappe vertoon (Kadonaga en Tjian, 1986, Jackson *et al.*, 1990).

Uit eksperimentele gegewens by muis waar die Sp1-geen op chromosoom 15 gelokaliseer is, is aangetoon dat Sp1 nie net 'n algemene transkripsiefaktor is nie, maar ook 'n reguleringsrol speel in sellulêre prosesse gedurende ontwikkeling en differensiasie. Daar is bevind dat die vlakke van Sp1-uitdrukking verskil in verskillende seltepes gedurende die ontwikkeling van die muis. Goed ontwikkelde ten volle gedifferensieerde selle met gespesialiseerde

funksies toon die laagste Sp1-uitdrukking, terwyl die hoogste Sp1-uitdrukking in hemapoëtiese en fetale selle voorkom, asook in spermatiede (Saffer *et al.*, 1991).

Eksperimentele ondersoeke na die Sp1-proteïene het die volgende data gelewer: Uit 'n gedeeltelike cDNA van Sp1 wat vir 696 C-terminaalgeleë-aminosuurresidue kodeer, kon die samestelling van die Sp1 proteïen afgelei word. Daar is waargeneem dat drie aangrensende Zn(II)-vingerstrukture in Sp1 voorkom. Hierdie strukture is homoloog aan die herhalingsmotief wat eerste by faktor TFIIA beskryf is. Ook is waargeneem dat die volgorde-spesifieke DNA-bindingsaktiwiteit van Sp1, Zn(II) benodig. Die posisie van die bindingsdomein van die Sp1-proteïen is ook geïdentifiseer. Die drie Zn(II)-vingers wat naby aan die C-terminus geleë is, het 'n algemene vorm van Cys-X_{2,4}-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X₃-His. Die twee Cys- en His-residue koördineer moontlik 'n Zn(II)-ioon om 'n metalloproteïenstruktuur te vorm wat met die DNA kan reageer. Deur middel van mutasie-eksperimente is aangetoon dat die Zn(II)-vingers vir die volgorde-spesifieke DNA-binding verantwoordelik is (Kadonaga *et al.*, 1987, 1988). 'n Verdere vier domeine wat noodsaaklik is vir transkripsionele aktivering, is ook waargeneem. Domein B en moontlik ook domein A, beslaan die glutamienryke gebied aan die N-terminalekant van Sp1. Die serien-treonienryke gebied sowel as die 0-gebonde N-asetielglukosamienresidue vertoon daarteenoor geen transkripsionele funksie nie, maar is 'n moontlike gebied van modifisering. Domeine C en D is buite die DNA-bindingsdomein geleë. Domein C beslaan 'n gebied van hooggelaaide digtheid, terwyl domein D in samewerking met die ander drie domeine, naamlik A, B, C, optree. 'n Verdere ondersoek na die glutamienryke domein in Sp1 het aan die lig gebring dat Sp1-Sp1-interaksie 'n belangrike rol in die modulering van promotoraktiwiteit speel deurdat distaal- en proksimaalgebonde Sp1 kan bydra tot transkripsiestimulering. 'n Interessante waarneming is dat Sp1 blykbaar nie koöperatief aan naasliggende punte bind nie, soos wat verwag sou word wanneer naasliggend gebonde monomere met mekaar in wisselwerking tree. Dit is moontlik dat monomere

wat gebonde is aan naasliggende punte steries verhinder word om met mekaar kontak te maak. Alternatiewelik is dit moontlik dat die vrye energie van die interaksie nie groot genoeg is om die DNA-proteïenkompleks betekenisvol te stabiliseer nie (Courey *et al.*, 1989; Courey en Tjian, 1988; Mermod *et al.*, 1989).

Terwyl Zn(II)-vingers verantwoordelik is vir die volgorde-spesifieke DNA-binding, reguleer 'n afsonderlike domein van die proteïen die affiniteit van die Sp1-binding aan die DNA. Twee moontlike meganismes vir bindingsaffiniteit is voorgestel:

- * As gevolg van 'n entropie-effek kan multimere van Sp1 met hoër affiniteit as monomere, koöperatief aan die DNA bind; of
- * as gevolg van 'n entalpie-effek kan 'n proteïen-proteïeninteraksie tussen 'n Sp1-gebied en die Zn(II)-vingers die sterkte van die binding van die vingers aan die DNA beïnvloed.

Die voorgestelde hipotese is dat Sp1 'n gebied bevat wat transkripsie deur RNA-polimerase II stimuleer met behulp van 'n meganisme waarin negatiefge-laaide aminosure nie benodig word nie. Dit skep die moontlikheid van 'n nuwe tipe aktiveringsdomein (Kadonaga *et al.*, 1988).

Selfassosiasie van Sp1 is tydens elektronmikroskopiese ondersoeke waargeneem. Hierdie selfassosiasie is egter afhanklik van die teenwoordigheid van die glutamienryke gebied aan die N-terminalekant van Sp1 geleë. DNA-segmente op 'n redelike groot afstand van mekaar kan sodoende met mekaar verbind word. Selfassosiasie tussen twee Sp1-bindingsgebiede 1,8 kb van mekaar geleë is by die tk-promotor waargeneem. Ook in die geval van die E2-proteïen van beespapilomavirus (BPV) is DNA-lusvorming (Engels: looping) as gevolg van Sp1-selfassosiasie met behulp van die elektronmikroskoop waargeneem. Hierdie gegewens toon dat DNA-lusvorming afhanklik

is van die proteïen-proteïeninteraksie en word deur die Sp1-domein wat noodsaaklik is vir transkripsionele aktivering, gespesifiseer (Li *et al.*, 1991; Su *et al.*, 1991).

2.2.2.3 Ap1

Soos Sp1 word Ap1 ook as 'n algemene transkripsiefaktor beskou. In teenstelling met die losse konsensusvolgorde van Sp1, is die konsensusvolgorde vir Ap1 baie meer beperk. Volgens Faisst en Meyer (1992) is die konsensusvolgorde vir Ap1 TGA^G/C^T/A. Ap1 is oorspronklik in 1987 deur Lee *et al.* (b) in HeLa-selle geïdentifiseer as 'n sellulêre DNA-bindingsproteïen. Hierdie geïdentifiseerde faktor het oor die vermoë beskik om interaksie te ondergaan met aktiveringsvolgordes in die mens MT IIA-geen sowel as die aktiveringsvolgordes in die SV40-vroeë promotorgeen. Gene soos die mens MT IIA, SV40 en kollagenase-gene word deur forbolesters soos TPA (12-O-tetra-dekanoïekoforbol-13-asetaat) transkripsioneel geïnduseer. Ap1-bindingsgebiede is in 'n aantal promotors geïnduseer deur TPA en wil dit dus voorkom of Ap1, TPA respons reguleer. Die meganisme waarvolgens hierdie regulering plaasvind, is waarskynlik deur die aktivering van proteïen-kinase C wat deur TPA geaktiveer word. Deur hierdie aksie van TPA neem die fosforileringsstoestand van Ap1 dan toe (Hurst en Jones, 1987; Lee *et al.*, 1987a). Gedurende 1987 het Lee *et al.* (a) ook daarin geslaag om Ap1 met behulp van volgorde-spesifieke DNA affiniteitschromatografie in 'n suiwer vorm van meer as 95% uit HeLa-selle te isoleer. Verskillende polipeptiedspesies is verkry, waarvan die hoofkomponent 47 kd is. Van die ander polipeptiedspesies is later as c-jun proto-onkogeneprodukte en fos-produkte geïdentifiseer (Angel *et al.*, 1988; Bos *et al.*, 1988; Curran *et al.*, 1987).

Volgordebepalings het aangetoon dat verskeie gedeeltes van die Ap1-peptied identies is aan die voorspelde aminosuurvolgorde van v-jun. Ap1 bestaan egter uit 'n kompleks proteïene, waarvan heelwat van die proteïene se volgordes nie met jun ooreenkom nie. Derhalwe kan jun dus slegs as een van

die baie proteïene wat tot die Ap1-aktiwiteit bydra, beskou word en nie as Ap1 self nie. Nog 'n proteïen wat betrokke is by Ap1, is die produk van die c-fos onkogene, naamlik fos. Franza *et al.* (1988) het waargeneem dat fos-komplekse asook fos-verwante antigene 'n groep induseerbare sellulêre proteïene verteenwoordig wat oor die vermoë beskik om Ap1-bevattende gene se uitdrukking te beheer.

Verskeie ander proteïene wat verwant of homolog is aan Ap1 is reeds geïsoleer en gekarakteriseer. Hieronder is die gisfaktor GCN4 wat 'n gekonserveerde domein met fos en v-jun deel waaraan Ap1 koöperatief kan bind (Rauscher *et al.*, 1988b), PEA 1 is 'n muisfaktor wat homolog is aan Ap1 en c-jun (Wasylyk *et al.*, 1988) en junB en junD wat deur afsonderlike gene gekodeer word, maar verwant is aan c-jun en aan dieselfde volgorde as c-jun/Ap1 bind (Ryder en Nathans, 1988; Ryder *et al.*, 1989). Al die genoemde proteïene is waarskynlik verwante lede van 'n multigene familie van transkripsiefaktore. Die gebruik van een DNA-bindingselement deur verskillende faktore kom meer dikwels in eukariotiese transkripsie na vore. So is daar byvoorbeeld ook meer as drie verskillende CBP (CCAAT-bindingsproteïene) wat aan die CCAAT-volgorde kan bind (Chodosh *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1988). Verskeie transkripsionele effekte kan dus deur 'n enkele herkenningsgebied gereguleer word. Nog 'n sellulêre transkripsiefaktor, ATF, verskil in sy konsensusvolgorde met slegs een nukleotied van die Ap1 konsensusvolgorde. Verskeie eksperimente het aangetoon dat ATF en Ap1 egter twee verskillende proteïene is, hoewel hulle antigenies verwant is. Die immunologiese kruisreaksie tussen Ap1 en ATF toon dat die twee proteïene dieselfde aminosuurvolgorde het en dat hulle waarskynlik hul oorsprong vanuit 'n gemeenskaplike geen het (Hai *et al.*, 1988). 'n Relatief groot gedeelte van die c-jun/Ap1 sellulêre poel is baie nou geassosieer met fos. Fos bind nie direk aan die DNA nie, maar ondergaan interaksie met Ap1. Fos bestaan as 'n deel van 'n kernkompleks wat 'n proteïen van 39 kd bevat, wat ook weer 'n produk van die jun proto-onkogene is. Die medesuiwering van fos met Ap1 kan dus toegeskryf word aan die proteïen-proteïen-

kompleks wat tussen fos en jun gevorm word (Franza *et al.*, 1988; Rauscher *et al.*, 1988a). Deur die assosiasie met jun/Ap1 verhoog fos die vermoë van jun/Ap1 om Ap1-responsiewe gene te stimuleer (Chiu *et al.*, 1988). Fos en jun vorm heterodimere wat met 'n hoër affiniteit aan die Ap1 herkenningsgebied as jun-homodimere bind. Jun kan termostabiele homodimere vorm wat deur fos monomere onderbreek word om hierdie fos-jun heterodimere te vorm. Fos en jun ondergaan interaksie met mekaar deur spesifieke strukture wat in beide proteïene teenwoordig is. Hierdie spesifieke strukture staan as leusien-zippers bekend. Die twee proteïene tesame met GCN4 behoort aan 'n groeiende familie transkripsiefaktore wat oor 'n gekonserveerde DNA-bindingsdomein beskik. Hierdie bindingsdomein is uit twee strukture saamgestel, naamlik 'n basiese motief wat direk aan die DNA bind en die leusien-ripper, wat 'n dimeriseringsinterfase gee. Die leusien-ripper word beskou as 'n α -heliksgebied wat 'n herhaling van leusien-residue in elke sewende posisie bevat, vir agt heliksdraaie. Die leusiensykettings van die een α -heliks voeg dan deur vingervorming in met die van 'n ander α -heliks van 'n tweede polipeptied sodat dimerisering plaasvind (Landschulz *et al.*, 1988). Beide die fos en jun leusien-ripperdomeine is nodig vir die heterodimeervorming. Mutasies in die eerste leusien van fos en jun leusien-ripperdomeine het egter geen effek op hierdie heterodimeervorming nie, maar speel wel 'n rol in DNA-binding (Ransone *et al.*, 1989). Die verskillende bindingsaffiniteite van GCN4, fos en jun vir die DNA-bindingsgebied is waarskynlik as gevolg van die verskil in hetero- of homodimeriseringskapasiteit van die onderskeie leusien-ripperdomeine. Die leusien-ripper beheer die tipe proteïenkompleks wat met die bindingselement assosieer asook die regulering van die geenuitdrukking (Kouzarides en Ziff, 1989).

Die DNA-bindingsdomein soos dit by c-jun voorkom, is op die karboksiel-terminale helfte van die proteïen gelokaliseer. Hierdie gedeelte is ryk aan basiese aminosuur-residue. Op die amino-terminale helfte van die proteïen is weer die transkripsionele aktiveringsdomein A1, A2 en die negatiewe reguleringsgebied geleë (Bohmann en Tjian 1989).

Verskeie promotors wat oor Ap1-bindingsgebiede beskik, benodig buiten Ap1 nog 'n ander element vir die transkripsionele respons wat karakteristiek aan endogene geenuitdrukking is. So byvoorbeeld is daar ook in heelwat gevalle Ap4-volgordes wat met die Ap1-volgordes oorvleuel en sodoende tot gevolg het dat Ap4 en Ap1 tesame funksioneer om die transkripsie van verskeie promotors te aktiveer. Dit is moontlik dat die samewerking van Ap1 met 'n ander element 'n algemene meganisme is waarvolgens Ap1-volgordes gereguleer word om spesifiek en maksimaal op verskeie stimuli te reageer (Mermod *et al.*, 1988; Sirum-Connolly en Brinckerhoff, 1991).

Die Ap1 proteïen wat in hierdie studie gebruik is, is die mens c-jun-proteïen met 'n molekulêre massa net effens groter as 40 kd, soos waargeneem in 'n komasieblou gekleurde poli-akrielamiedgel, (Promega Technical note) en is van Promega Corporation aangekoop.

2.2.2.4 Ap2

In teenstelling met Sp1 en Ap1, is Ap2 nie 'n algemene faktor nie. Ap2 kom in oorvloed in die neurale "*crest*"-selle voor. In 1987 het beide Imagawa *et al.* sowel as Mitchell *et al.*, Ap2 uit HeLa-selle geïsoleer en gesuiwer. Eersgenoemde groep het 'n polipeptied van 50 kd geïsoleer, terwyl die groep van Mitchell 'n polipeptied van 52 kd geïsoleer het. Daar is waargeneem dat Ap2 spesifiek aan *cis*-elemente in die SV40 en mens MT-IIa aktiveringsvolgordes kan bind. Ander sellulêre gene soos die mens-groeihormoon, c-myc en H-2K^b sowel as die BPV beskik ook oor Ap2-bindingsgebiede (Mitchell *et al.*, 1987).

'n Uitstaande kenmerk van Ap2 wat waargeneem is, is dat dit selspesifiek is, byvoorbeeld Ap2 kom wel in HeLa-selle voor, maar word glad nie in HepG2-selle aangetref nie. Net soos Ap1 word die aktiwiteit van Ap2 verhoog in selle wat met forbolesters behandel is. Ap2-aktiwiteit neem egter ook toe na behandeling van die selle met cAMP. Aktivering van transkripsie deur Ap2

vind dus langs ten minste twee seintransduksieweë plaas. Die effek van forbolesters is dus nie uniek aan Ap1 nie, want dit is waargeneem dat die werking van ander faktore buiten Ap2, soos Ap3 en NF-kB, ook deur forbolesters beïnvloed word. Laasgenoemde toon aan dat daar dus 'n moontlikheid bestaan dat aktivering deur proteïenkinase C 'n algemene wyse van regulering is vir die aktiveringsvolgordebindingsfaktore (Imagawa *et al.*, 1987).

Die Ap2 wat uit HeLa-selle gesuiwer is, herken 'n konsensusvolgorde van 5'-CCCCAGGC-3' en die opbrengs van hierdie proteïen is na suiwing soortgelyk aan dié van Ap1, wat daarop dui dat die twee proteïene rofweg in dieselfde hoeveelhede in die HeLa-selle voorkom. Retinoësuur, die suurvorm van vitamien A, stimuleer die uitdrukking van Ap2-mRNA na geïnduseerde differensiasie in mens NT2 teratokarsinomaselle. Hierdie verhoging in mRNA-sintese is egter relatief kort van duur en is die gevolg van 'n verhoging in die transkripsietempo en nie as gevolg van verhoogde post-transkripsionele hoeveelhede nie (Lüscher *et al.*, 1989). Mitchell *et al.* (1991) het ook waargeneem dat die Ap2-mRNA-vlakke tydelik tydens muisembriogenese gereguleer word. Die hoogste vlakke van Ap2-uitdrukking kom na elf en 'n half dae na embriogenese voor in die vroeë neurale "*crest*"-selle waarna die uitdrukking geleidelik afneem. Die voorkoms van Ap2 in hierdie neurale "*crest*"-selle stel voor dat Ap2 'n rol in verdere differensiasie en ontwikkeling speel.

In verskeie studies is waargeneem dat Ap2 verplaas word van sy DNA-herkenningsvolgorde deur kompetisie met aangrensende DNA-bindingsproteïene. Die SV40-aktiveringsvolgorde beskik oor oorvleuelende Ap3- en Ap2-bindingsmotiewe. Binding van Ap2 aan hierdie volgordes vind egter slegs plaas indien Ap3 geïnaktiveer word. Net so word by die mens-groeihormoon-geen twee oorvleuelende DNA-bindingselemente vir Ap2 en NF1 waargeneem. Hoewel elk van hierdie bindingselemente met een nukleotied van die NF1 en Ap2 konsensusvolgorde verskil, vind binding van NF1 en Ap2 wel

plaas. Ap2 bind egter slegs indien NF1 geïnaktiveer word. Oorvleueling van verskeie bindingsfaktore kan dus 'n bydraende faktor tot selspesifisiteit wees (Courtois *et al.*, 1990; Mercurio en Karin, 1989). In die 21 bp-gebied van die SV40-vroeë promotor word Sp1- en Ap2-bindingspunte ook aangrensend en oorvleuelend tot mekaar aangetref. In hierdie geval vind daar egter geen inhibering van Ap2 binding plaas nie, maar kom versterking van die afskermingsgebied voor tydens DNase I-afskermingsanalise indien beide proteïene teenwoordig is. Die ligging van die Sp1- en Ap2-bindingspunte fassiliteer waarskynlik die interaksie tussen hierdie twee proteïene, waardeur Ap2 waarskynlik die stabiele binding van Sp1 aan die DNA-bindingsgebied verhoog (Mitchell *et al.*, 1987). Inhibisie van Ap2-binding is in die teenwoordigheid van die SV40 TAg waargeneem. Selfs by die mens MT-IIa-geen vind inhibisie van Ap2 in die teenwoordigheid van TAg plaas, hoewel geen inhibisie van Sp1 egter voorkom nie. Die inhibisie van Ap2 deur die TAg is waarskynlik as gevolg van 'n proteïen-proteïeninteraksie wat tussen Ap2 en die TAg plaasvind, sodat 'n kompleks gevorm word. Die Ap2 in hierdie kompleks kan egter nie die DNA-bindingsgebied herken nie. (Mitchell *et al.*, 1987).

'n Mens cDNA-kloon wat die totale koderende gebied van Ap2 bevat, is in 1988 deur Williams *et al.* geïsoleer en gekarakteriseer. Geen domein wat met reeds geïdentifiseerde DNA-bindingsdomeine ooreenkom, kon egter waargeneem word nie. Die voorgestelde sekondêre struktuur van die karboksie-terminale helfte van die proteïen vertoon egter 'n α -heliks wat verwant aan die heliks-draai-helix DNA-bindingsmotief van die γ -repressor en Cro-proteïene is. Die tweehonderd aminosure naaste aan die karboksi-terminale punt van die proteïen is vir die volgorde-spesifieke DNA-binding verantwoordelik. Verskeie eksperimentele data het aangetoon dat die Ap2-bindingsvolgorde uit 'n palindromiese volgorde van GCCN₃CCG bestaan en dat die aangrensende volgordes ook 'n rol in die vorming van funksionele bindingspunte speel. Die feit dat Ap2 aan 'n palindroomvolgorde bind en 'n groot gebied van binding benodig, het die vermoede laat ontstaan dat Ap2 'n multimeer is. Bewyse is

dan ook gevind dat Ap2 dimerisering moet ondergaan alvorens DNA-binding kan plaasvind. Die aminosuurvolgordes geleë tussen aminosuur 278 en 409 is vir hierdie dimerisering verantwoordelik. Hierdie dimeriseringsdomein is dus binne-in die DNA-bindingsdomein geleë en vorm 'n integrale deel van die DNA-bindingsdomein. Die totale organisasie van die Ap2 se DNA-bindingsdomein herinner sterk aan dié van die leusien-zipper en heliks-lus-heliksproteïene, waar 'n basiese gebied in assosiasie met aangrensende dimeriseringsdomeine stabiele DNA-kontak reguleer. Die Ap2 se dimeriseringsdomein beskik egter nie oor leusienherhalings nie en het ook geen homologie met die heliks-lus-heliksmotief nie. Verder is die dimeriseringsdomein bykans twee keer langer as dié van die ander domeine. Williams en Tjian (1991) stel voor dat Ap2 'n nuwe bindingstruktuur het, genaamd die heliks-span-heliksstruktuur. Hulle stel ook voor dat die Ap2-aktiwiteit moontlik gereguleer kan word deur die assosiasie met 'n ander proteïen wat ook 'n heliks-span-heliksmotief bevat. Die aminosuurvolgorde van Ap2 bevat ook 'n 22% glutamienryke gebied wat tussen aminosuur 63 en 103 geleë is en wat met 'n 30% prolienryke gebied vanaf aminosuur 38 tot 97 oorvleuel. Dit is waarskynlik dat die glutamienryke gebied transkripsie met 'n soortgelyke meganisme as in die geval van Sp1 sal aktiveer, terwyl die prolienryke gebied by veral CTF/NF1-faktor ook bekend is dat dié gebied deel van die transkripsionele aktiveringsdomein is. Transkripsionele aktivering van Ap2 steun dus op twee duidelike dele van die proteïen, naamlik die karboksi-terminale DNA-bindingsdomein en die amino-terminale glutamien- en prolienryke volgordes (Williams *et al.*, 1988; Williams en Tjian, 1991).

2.2.3 STRUKTUUR VAN TRANSKRIPSIEFAKTORE

Elk van die DNA-bindingsproteïene beskik oor basiese strukturele motiewe wat die proteïen die vermoë gee om spesifiek aan 'n bepaalde DNA-volgorde te bind. Die teenwoordigheid van hierdie strukturele motiewe in die proteïenstruktuur is egter nie 'n waarborg dat dit vir DNA-binding gebruik gaan word nie. Heelwat ander faktore

speel ook 'n rol, soos byvoorbeeld die teenwoordigheid of afwesigheid van effektormolekules (Brennan en Matthews, 1989).

Opklaring van die proteïenstrukture van die transkripsiefaktore toon dat bykans 80% van die transkripsiefaktore in drie proteïenfamilies ingedeel kan word. Waar prokariotiese transkripsiefaktore meestal oor die heliks-draai-heliksmotief beskik, word die eukariotiese transkripsiefaktore oor die algemeen in die Zn-vinger, leusien-zipper en heliks-lus-heliks families ingedeel. Die heliks-draai-heliksmotief word gekarakteriseer deur twee opeenvolgende α -helikse wat langs mekaar geposisioneer is deur 'n draai van 90° en uit vier aminosure bestaan. Tydens dimerisering vind rangskikking sodanig plaas dat een α -heliks van elke monomeer opeenvolgend in die groot groef van die DNA pas. Hierdie struktuur kom veral voor by geen-aktiveerder en repressorproteïene van bakterieë (Landschulz *et al.*, 1988).

Die Zn-vingermotief is reeds tydens die bespreking van Sp1 (Afdeling 2.2.2.2) bespreek. Die eerste Zn-vingerstruktuur is by die metalloproteïen TFIIA waargeneem. Die aminosuurvolgorde van hierdie proteïen bevat 'n herhalende motief van twee nabygeleë Cys-residue, gevolg deur twee His-residue. Die motief Cys-N₂-Cys-N₁₂-His-N₃-His word nege keer in die primêre aminosuurvolgorde herhaal. Elke herhaling sonder dan 'n enkele Zn-ioon af via tetrahedriese koördinasie met behulp van die ruimtelik gekonserveerde Cys- en His-residue. Die twaalf tot veertien aminosure wat tussen die Cys- en His-residue geleë is, sal dan uitstulpings vorm wat bekend staan as Zn-vingers. Zn-vingermotiewe by ander proteïene soos byvoorbeeld die hormoonreseptor en gis-geenregulerende proteïene bevat op hul beurt weer slegs vier tot ses Cys-residue en slegs twee tot vier aminosure is tussen die Cys- en His-residue geleë (Johnson en McKnight, 1989; Landschulz *et al.*, 1988). 'n Tweede familie proteïene wat 'n tipe Zn-vingermotief bevat is onlangs geïdentifiseer. In hierdie gevalle staan die Zn-vingermotief egter as ringvingers bekend en word dit gekarakteriseer deur CysX₂CysX₉₋₂-CysXHisX₂CysX₂CysX₆₋₁₇CysX₂Cys, waar X ekwivalent is aan enige aminosuur. Heelwat van die proteïene wat oor die ringvingermotief beskik, bevat nog 'n tweede ekstra Cys-His-domein sowat 39 aminosure stroom-op van die ringvinger en staan as die B-motief bekend. Faktore

wat hierdie ringvinger en B-motief bevat is onder meer betrokke by die HIV LTR en by Rpt-1, 'n negatiewe reguleerder van die IL2-reseptorgeen (Reddy en Etkin, 1992).

Die leusien-zippermotief is reeds tydens die bespreking van Ap1 (Afdeling 2.2.2.3) bespreek. Kortliks bestaan die motief uit 'n herhaling van Leu-residue. Die eerste Leu-zipper is waargeneem in C/EBP, 'n hittestabiele rotlewer kernproteïen. By C/EBP kom Leu in elke sewende posisie in 35 aminosure voor. Die Leu steek uit die α -heliks as sykettings uit en voeg tydens dimerisering soos hand- of vingervorms in die Leu-sykettings van 'n tweede α -heliks in sodat 'n stabiele nie-kovalente binding gevorm word. Die opvatting is dat die Leu-zipper nie net tot DNA-proteïeninteraksie beperk is nie, maar ook aangepas word om proteïen-proteïeninteraksies te ondergaan. Die Leu-zipper se dimeriseringsmotief word verder ook voorafgegaan deur 'n basiese gebied en beide die basiese gebied en die Leu-zipperdomein is noodsaaklik tydens DNA-binding. Die aminosuur-residue wat tussen die Leu-residue geleë is en wat hidrofobies van aard is, help met die stabilisering van die struktuur tydens dimerisering (Johnson en McKnight, 1989; Jones, 1990; Landschulz *et al.*, 1988).

Ander proteïenstrukture is ook waargeneem, soos byvoorbeeld die heliks-span-heliksstruktuur soos by Ap2 (Afdeling 2.2.2.4), die homeodomein, gespletekop-domein en POU-spesifieke domein (Faisst en Meyer, 1992). Hierdie strukture kom egter in 'n beperkte getal voor. Daar is egter nog heelwat transkripsiefaktore waarvan die proteïenstruktuur nog nie opgeklaar is nie en wat dalk nog onder hierdie minder bekende strukture ressorteer of selfs nuwe strukture mag hê. Soos waargeneem kan word uit die voorafgaande beskrywing van die drie transkripsiefaktore Sp1, Ap1 en Ap2, sou dit beslis 'n onbegonne taak wees om al die ander transkripsiefaktore te bespreek.

Volgens Travers (1989) bevat die struktuur van die DNA self ook twee belangrike aspekte wat die spesifieke interaksie met die DNA-bindingsproteïene bepaal:

- * Die proteïene kan benewens die direkte interaksie met individuele basepare ook die strukturele kenmerke van die dubbelheliks in die algemeen en plaaslik herken as gevolg van die volgorde-afhanklike polimorfismes van die DNA; en

- * die aanpasbare buigsaamheid van die DNA word gedurende interaksies met die proteïene gebruik om ensimatiese manipulasies te bevorder sowel as 'n goeie passing toe te laat tussen die proteïenoppervlak en die DNA dubbelheliks.

2.3 KOLLAGEEN

2.3.1 INLEIDING

Kollagene is 'n familie van verwante proteïene wat uit meer as dertien verskillende tipes bestaan wat in twee kategorieë verdeel kan word. Hierdie twee kategorieë is die fibrillekollagene wat uit tipes I, II, III, V, VI, VII, X en XI bestaan en die nie-fibrillekollagene. 'n Kenmerk van kollagene is dat die sentrale tripelheliese domein uit 'n tripeptiedvolgorde Gly-X-Y saamgestel is, waar X in baie gevalle 'n proliesresidu en Y 'n hidroksiproliesresidu is. Die onderskeid tussen die fibrille- en nie-fibrillekollagene is dat die tripelheliese gedeelte van die fibrillekollagene kontinu of minimaal onderbroke is, teenoor die tripelheliese gedeelte van die nie-fibrillekollagene wat veelvoudige onderbrekings het (Bornstein en Sage, 1989).

Die mees algemene fibrillekollagene is Tipe I, II en III. Tipe I kollageen kom baie algemeen in die liggaam voor en is 'n strukturele proteïen wat veral in vel, been en tendons aangetref word. Tipe III word gewoonlik met Tipe I geassosieer, maar kom in kleiner hoeveelhede as Tipe I voor. Tipe III kollageen word ook in die aorta en ander slagare aangetref. Tipe II kollageen weer is kenmerkend van veral kraakbeen, maar word ook in die oog en kortstondig in verskeie weefsels gedurende embrioniese ontwikkeling aangetref. Afwykings in hierdie drie kollagene kan lei tot siektetoestande soos Osteogenesis Imperfecta (beenafwykings); Ehlers Danlos-sindroom (vel- en gewrigsafwykings); Marfan-sindroom (slagaarafwykings) en chondrodistrofieë (afwykings in kraakbeenontwikkeling) (Cheah, 1985).

Kollagene word eers as voorlopers, bekend as prokollagene gesintetiseer, waarna hierdie prokollagene deur ensiematiese splyting en gevolglike verwydering van die C- en N- terminale propeptiede tot die ooreenkomstige kollagene omvorm word. Tipe I prokollageen is uit twee identiese pro- α 1(I) en een pro- α 2(I) polipeptiedkettings saamgestel. Daarteenoor is Tipe II en Tipe III prokollagene uit drie pro- α 1(II) en drie pro- α 1(III) polipeptiedkettings onderskeidelik saamgestel, waar die pro- α 1(I), pro- α 1(II) en pro- α 1(III)-kettings almal verskillend van mekaar is. Elk van die vier gene word op verskillende chromosome aangetref, naamlik die pro- α 1(I)-geen op chromosoom 17 (q21-22), die pro- α 1(II)-geen op chromosoom 12 (q13.1-13.2) en die pro- α 1(III)-geen op chromosoom 2 (q24.3-31) (Bornstein en Sage, 1989; Ramirez *et al.*, 1985).

2.3.2 GEENSTRUKTUUR

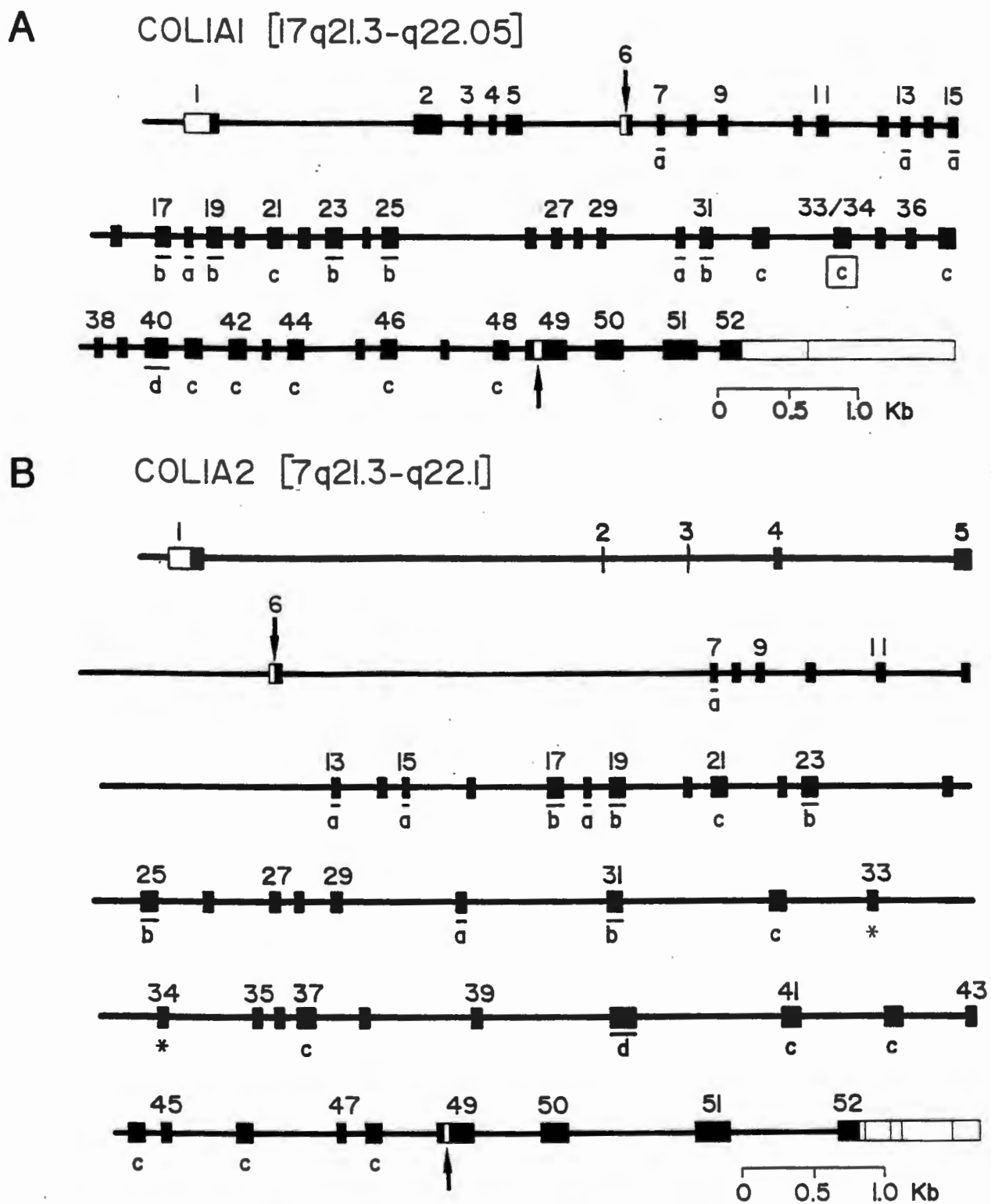
Die eerste kollageengeen wat gekloneer is, is die hoender pro- α 2(I)-geen wat intensief deur veral twee groepe, naamlik dié van De Crombrughe (Sobel *et al.*, 1978) en die van Boedtker (Lehrach *et al.*, 1978) bestudeer is. In 1984 is die eerste mens kollageengeen, naamlik die pro- α 1(I)-geen deur Chu *et al.* gekloneer en gekarakteriseer. Organisasie van die pro- α 2(I)-geen is eers in 1987 deur De Wet *et al.* (1987) volledig beskryf. Ekson-intronstrukture is met behulp van R-lusanalise en elektronmikroskopie geanaliseer (De Wet, 1987). In hierdie ondersoek is bevind dat die mens pro- α 1(I)-geen 51 eksone en die mens pro- α 2(I)-geen 52 eksone bevat. Latere navorsing het getoon dat die fibrillekollagene bykans almal uit $\pm$ 52 eksone saamgestel is. Die 51 eksone van die pro- α 1(I)-geen is die gevolg daarvan dat eksone 33 en 34, anders as in die geval van die ander gene, tot een ekson versmelt is. In die geval van Tipe III kollageen is ekson 3 en ekson 4 weer tot een ekson versmelt, terwyl Tipe II oor twee eksone meer beskik wat vir die N-terminale domein kodeer. Elk van die drie kollageentipes se tripelheliese domein word egter deur presies 42 eksone gekodeer, waarvan elke ekson met 'n volledige Gly-kodon begin. Die grootte van die eksone wissel in veelvoude van 54 bp of 'n kombinasie van 54 bp en 45 bp. Aangesien elke ekson met 'n volledige glisienkodon begin, kodeer die eksone dus vir

'n diskrete getal Gly-X-Y eenhede. (Ramirez *et al.*, 1985; Vuorio en De Crombrughe, 1990). 'n Voorstelling van die ekson-intronstruktuur van die mens pro- α 1(I)-geen (Paneel A) en die mens pro- α 2(I)-geen (Paneel B) word in Figuur 2.1 gegee.

Hoewel die pro- α 1(I)-geen 18 kb lank is teenoor die 38 kb van die pro- α 2(I)-geen, is die koderingsvolgorde van die pro- α 1(I)-geen langer as dié van die pro- α 2(I)-geen, naamlik 4329 bp teenoor 4095 bp. Die intronstruktuur van die pro- α 2(I)-geen is heelwat langer as die ooreenstemmende intronstruktuur van die pro- α 1(I)-geen en beslaan ongeveer 90% van die geen teenoor die 70% van die pro- α 1(I)-geen (Chu *et al.*, 1984; Ramirez *et al.*, 1985). Die pro- α 1(I)-, pro- α 1(II)- en pro- α 1(III)-gene stem grootliks ooreen ten opsigte van hul totale lengte, grootte en rangskikking van die tripelheliese eksone (Chu *et al.*, 1985; Sangiorgi *et al.*, 1985).

2.3.3 REGULERING VAN DIE PROKOLLAGEENGENE

Die mRNA's vir pro- α 1(I) en pro- α 2(I) kom in 'n verhouding van 2:1 in normale kontrolefibroblaste voor. Hierdie verhouding is ekwivalent aan die 2:1-verhouding van die sintese van die pro- α 1(I)- en pro- α 2(I)-kettings. Op grond van hierdie en ander data is voorgestel dat die transkripsie van die pro- α 1(I)- en pro- α 2(I)-gene onder streng gekoördineerde beheer staan (De Wet *et al.*, 1983). Versteuring in hierdie 2:1-verhouding kan aanleiding gee tot ernstige siektetoestande soos Tipe I Osteogenesis Imperfecta waar 'n verhouding van slegs 1:1 voorkom (Barsh *et al.*, 1982). Verskillende faktore beïnvloed die mRNA-vlakke in 'n sel. Voorbeelde hiervan is transformering van fibroblaste met 'n onkogeen wat tot 'n afname in Tipe I-mRNA lei (Setoyama *et al.*, 1985) terwyl TGF- β weer die mRNA-vlakke van verskeie kollageentipes soos Tipe I, III en V, verhoog (Rippe *et al.*, 1988).



Figuur 2.1 Die ekson-intronstructuur van die mens pro- α 1(I)-geen (paneel A) en pro- α 2(I)-geen (paneel B)

Numering van die eksone word 'n 5' $\rightarrow$ 3' rigting aangetoon (De Wet *et al.*, 1987, d'Allesio *et al.*, 1988; Ramirez en De Wet, 1988).

In 'n vergelykende studie tussen Tipe I kollageengene van die mens en muis is waargeneem dat daar 'n 85%-ooreenkoms tussen die pro- α 1(I) promotorgebiede bestaan (Bornstein en Sage, 1989) en 'n 91% homologie tussen die pro- α 2(I)-gene bestaan (Dickson *et al.*, 1985). Minder as 4% homologie kom egter tussen die mens pro- α 1(I)- en pro- α 2(I)-gene voor (Chu *et al.*, 1985). Regulering is dus waarskynlik geen-spesifiek, maar nie noodwendig spesie-spesifiek nie.

Min of uiters verwarrende gegewens ten opsigte van *cis*- en veral *trans*-werkende regulatoriese elemente wat in die verskillende kollageengene teenwoordig is, is in die literatuur opgeteken. Aangesien hierdie studie op die pro- α 1(I)-geen fokus en Tipe I-kollageen as die basiese prototipe van al die ander kollageengene beskou word, word daar in hierdie literatuurstudie veral op die Tipe I-gene gekonsentreer. Gegewens ten opsigte van die reguleringselemente in die gene van Tipe II- en III-kollageen word egter waar gegewens ook bekend is, kortliks bespreek.

2.3.3.1 PROMOTORGEBIED

Al vier die kollageengene [pro- α 1(I), pro- α 2(I), pro- α 1(II), pro- α 1(III)] beskik oor 'n TATA-motief 20 tot 30 bp 5' vanaf die inisiasiepunt vir transkripsie, terwyl slegs Tipe I-gene oor 'n kenmerkende CCAAT-motief beskik. Die TATA-motief(1)¹ is in die geval van sowel mens as muis Tipe I pro- α 1-geen, -23 bp stroom-op van die transkripsie-inisiasiepunt geleë, terwyl dit in die geval van rot en hoender onderskeidelik by -28 en -25 geleë is. Daarteenoor kom die TATA-motief in die pro- α 2(I)-geen by -33 voor. Die TATA-motief is in die rot Tipe II-kollageen by -22 aangetref. Twee omgekeerde CCAAT-motiewe(1) kom in die pro- α 1(I)-geen by -126 tot -130 en -96 tot -100 voor (Rippe *et al.*, 1989).

¹ Numering kom ooreen met die van Figuur 2.3.

Die CCAAT-motief in die pro- $\alpha 2$ (I)-geen is by beide die mens en die muis by -86 bp stroom-op van die inisiasiepunt vir transkripsie geleë, terwyl die hoender CCAAT-motief by -100 voorkom. Geen CCAAT-motief is in die gene van Tipe II- of Tipe III-kollageen waargeneem nie (Chu *et al.*, 1985; Dickson *et al.*, 1988; Finer *et al.*, 1987; Kohna *et al.*, 1985).

Verskeie studies van die promotorgebied het getoon dat die gebied -253 tot -15 by die mens(3) (Rossouw *et al.*, 1987) en die gebied -220 tot +16 by die muis pro- $\alpha 1$ (I)-geen(2) (Karsenty en De Crombrughe 1990) oor genoegsame transkripsionele beheervolgordes beskik om die uitdrukking van die geen of merkergeen te rig. Rossouw *et al.* (1987) het aangetoon dat stapsgewyse verlenging van die mens pro- $\alpha 1$ (I) promotorgebied vanaf -253 na onderskeidelik -331 en na -950(9), aanleiding gee tot slegs 'n geringe toename in die mate van geenuitdrukking in *X. laevis* oösiëte. Verlenging van die geen na -2400 het egter weer 'n hoër vlak van uitdrukking tot gevolg gehad. Volgordes wat tussen -950 en -2400 geleë is en dus op 'n redelike afstand vanaf die TATA- en CCAAT-motiewe is, kan dus 'n positiewe invloed op die vlakke van transkripsie uitoefen. Ander navorsers het egter in die geval van die muis pro- $\alpha 1$ (I)-geen aangetoon dat die gebied tussen -2500 en -220 'n tienvoudige afname in die mate van geenuitdrukking veroorsaak (4) (Bornstein en Sage, 1989). Hierdie eksperimentele gegewens dui daarop dat daar sowel positiewe as negatiewe elemente in hierdie gebied teenwoordig is.

Uit transgeniese sowel as transfeksie-eksperimente is twee gebiede in die muis pro- $\alpha 2$ (I) promotorgebied geïdentifiseer, naamlik die gebied tussen -979 en -502 en -346 en -185 wat transkripsievlakke verhoog en ook weefselspesifiteit vertoon (Khillan *et al.*, 1986; Schmidt *et al.*, 1986). Positiewe reguleringselemente is ook in die eerste 80 bp stroom-op van die inisiasiepunt vir transkripsie by die pro- $\alpha 1$ (III)-geen waargeneem, terwyl gebiede verder stroom-op 'n negatiewe invloed op geenuitdrukking het (Mudryj en De Crombrughe, 1988).

'n Heterodimeriese CCAAT-bindingsfaktor (CBF) bind aan die CCAAT-motief van sowel die pro- α 1(I)-geen as die pro- α 2(I)-geen(5). Die feit dat die CBF slegs aan een van die twee beskikbare CCAAT-motiewe bind, toon duidelik aan dat aangrensende DNA-volgordes belangrik is vir die waargenome bindingsaktiwiteit. Geen binding van die CBF word egter in die promotorgebied van die pro- α 1(III)-geen waargeneem nie. Gekoördineerde uitdrukking van Tipe I- en III-kollageengene dui dus nie noodwendig daarop dat dieselfde *trans*-werkende bindingsproteïene betrokke is by die regulering van die uitdrukking van beide gene nie (Hatamochi *et al.*, 1986). Die CBF is verwant of identies aan verskeie bekende faktore, waaronder die HeLa CCAAT-bindingsfaktor CP1 (Chodosh *et al.*, 1988). Hatamochi *et al.* (1986) het ook aangetoon dat die CBF wat aan die Tipe I-kollageengene bind uit twee komponente bestaan, naamlik 'n 39 kd en 41 kd polipeptied. Die verwantskap van die CBF met ander CCAAT-bindingsproteïene toon dat CBF 'n proteïen is wat met enige gegewe CCAAT-motief met 'n bepaalde affiniteit interaksie kan ondergaan (Karsenty en De Crombrughe, 1990; Slack *et al.*, 1993). Verplasing van hierdie CBF deur ander transkripsiefaktore kan egter plaasvind. Nehls *et al.* (1991) het dan ook waargeneem dat die transkripsiefaktor NF1(6) eerder aan die proksimale CCAAT-motief in die muis pro- α 1(I)-geen as CBF sal bind. NF1 self verwys weer na 'n familie van algemene kernproteïene wat verskillend uitgedruk word, afhangend van die weefsel en spesie (Paonessa *et al.*, 1988). Dieselfde groep van Nehls het ook waargeneem dat Sp1 aan die 12 bp herhalingsvolgorde wat die CCAAT-motiewe omsluit, kan bind. Binding van Sp1 aan die proksimale herhalingsgebied vind egter slegs in die afwesigheid van NF1 plaas. Soortgelyke inhibering deur een faktor van 'n ander is reeds by Ap2 (Afdeling 2.2.2.4) beskryf. 'n Vergelyking van die volgordes tussen die NF1 konsensusvolgorde en die proksimale en distale gebiede lyk soos volg:

NF1 konsensusvolgorde:	TAACCGANNNN [^] /C GGT
Proksimale gebied:	TAACCGACCCC C GGC
Distale gebied:	TAACCCCGGC C CGC

Die noue ooreenkoms tussen die NF1 konsensusvolgorde en die proksimale gebied verklaar die hoër affiniteit van hierdie gebied vir NF1 bo Sp1. Ander navorsers kon egter geen Sp1-binding in enige van die twee gebiede waarneem nie (Brenner *et al.*, 1989; De Crombrughe *et al.*, 1991). Twee negatiewe elemente wat transkripsie inhibeer, is ook in die promotorgebied van die muis pro- α 1(I)-geen waargeneem. Inhiberingsfaktor 1 (IF1) bind aan die twee naasliggende stroom-opgebiede -190 tot -170 en -160 tot -130, terwyl IF2 aan die distale 12 bp herhalingsvolgorde waar Nehls *et al.* (1991) Sp1-binding waargeneem het, bind (7) (Karsenty en De Crombrughe, 1988). Ander navorsingsgroepe waaronder Brenner *et al.* (1989), neem ook vier afskermingsgebiede waar, naamlik die reeds genoemde twee 12 bp herhalingsgebiede en twee GC-ryke gebied waarvan die volgordes soos volg is:

5' -TCCCTCCTCCCCCTCTGG-3' en
5' -GGAGGGGGGGCGCTGGGT-3'

Die presiese bindingsfaktore van hierdie twee gebiede kon egter nog nie geïdentifiseer word nie. In die muis pro- α 2(I)-geen is benewens CBF ook 'n onbekende bindingsfaktor rondom -250 waargeneem en 'n NF1-bindingsgebied rondom -305. Hierdie NF1 is egter verskillend van die NF1 wat by -80 bind en is betrokke by die transkripsionele aktivering van hierdie geen deur TGF- β (Oikarinen, 1987; Rossi *et al.*, 1988). Verdere studie deur Inagaki *et al.* (1994) het egter aangedui dat Sp1 verantwoordelik is vir die mediëring van die TGF- β stimulasie en nie die NF1 nie. Hierdie groep het 'n 131 bp-gebied tussen -378 en -183 gelokaliseer wat as TGF- β responsiewe element funksioneer. Hierdie gebied bevat onder meer die Sp1-bindingsgebied.

Ongeïdentifiseerde negatiewe reguleringsfaktore by onder meer -83 tot -61 kom in die pro- α 1(III)-promotor voor. Daar is egter 'n Ap1-bindingsgebied -122 tot -106 en 'n NF1-bindingsgebied rondom -40 in die pro- α 1(III)-promotor geïdentifiseer (Vuorio en De Crombrughe, 1990). Die promotorgebied van die Tipe II-kollageengeen beskik oor drie GGGCGG- en een

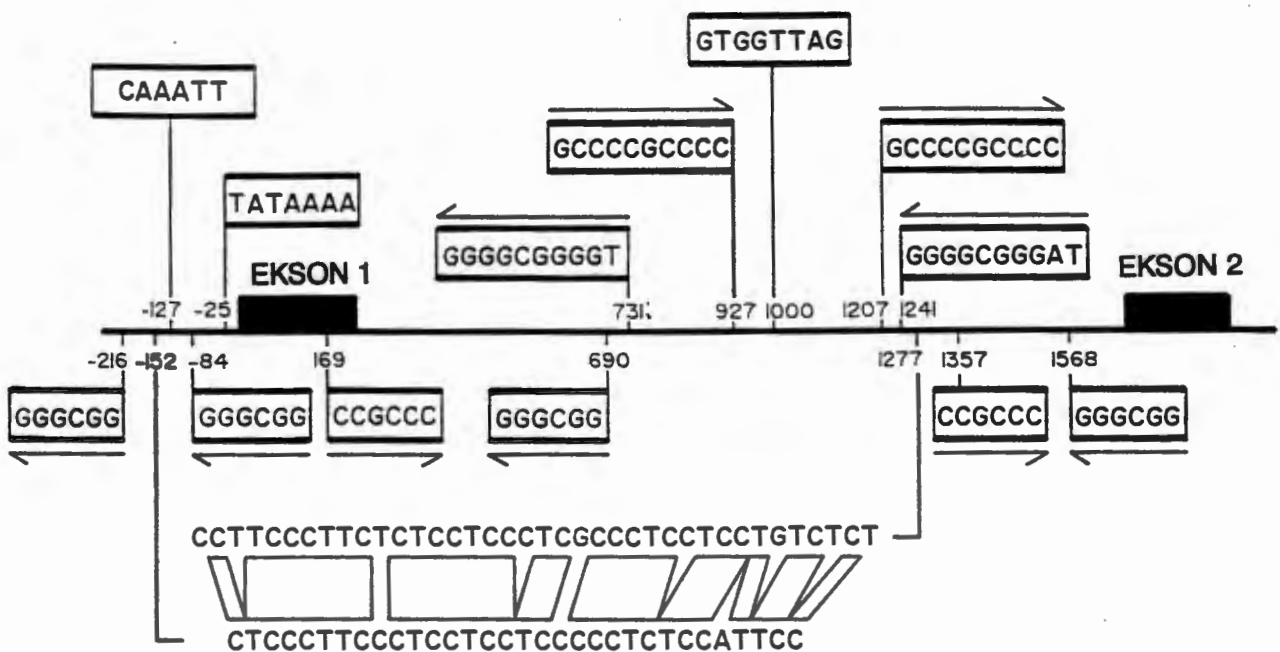
CCCGCC-volgordes. Hierdie vier goed gekonserveerde Sp1-bindingsgebiede speel waarskynlik 'n belangrike rol in die bepaling van die promotoraktiwiteit in die afwesigheid van die CCAAT-motief. 'n Ap1-bindingspunt -555 tot -548 is by die mens pro- α (II)-geen waargeneem, maar kom glad nie by die muis- en rotgene voor nie. Twee homoloë pirimidienryke gebiede (8) kom in die promotor sowel as die eerste intron van die mens pro- α (I)-geen voor. Twee pirimidienryke gebiede word ook in die pro- α (II)-geen waargeneem, waarvan slegs een (-364 tot -353) egter gekonserveer is (Vikkula *et al.*, 1992).

2.3.3.2 INTRONGEBIED

Rossouw *et al.* (1987) het waargeneem dat 'n 782 bp Sma I-fragment van die eerste intron van die mens pro- α (I)-geen(9) wat aan 'n -253 bp minimale promotor gekoppel is, 'n sestigvoudige stimulasie in transkripsie in *X. laevis* oösiëte en 'n honderdvoudige stimulasie in getransfekteerde NIH 3T3 fibroblaste veroorsaak. Wanneer hierdie geenfragment in 'n omgekeerde oriëntasie ten opsigte van die promotor geplaas word, word slegs 'n tienvoudige toename in transkripsie in die bogenoemde sisteme waargeneem. Plasing van die fragment -950 bp stroom-op van die transkripsie-inisiasiepunt het geen stimulerings van transkripsie tot gevolg nie, terwyl die omgekeerde oriëntasie 'n agtienvoudige verhoging in transkripsie tot gevolg het. Rossouw *et al.* (1987) beskou dan die gebied tussen +820 en +1602 as 'n aktiveringsvolgorde. In hierdie gebied kom onder meer 'n pirimidienryke gebied voor tussen +1238 en +1296 wat homoloog is aan die pirimidienryke gebied in die promotor wat tussen -168 en -137 geleë is. Die heksanukleotied GGGCGG en sy omgekeerde CCGCCC vorm kom ten minste tien keer in hierdie gebied voor(14), waarvan vier gebiede met Sp1-bindingsvolgordes ooreenstem. 'n Voorstelling van hierdie motiewe word in Figuur 2.2 gegee.

Gelyktydig met die identifisering van die aktiveringsvolgorde in die mens pro- α (I)-geen het verskeie ander groepe onafhanklik van mekaar soortgelyke

waarnemings in die eerste intron van ander kollageengene gemaak. So het Rossi en De Crombrughe (1987) 'n oriëntasie-onafhanklike aktiveringsvolgorde tussen +418 en +1525 in die eerste intron van die muis pro- $\alpha 2$ (I)-geen waargeneem terwyl Sherwood en Bornstein (1990) geen aktiveringsvolgorde in die mens pro- $\alpha 2$ (I)-geen waargeneem het nie. Die rede hiervoor is waarskynlik dat baie min homologieë tussen die muis en die mens pro- $\alpha 2$ (I)-introngebied voorkom, wat in teenstelling is met die hoogs gekonserveerde pro- $\alpha 1$ (I)-introngebied van die mens en muis. In Tipe II-kollageen is 'n posisie-onafhanklike 800 bp Eco RI - BamH I-fragment in die eerste intron as aktiveringsvolgorde deur Horton *et al.* (1987) geïdentifiseer.



Figuur 2.2 Volgordemotiewe in die onmiddellike stroom-opgebied en in die eerste intron van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen.

Die CCAAT- en TATA-motiewe word op die boonste helfte aangetoon tesame met 'n aktiveringsvolgorde kernelement (GTGGTTAG). Die ses ander heksanukleotiedvolgordes en die twee pirimidienryke gebiede word op die onderste helfte van die figuur aangetoon (Rossouw *et al.*, 1987).

Daar bestaan heelwat teenstrydighede ten opsigte van die waargenome aktiveringsvolgorde in die eerste intron van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen. Hierdie teenstrydighede is moontlik daaraan te wyte dat die aktiveringsvolgorde nie as 'n "klassieke" aktiveerder optree nie, waarskynlik omdat dit beide posisie-sensitief en oriëntasie-afhanklik is. Bornstein *et al.* (1987,1988) het 'n 274 bp Ava I-fragment geleë +820 tot +1093(10) in die eerste intron geïdentifiseer wat in die waargenome aktiveringsvolgorde geleë is en wat as 'n inhibeerder van transkripsie optree in die teenwoordigheid van 'n -625 tot -293 promotorgebied(10). Hierdie 274 bp Ava I-fragment beskik oor twee Sp1-bindingsmotiewe en tree in die omgekeerde oriëntasie inhiberend op, terwyl dit in die gewone oriëntasie neutraal tot swak inhiberend is. Binding van Sp1 aan hierdie twee Sp1-motiewe geskied onafhanklik van mekaar met dieselfde bindingsaffiniteit en geen koöperatiewe binding is tussen die twee naasliggende Sp1-gebiede waargeneem nie (Liska *et al.*, 1992). Verlenging van die gebied na +671 en +1440(10) het 'n verhoging in transkripsie tot gevolg maar in die omgekeerde oriëntasie lei dit tot 'n tienvoudige inhibering. 'n Kort introngebied sonder hierdie 274 bp intronfragment, naamlik +292 tot +671(10), stimuleer transkripsie, terwyl geen stimulasie in die omgekeerde oriëntasie waargeneem word nie. Verdragingsgelanalises het getoon dat die promotorgebied tussen -477 en -255 met die 274 bp-fragment kompeteer vir binding met kernproteïene. Laasgenoemde dui daarop dat interaksie tussen die promotor en die eerste intron voorkom. Verdragingsgelanalise van die promotorgebied -477 tot -255 in meer detail het aangetoon dat die gebied tussen -477 en -332 wel kompeteer vir binding van die Sp1-proteïene wat aan die 274 bp-gebied in die eerste intron gebind het. Die promotorgebied -477 tot -332 kan dus as Sp1-bindingsvolgorde beskou word, terwyl die gebied -331 tot -256 nie vir die Sp1-proteïene kompeteer nie (Liska *et al.*, 1992). Bornstein is van mening dat die positiewe stimulasie wat deur Rossouw *et al.*, (1987) waargeneem is, moontlik die gevolg is van die feit dat die 253 bp-promotor wat gebruik is, waarskynlik nie oor al die nodige transkripsiefaktore beskik om 'n optimale negatiewe effek te verkry nie en dat die *X. laevis* oösiëte waarskynlik nie oor die nodige transkripsiefaktore beskik om DNA-proteïeninteraksie tussen die

promotor en die intron te bewerkstellig nie. Dit lei dan daartoe dat die transkripsionele omgewing van die oösiere soortgelyk is aan dié van BHK- of NIH 3T3-fibroblaste waar omkering van die oriëntasie van die intronvolgorde 'n betreklik klein effek het.

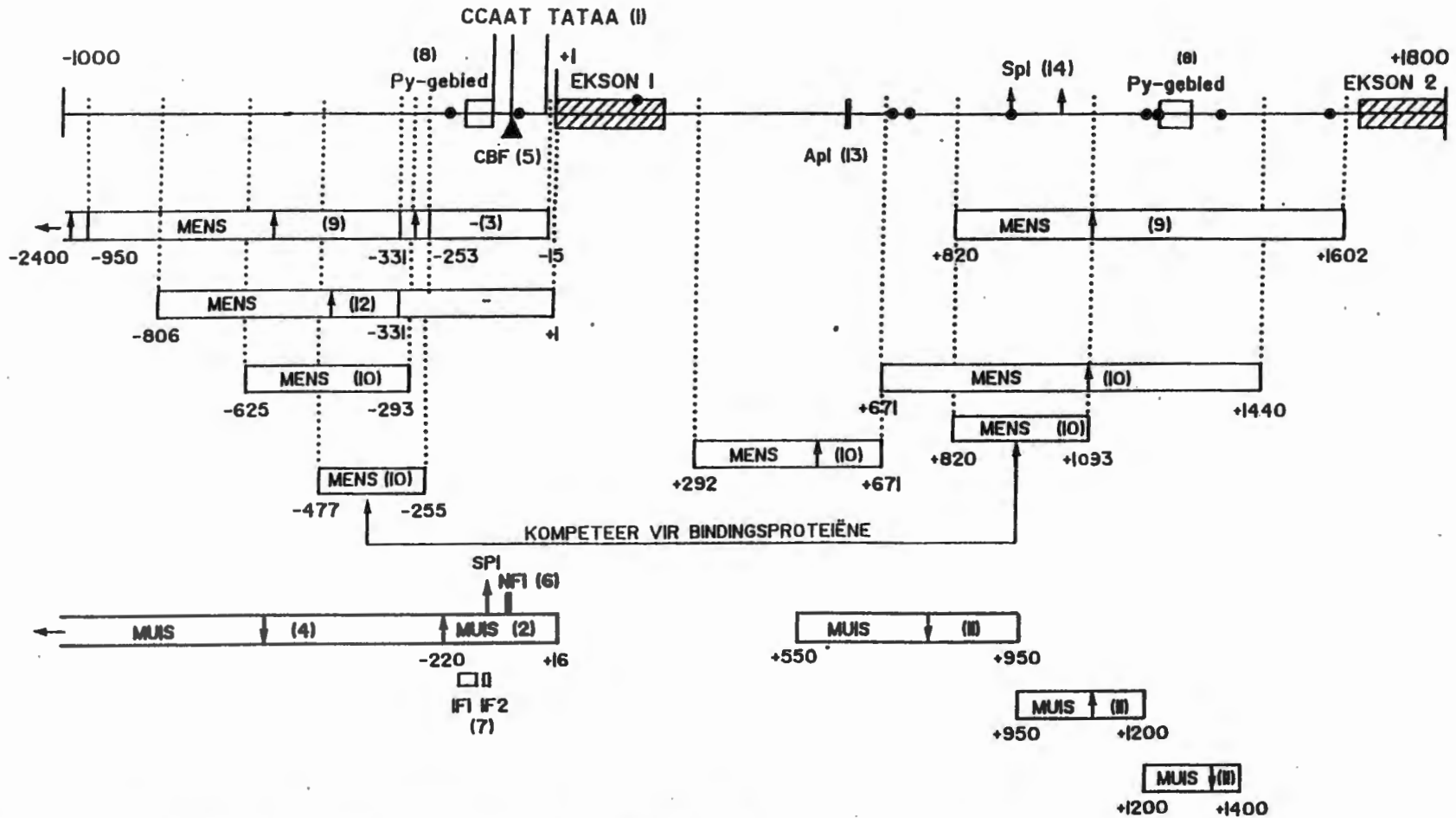
Bornstein *et al.* (1988) stel voorts 'n model voor van promotor/intronbinding waar die twee gebiede verskeie DNA-bindingsproteïene betrek waarvan 'n gedeelte van die proteïene hoofsaaklik by die interaksie betrokke is. Omkering van die oriëntasie kan dan daartoe lei dat interaksie nog plaasvind, maar ten koste van 'n versteuring van die normale ruimtelike geometrie van die transkripsiekompleks. Bornstein postuleer verder dat hierdie promotor/intron interaksie noodsaaklik is vir die korrekte uitdrukking van die Tipe I-kollageen. 'n Verdere studie deur Bornstein en McKay (1988) toon dat die teenwoordigheid van die totale introngebied transkripsie twee tot drie keer stimuleer. Die geïsoleerde negatiewe elemente inhibeer wel transkripsie, maar is oriëntasie-afhanklik. Ander positiewe en negatiewe elemente in die muis pro- $\alpha 1$ (I)-geen is ook deur Rippe *et al.* (1989) waargeneem. 'n Sterk negatiewe gebied kom tussen +550 en +950 voor, terwyl 'n swak stimulerende gebied +950 tot +1200 en 'n swak inhibeerder +1200 tot +1400(11) voorkom. In teenstelling hiermee het Boast *et al.* (1990) stimulering van die transkripsie van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen met die 782 bp Sma I-fragment in die teenwoordigheid van 'n -806 promotor(12) in mens fetale fibroblaste en in limfoblaste op 'n oriëntasie-voorkeurwyse waargeneem. Verkorting van die promotor na -331 het egter geen transkripsionele stimulasie in fetale fibroblaste tot gevolg nie. Tussen -806 en -331 kom dus *cis*-werkende elemente voor wat die aktivering van die promotor deur die 782 bp intronfragment aanhelp. Indien promotor/intron interaksie inderdaad plaasvind, kan die neutrale effek van die -331-promotor die gevolg wees van 'n verandering in die ruimtelike konfigurasie van die volgorde betrokke by die interaksie. Boast *et al.* (1980) stel verder voor dat die 782 bp-volgorde beskou word as 'n aktiveringselement wat die transkripsie van sy eie promotor op 'n oriëntasie-voorkeurbasis stimuleer met sterk seltipe spesifisiteit. Hierdie seltipe

spesifisiteit is dan as gevolg van die verskillende komplekse wat die onderskeie transkripsiefaktore met die promotors en met mekaar kan vorm.

In 'n verdere ondersoek van *cis*-werkende reguleringsvolgordes, is binding van Ap1 deur Liska *et al.* (1990) waargeneem in die eerste intron van die mens pro- α 1(I)-geen in die gebied geleë tussen +292 en +670(13). Die DNA-volgorde waaraan Ap1 bind, naamlik TGATTCA, kom met ses van die sewe basepare van die Ap1 konsensusvolgorde TGA^c/_gTCA ooreen. Identies dieselfde volgorde is ook in die rot pro- α 1(I)-geen waargeneem.

'n Samevattende figuur van al die elemente en waarnemings ten opsigte van die mens pro- α 1(I)-geen wat hierbo bespreek is, word in Figuur 2.3 gegee.

Die tien heksanukleotiede GGGCGG of CCGCCC word as (*) in die lyndiagram aangedui. Die introngebiede tesame met die ooreenstemmende promotorgebiede wat tydens eksperimente gebruik is, word op dieselfde lynhoogte onder die diagram aangetoon. Pyle by die gebiede toon aktivering (↑) of inhibering (↓) aan. Die verskillende faktore wat bekend is dat hulle bind, naamlik Sp1, CBF, Ap1 en NF1 sowel as die twee inhiberingsfaktore IF1 en IF2, word ook aangetoon.



Figuur 2.3 Gebiede en elemente geïdentifiseer in die mens en muis pro- $\alpha 1(I)$ -kollageengeen

Numering kom ooreen met die numering in die voorafgaande geskrewe gedeelte. Die tien heksonukleotide word as (●) aangetoon. Positiewe gebiede word as (↑) aangetoon, terwyl negatiewe gebiede as (↓) en neutrale gebiede as (-) aangetoon word. Bindingsgebiede van die verskillende faktore word aangetoon as: CBF (▲); Ap1 (I); NF1 (II); Sp1 (†); IF1 (). (Boast *et al.*, 1990; Bornstein *et al.*, 1988; Bornstein en Sage, 1989; Dickson *et al.*, 1988; Hatamochi *et al.*, 1986; Karsenty en De Crombrughe, 1989; 1990; Liska *et al.*, 1990; 1992; Nehls *et al.*, 1991; Rippe *et al.*, 1989; Rossouw *et al.*, 1987)

2.4 SV40

SV40 is een van die DNA-virusse waarvan interaksie tussen die DNA en die transwerkende DNA-bindingsproteïene in redelike detail bestudeer is. Soos reeds in die inleiding genoem, is die SV40-vroeë promotorgebied om hierdie rede as 'n "standaard", dit wil sê waarvolgens eksperimentele data geëvalueer en geanaliseer is, in hierdie studie gebruik. 'n Kort opsomming van hierdie virus en sy vroeë promotorgebied en van die transkripsiefaktore wat aan hierdie gebied bind, word vervolgens kortliks gegee.

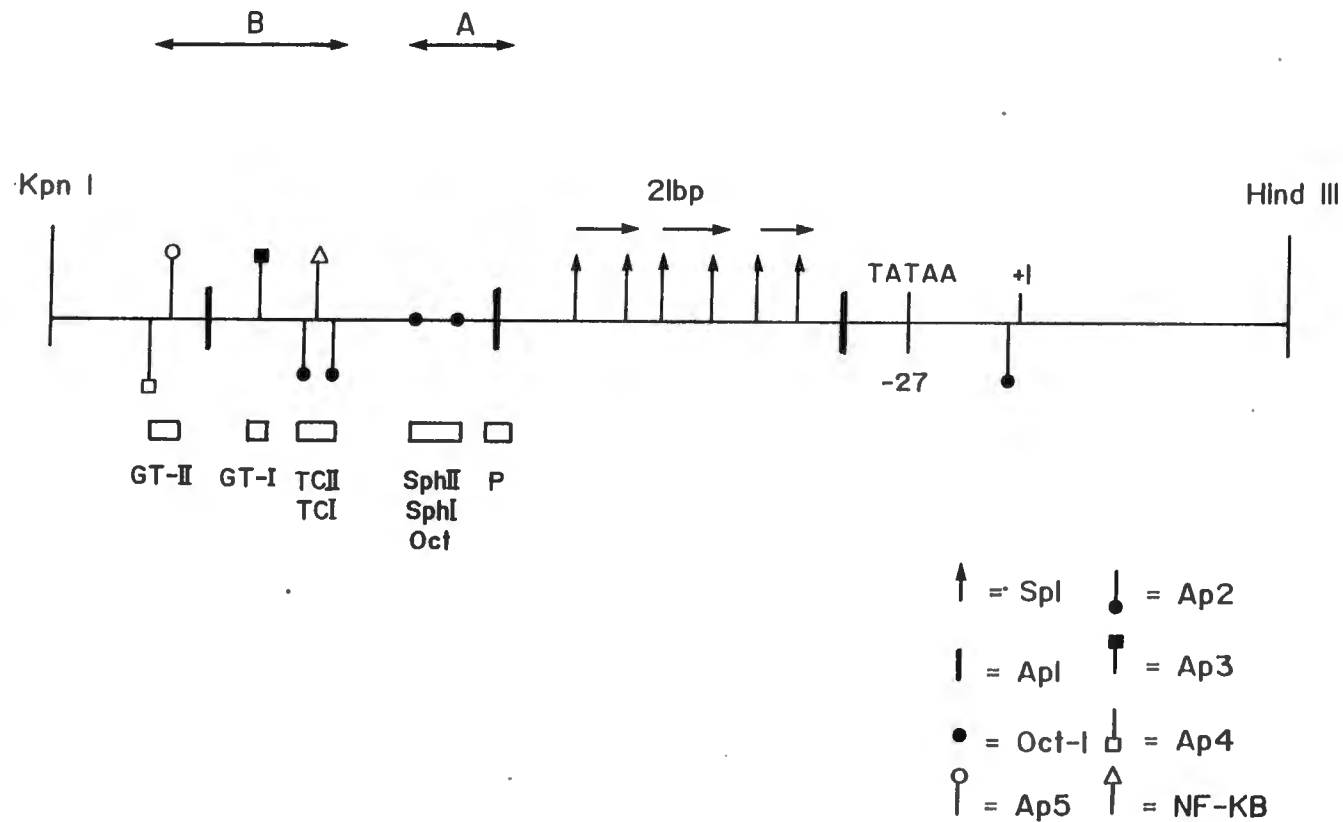
SV40 is 'n sirkelvormige dubbelstring DNA-virus, waarvan die genoom oor 5200 bp strek en in twee transkripsie-eenhede verdeel kan word. Hierdie vroeë en laat geenkoderingsgebiede word vanaf 'n punt naby die *ori* in teenoorgestelde rigtings getranskribeer. Die vroeë transkripsie-eenheid bevat gene vir die groot en klein T. antigene, terwyl die laat transkripsie-eenheid gene vir die strukturele proteïene van die virion bevat (Banerji *et al.*, 1981).

'n TATA-motief wat noodsaaklik is vir die bepaling van die inisiasiepunt vir transkripsie, is in die gebied -21 tot -27 geleë. In die afwesigheid van die TATA-motief is die begin van inisiasie van transkripsie by verskillende nuwe punte waargeneem. 'n Palindromiese gebied van 27 bp word stroom-op van die TATA-motief aangetref en is die oorsprong van replisering. Ander gebiede wat in die vroeë promotorgeen aangetref word, is 'n bykans perfekte drievoudige tandem van 21 bp wat baie GC-ryk is en 'n perfekte tandemherhaling van 72 bp geleë tussen -116 en -261. Hierdie 72 bp herhalingseenheid tree as die eerste geïdentifiseerde aktiveringsvolgorde op, terwyl die minimale aktiveringsvolgorde slegs een kopie van die 72 bp herhalingseenheid benodig tesame met van die aangrensende stroom-op elemente (Benoit en Chambon, 1981; Fromm en Berg, 1982). Die aktiveringsvolgorde van SV40 is in staat om verskeie heteroloë promotorelemente sowel as die homoloë promotor se transkripsie *in vitro* in verskeie sellyne te stimuleer. Kort volgordes in die SV40-aktiveringsvolgorde vertoon elk sy eie karakteristieke seltipe spesifisiteit wat van die volledige aktiveringsvolgorde onderskeibaar is (Schirm *et al.*, 1987). Hierdie

seltipe spesifisiteit word verkry uit die verskillende motiewe wat transkripsioneel tesame gestimuleer word. Hierdie mosaïek van funksionele elemente staan dan as enhansons bekend. Zenke *et al.* (1986) bevind dat hierdie motiewe in twee domeine A en B georganiseer is, soos aangedui in Figuur 2.4. Die domeine vertoon elk afsonderlik 'n baie lae transkripsionele aktiwiteit, maar funksioneer koöperatief om aktiveringsvolgorde-aktiwiteit te vertoon.

In vivo en *in vitro* kompetisie-eksperimente het aangetoon dat die aktiwiteit van die aktiveringsvolgorde deur *trans*-werkende faktore wat aan die verskillende motiewe bind, gereguleer word. Soos ook aangetoon in Figuur 2.4, is bevind dat in 'n motief of enhanson GT-II, twee transkripsiefaktore, naamlik Ap4 en Ap5, oorvleuelend bind. In motief GT-1 vind binding van Ap3 plaas, terwyl Ap2 in motiewe TC-I en TC-II bind. Die oktameerbindingsfaktor OBP-100 bind aan volgordes in die Sph-I, Sph-II en oktameermotiewe en binding van faktore Ap1 kom in die P-motief voor. (Jones *et al.*, 1988; Kanno *et al.*, 1989). In Figuur 2.4 word slegs die minimale SV40-aktiveringsvolgorde bestaande uit die distale 72 bp-herhalingseenheid en aangrensende volgordes gegee. Hierdie selfde gebied is as "standaard" in die studie gebruik. Transkripsiebindingspunte vir die verskillende transkripsiefaktore word in die figuur by die eerste basis van binding aangedui.

Ten opsigte van die drievoudige tandem 21 bp GC-ryke gebied, is waargeneem dat elke 21 bp-herhalingseenheid twee kopieë van die heksanukleotiedvolgorde 5'-GGGCGG-3' bevat. Aan elk van hierdie heksanukleotiedvolgordes bind Sp1 op 'n selspesifieke wyse. Bindingsaffiniteite van die Sp1 aan hierdie volgordes wissel egter van mekaar as gevolg van veral steriese beperkinge sodat in baie gevalle slegs vyf van die ses Sp1-proteïene op 'n keer bind (McKnight en Tjian, 1986). Jones *et al.* (1986) toon aan dat Sp1-bindingspunte III en V hoë affiniteitsbindingspunte is, II en VI medium affiniteitsbindingspunte en I en IV lae affiniteitsbindingspunte soos beskryf in die bespreking van Sp1 (Afdeling 2.2.2.2).



Figuur 2.4 Binding van transkripsiefactoren aan de minimale SV40-aktiveringsvolgorde

Die verschillende enhancers in domeine A en B worden onder het lyndiagram aangetoond. (Benoit en Chambon, 1981; Fromm en Berg, 1982; Jones *et al.*, 1988; Kanno *et al.*, 1989; Schirm *et al.*, 1987; Zenke *et al.*, 1986)

Binding van twee ander transkripsiefaktore benewens Sp1 wat in hierdie studie gebruik is, naamlik Ap1 en Ap2 aan die SV40-DNA, toon in SV40 die volgende: Die twee aangrensende Ap2-bindingspunte in motiewe TC-I en TC-II is beide hoë affiniteitsbindingspunte, terwyl die twee ander Ap2-bindingspunte laer bindingsaffiniteit vertoon. Aan een van die twee genoemde bindingspunte is die binding van Ap2 slegs aan kort bindingsvolgordes (CCCA en AGGC) in die 21 bp herhalingsgebiede (nie in Figuur 2.4 aangetoon nie), 'n gebied waar die Sp1-bindingsproteïene ook bind. Die derde Ap2-bindingsgebied is geleë oor die vroeë transkripsionele inisiasiepunt (Mitchell *et al.*, 1987). Ten opsigte van Ap1 is die twee geïdentifiseerde Ap1-bindingsgebiede (Figuur 2.4) wat in die 72 bp herhalingsseenheid voorkom (Domein A en B) beide hoë bindingsaffiniteitsgebiede, terwyl die derde Ap1-bindingsgebied geleë tussen die TATA-motief en die 21 bp herhalingsseenhede 'n laer bindingsaffiniteit vertoon (Lee *et al.*, 1987b). Binding van Sp1, Ap1 en Ap2 aan die SV40-DNA is dus goed bekend en gekarakteriseer.

2.5 BENADERINGSWYSE

Uit dit wat uit die literatuurstudie van veral die transkripsionele regulering van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen na vore gekom het, is dit duidelik dat die totale kollageenreguleringsveld in 'n chaotiese toestand is. Die doel van hierdie studie is dus om 'n bydrae te lewer om orde in hierdie chaotiese toestand te skep deur so noukeurig moontlik die interaksie van drie transkripsiefaktore, naamlik Sp1, Ap1 en Ap2 met die reguleringsgebiede van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen te bestudeer en te karakteriseer sodat 'n kaart van die bindingsgebiede en 'n moontlike model van binding tussen die reguleringsgebiede van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen daargestel kan word.

Die metode wat gevolg is, is kortliks soos volg: Die reguleringsgebiede is deur twee verskillende funksionele toetse geïdentifiseer, naamlik die oösietsistiem en die transfeksiesistiem. Vir die karakterisering van die *cis*-aktiewe elemente en die

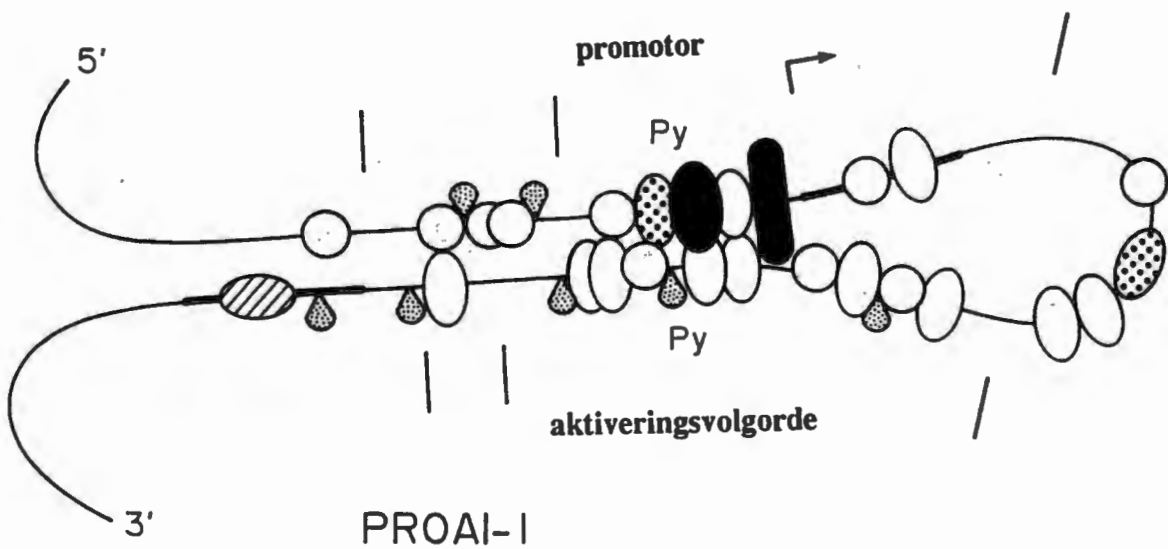
tipering van hul interaksie met *trans*-aktiewe transkripsiefaktore is vyf stappe uitgevoer:

- * Rekenaaranalise van die DNA-volgorde om *cis*-aktiewe elemente te identifiseer waaraan die transkripsiefaktore moontlik kan bind;
- * verdeling van die reguleringsgebiede deur middel van restriksie-ensieme in fragmentgroottes van tussen 200 en 400 bp wat geskik is vir DNase I-afskermingsanalises;
- * peiling van die binding van proteïenfakore aan bepaalde volgordes met behulp van DNase I-afskermingsanalise;
- * kwantifisering van die bindingsaffiniteit van die bepaalde proteïenfakore met *cis*-aktiewe elemente; en
- * peiling van die vorming van funksionele komplekse tussen die verskillende reguleringsgebiede deur elektronmikroskopiese analise.

'n SV40-fragment wat die SV40-vroeë promotorgebied insluit, is ten alle tye aan al die stappe waaraan die kollageenfragmente onderwerp is, onderwerp sodat eksperimentele metodes en data geëvalueer kon word. In die meeste gevalle is eksperimentele metodes uitgevoer volgens die algemene metodes wat in Hoofstuk 3 beskryf is.

Soos ook uit die literatuuroorsig na vore kom, kom al meer navorsers tot die slotsom dat die promotor en die aktiveringsvolgorde van die pro- α 1(I)-kollageengeen interaksie met mekaar ondergaan. In Figuur 2.5 word 'n lusvormingmodel voorgestel vir die interaksie van die promotor en die aktiveringsvolgorde van die mens pro- α 1(I)-geen. In hierdie model word die twee pirimidienryke gebiede (Py) wat homoloog aan mekaar is en in die promotor en aktiveringsvolgorde voorkom, op mekaar gepas. Interaksie tussen die verskillende DNA-bindingsproteïene help dan met verdere stabilisering van die interaksie tussen die promotor en die aktiverings-

volgorde. In Figuur 2.5 word verskillende bindingsproteïene ter illustrasie aangetoon. Hierdie studie is bedoel om 'n bydrae te lewer om die werkbaarheid van hierdie model te toets.



Figuur 2.5 Voorstelling van 'n model waarvolgens die promotor en die aktiveringsvolgorde deur proteïen-proteïen interaksies in kontak met mekaar gebring word.

HOOFSTUK 3

METODES

3.1 INLEIDING

Hierdie hoofstuk word hoofsaaklik gewy aan 'n uitvoerige beskrywing van die verskillende eksperimentele metodes wat tydens hierdie studie gebruik is. Daar is deurgaans van die beste gehalte chemikalieë gebruik gemaak en die oorsprong van spesifieke materiale word slegs by wyse van uitsondering vermeld. In alle gevalle is van steriele reagente, pipetpunte en buise gebruik gemaak. Waar daar van radio-aktiefgemerkte materiaal gebruik gemaak is, is buise en pipetpunte gesileer om te verhoed dat die eksperimentele materiaal daarin adsorbeer. Daar is ook deurgaans van water wat deur 'n Millipore-Q sisteem gesuiwer is, gebruik gemaak.

3.2 KONSTRUKSIE EN ISOLERING VAN PLASMIEDE

3.2.1 GROOTSKAALSE ISOLERING VAN PLASMIED-DNA

Groot hoeveelhede van die verskillende plasmiede wat in hierdie studie gebruik is en in Hoofstuk 4 beskryf word, is volgens 'n wysiging van die standaardmetode van Sambrook *et al.* (1989) geïsoleer. Die opeenvolgende stappe van die isoleringstegniek is kortliks soos volg:

Vyf milliliter entkulture van *E. coli*-selle wat die betrokke plasmied bevat, is aanvanklik oornag gekweek. Vir die grootskaalse kweking van die plasmiedbevattende bakterieë is 0,5 ml van hierdie oornag entkulture in 250 ml M9-medium¹ geïnkuleer en in 'n skudwaterbad by 37°C geïnkubeer.

¹ Samestelling van M9-medium:

[1 x M9-soute: 33 mM Na₂HPO₄; 22 mM KH₂PO₄; 9 mM NaCl; 18 mM NH₄Cl en 1 mM MgSO₄; 0,5 g % (m/v) glukose]; 0,5 g % (m/v) kaasaminozure en 2 mg % (m/v) tiamien. Vir die kweking van ampisillienweerstandbiedende klone is die antibiotikum tot 'n finale konsentrasie van 10 mg % (m/v) bygevoeg.

Inkubasie is voortgesit totdat 'n absorpsiewaarde by A_{550} van tussen 0,45 en 0,5 bereik is. Om die sintese van die plasmiede te amplifiseer, is chlooramfenikol tot 'n finale konsentrasie van $0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$ bygevoeg en die inkubasie vir 'n verdere 16 uur by 37°C voortgesit (Kahn *et al.*, 1979).

Na inkubasie is die 250 ml plasmiedbevattende bakteriese kultuur in 'n Beckman JA-14-polipropileenbuis deur sentrifugering by 4500 opm vir 15 minute gepresipiteer. Dekantering van die supernatant is gevolg deur die suspendering van die bakterieë in 25 ml TES-buffer [50 mM Tris, (pH8,0); 50 mM EDTA; 50 mM NaCl]. Die suspensie is oorgedra na 'n Beckman JA-20-polipropileenbuis en vir 10 minute teen 3500 opm gesentrifugeer. Hierdie en die opvolgende stappe is by 0°C tot 4°C uitgevoer. Na die wasstap is die supernatant weer eens gedekanteer en die bakterieë in 2,5 ml suikrose-Tris-buffer [25 g% (m/v) suikrose; 50 mM Tris, (pH8,0)] hergesuspendeer. Een milliliter 0,5 M EDTA, (pH8,0), gevolg deur 1 ml 10 mg.ml^{-1} lisosiemoplossing (Boehringer Mannheim No. 107 225), vars opgemaak in suikrose-Tris-buffer, is by die suspensie vermeng. Hierdie suspensie is goed vermeng en vir 30 tot 40 minute op ys gehou en nou en dan weer gemeng, waarna 'n gelyke volume Triton-lisemengsel [50 mM Tris, (pH8,0); 62,5 mM EDTA, (pH8,0); 0,4% (v/v) Triton-X100] bygevoeg is en die mengsel weer eens vir 30 tot 40 minute op ys gehou en nou en dan gemeng is. Na hierdie lise-stap is die lisaat in 'n Beckman-rotor JA-20 vir 60 minute teen 16 000 opm gesentrifugeer. Die supernatant is versigtig in 'n steriele 15 ml buis gedekanteer en gepoeierde CsCl tot 'n finale konsentrasie van $0,95 \text{ g.ml}^{-1}$ van die oorspronklike volume is daarby gevoeg, gevolg deur etidiumbromied tot 'n finale konsentrasie van $0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Ewewigdigheidsgradiëntsentrifugering is in verseëlde hitteverseëlbare QuickSeal™ (Beckman) propileenbuisse teen 50 000 opm vir 48 uur by 15°C in 'n Beckman-rotor (tipe 70.1) uitgevoer. Plasmiede in die superheliese vorm is deur middel van UV-straling by 340 nm in die buise gelokaliseer en is met behulp van 'n spuitnaald (No. 18) deur die wand van die buis onttrek. Deur ten minste drie opeenvolgende ekstraheringstappe met 'n gelyke volume TES-versadigde isoamielalkohol, is die etidiumbromied verwyder. Hierna is die DNA-bevattende waterfase teenoor drie

ruilings met honderd volume HB-buffer [6 mM Tris, (pH7,4); 50 mM NaCl; 0,1 mM EDTA] vir vier tot vyf uur sonder roering by kamertemperatuur gedialiseer. Die dialisaat is in 'n sluitbare 15 ml polipropileenbuis (Falcon No. 2006) oorgedra en NaCl is tot 'n finale konsentrasie van 0,3 M bygevoeg. Laasgenoemde stap is gevolg deur die byvoeging van twee tot drie volume vrieskoue 100% etanol, waarna die mengsel goed gemeng en oornag by -20°C geïnkubeer is.

Etanol-gepresipiteerde nukleïensure is teen 9000 opm vir 60 minute by -10°C in 'n Beckmanrotor JS-13 gesentrifugeer. Die presipitaat is twee keer onder dieselfde sentrifugeringskondisies met vrieskoue 70% etanol gewas. Na vakuumdroging is die presipitaat in 200 µl Robertsbuffer [6 mM Tris, (pH7,5); 6 mM NaCl; 0,1 mM EDTA, (pH8,0)] gesuspendeer.

UV-spektrofotometrie by A_{260} is aangewend om die DNA-konsentrasie van die plasmiedpreparate te bepaal. Die berekening is gegrond op 'n uitwissingskoëffisiënt van 20 mg⁻¹.ml.cm⁻¹ by 260 nm (Freifelder, 1982).

3.2.2 DNA-MODIFISERINGSREAKSIES

In hierdie afdeling word die algemene kondisies vir die behandeling van gesuiwerde plasmiede met restriksie-endonukleases en die daaropvolgende modifisering van die DNA-fragmente met behulp van die Klenow-fragment van DNA polimerase I, kallderm alkaliese fosfatase en T4 DNA-ligase beskryf.

Restriksie-endonukleases is van die New England Biolabs en Boehringer Mannheim aangekoop. Behandeling van die onderskeie plasmiede of DNA-fragmente met die restriksie-endonukleases is volgens voorskrif van die betrokke vervaardiger uitgevoer. Ensiemreaksies is deur byvoeging van 'n tiende volume 0,5 M EDTA (pH8,0) getermineer. Vir herwinning van DNA-materiaal deur etanolpresipitering is 'n gelyke volume 7,5 M ammoniumasetaat aanvanklik bygevoeg. Na ekstraksie met 'n gelyke volume chloroform-isoamielalkoholmengsel (24:1) is die boonste DNA-bevattende

waterfase onttrek en met twee tot drie volumes vrieskoue 100% etanol gemeng, waarna hierdie mengsel oornag by -20°C gelaat is. Die etanolgepresipiteerde DNA is herwin deur sentrifugering vir 30 minute in 'n Eppendorf-banksentrifuge by 4°C . Hierna is die DNA-presipitaat twee keer met vrieskoue 70% etanol onder dieselfde sentrifugeringskondisies gewas. Na vakuumdroging is die presipitaat, afhangend van die volgende stap, vir 30 minute by 37°C in 'n bepaalde volume Robertsbuffer gesuspendeer.

In die meeste gevalle resulteer snitte met restriksie-endonukleases in die vorming van 5'-oorhangende termini. Indien nodig, is hierdie termini met behulp van die Klenow-fragment van DNA-polimerase I (Boehringer Mannheim No. 104 523) opgevolg. 'n Tipiese reaksiemengsel van $100\ \mu\text{l}$ is saamgestel uit 50 mM Tris (pH7,9); 6 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; 5 μg hoogsgesuiwerde BSA; 0,1 mM van elke dNTP; 5 U Klenow-fragment en tot 20 μg van die betrokke DNA-fragment(e). Na inkubasie van twee uur in 'n 24°C waterbad is elke sodanige ensiemgekataliseerde stap aan 'n chloroform-isoamielalkoholekstraksie (24:1) onderwerp met die oog op die verwydering van proteïenmateriaal. Die oorblywende nukleïensure is herwin deur etanolpresipitering soos hierbo beskryf.

Alkaliese fosfatase kataliseer hidrolise van monofosfaatgroepe vanaf 5'-termini van DNA. Deur van fragmente met gefosforileerde en gedefosforileerde termini gebruik te maak, kan ligering van fragmente gerig word. Defosforilering van 5'-termini van DNA-fragmente is met behulp van kalfderm alkaliese fosfatase (Boehringer Mannheim No. 405612) uitgevoer. Hierdie ensiem is in konsentrasies van $1\ \text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in 50% (v/v) steriele gliserol gesuspendeer en in 10 μl hoeveelhede vir tot drie maande by -70°C geberg. 'n Tipiese reaksiemengsel van 30 μl vir fosfatasebehandeling is saamgestel uit: 50 mM Tris (pH9,0); 1 mM MgCl_2 ; 0,1 mM ZnCl_2 ; 1 mM spermidien; 1 U alkaliese fosfatase en tot 20 μg van die betrokke DNA-fragment(e). Afhangend of oorhangende 5'-termini of 3'-termini gedefosforileer word, wissel die inkubasietye en temperatuur. Vir defosforilering van 5'-termini word 1 U alkaliese fosfatase na 'n inkubasietyd van 30 minute bygevoeg, waarna die reaksiemengsel vir 'n verdere 30 minute by 37°C geïnkubeer word. Vir defosforilering van 3'-termini of

stomppunttermini is die reaksiemengsel agtereenvolgend vir 15 minute by 37°C en 15 minute by 56°C geïnkubeer. Na byvoeging van 'n verdere 1 U alkaliese fosfatase is die inkubasieproses herhaal. Hierdie metode is 'n wysiging van die metode van Sambrook *et al.* (1989).

Die DNA-fragment(e) is met behulp van die Geneclean™-metode (Amersham) gesuiwer en behels kortliks die volgende. Die fosfatase-behandelde DNA-fragment(e) is op 'n 1% agarosegel geskei, waarna die betrokke fragmente uit die agarose gesny is. Drie volumes 6 M natriumjodied word by hierdie DNA-bevattende agarose-stukkies gevoeg en vir 10 minute in 'n 55°C waterbad geïnkubeer. Nadat die agarose deur die NaI opgelos is, is 20 µl glasmelk ('n silikamatriks-suspensie) bygevoeg en die mengsel vir 20 minute op ys geïnkubeer sodat binding van die DNA aan die silikamatriks kan plaasvind. Na sentrifugering vir 10 minute in 'n Eppendorfbanksentrifuge, is die gepresipiteerde glasmelk drie keer met 50 volume Geneclean New Wash™ gewas. Die presipitaat is in 100 µl Robertsbuffer gesuspenseer en vir 5 minute by 56°C geïnkubeer om die DNA vanaf die silikamatriks-glasmelk vry te stel. Na 'n kort sentrifugering is die boonste fase versigtig afgetrek en in 'n skoon Eppendorf-buisie geplaas. Die konsentrasie van die fragmente is teenoor 'n DNA-konsentrasiereeks met behulp van agarosegel-elektroforese bepaal.

Ligering van die verskillende DNA-fragmente is met behulp van T4 DNA-ligase (Boehringer Mannheim No. 716 359) uitgevoer. 'n Tipiese reaksiemengsel van 20 µl bevat die volgende: 50 mM Tris (pH7.8); 10 mM MgCl₂; 20 mM DTT; 1 mM ATP; 5 µg gesuiwerde BSA; 1 U T4 DNA-ligase en die betrokke DNA-fragmente. Die betrokke DNA-fragmente bestaan uit 50 ng vektorvolgorde en 'n ekwimolêre hoeveelheid DNA-fragment. Na inkubasie van tussen twee en vyf uur by 21°C is 2 µl ligeringsmengsel vir die transformering van kompetente *E. coli* K12-MC1061-selle (soos beskryf in Afdeling 3.2.3) gebruik. Ligeringsmengsels kan ook in hierdie stadium by -70°C weggevries word.

Die toepaslikheid en aanwendingsvolgorde van die verskillende modifiseringstappe verskil vir die onderskeie plasmiedkonstruksies. Die wyse waarop die onderskeie stappe uitgevoer is, word diagrammaties in Hoofstuk 4 toegelig.

3.2.3 TRANSFORMERING EN KLONERING VAN *E. COLI* K12-MC1601

Transformering van die kompetente *E. coli* K12-MC1061-selle met die ligeringsmengsel is soos volg uitgevoer. Kompetente selle is onder steriele toestande volgens 'n aangepaste metode van Hanahan (1983) voorberei. Entkulture van *E. coli* K12-MC1061-selle is oornag in Luriasop² gekweek. Vir grootskaalse kweking is 0,5 ml van die oornagkultuur in 250 ml Luriasop geïnkuleer en by 37°C geïnkubeer totdat 'n absorbansiewaarde van 0,2 tot 0,4 by A₆₅₀ nm bereik is.

Hierna is die kultuur met roering vir 10 minute in yswater afgekoel en vir 10 minute by 1500 opm en 4°C in 50 ml polipropileenbuis (Falcon No. 2098) gesentrifugeer. Die presipitaat is versigtig in 0,5 ml transformeringsbuffer [60 mM CaCl₂; 10 mM Pipes (pH7,0); 15 g% (m/v) gliserol] gesuspendeer, waarna die volume met dieselfde buffer tot 10 ml aangevul is. Nadat die suspensie 20 tot 30 minute op ys gelaat is, is die selle weer deur sentrifugering gepresipiteer en in 0,5 ml transformeringsbuffer hergesuspendeer. Die volume is tot 3 ml verhoog, waarna die kompetente selle in 0,5 ml hoeveelhede by -70°C weggevries is.

Vir 'n tipiese transformeringsreaksie is 20 µl van die kompetente selsuspensie liggies met 2 µl van die betrokke ligeringsmengsel (Afdeling 3.2.2) gemeng. Hierdie suspensie word vir 20 minute op ys gelaat en daarna vir 'n verdere vyf minute by 37°C geïnkubeer. Tweehonderd µl Luriasop, verwarm tot 37°C, word bygevoeg, waarna die suspensie vir 'n verdere 30 minute by 37°C geïnkubeer word. Die transformeringsuspensie word in 100 µl-hoeveelhede met behulp van steriele glas L-pype op Luria-agarplate² versprei. Hierdie plate is vir 16 tot 18 uur by 37°C geïnkubeer.

² Een liter Luriasop word saamgestel uit 10 g Bacto-triptoon; 5 g Bacto-gisekstrak; 5 g NaCl en 1 g glukose. Die pH van 7,5 word met behulp van NaOH ingestel. Vir Luria-agarplate word 12 g Bacto-agar by bogenoemde mengsel gevoeg. Na sterilisasie is die medium tot 60°C afgekoel en in petribakkies gegiet. Ampisillienweerstandbiedende klone word op Luria-agarplate wat 0,5 mg% (m/v) ampisillien bevat, gekweek. Na sterilisasie en afkoeling tot 60°C van die Luria-mengsel word die ampisillien bygevoeg.

Die Luria-agarplate waarop die transformeringsuspensie versprei is, bevat die antibiotikum ampicillien tot 'n finale konsentrasie van 0,5 mg% (m/v). Hierdie plate dien as seleksiemiddel, aangesien alle konstrakte sodanig beplan is dat hulle die ampicillienweerstandbiedendheidsvolgorde bevat. Slegs transformante waarin hierdie weerstandbiedendheidsvolgorde voorkom, is dus in staat om op hierdie spesifieke Luria-agarplate te groei. Om daardie kolonies wat die korrekte plasmied-DNA bevat op te spoor, is van die vinnige plasmiedisoleringmetode (RAPS) gebruik gemaak. Vinnige isolering van plasmied-DNA uit individueel getransformeerde kolonies is volgens die metode van Holmes en Quigley (1981) uitgevoer. Steekkulture van individuele kolonies is oornag by 37°C in 5 ml Luriasop met 1 mg% (m/v) ampicillien gekweek. Presipitering van die bakterieë is na sentrifugering van 15 minute by 4500 opm verkry. Na dekantering van die supernatant is die bakterieë in 150 µl STET-buffer [8 g% (m/v) sukrose, 5% Triton-X100; 50 mM EDTA (pH8,0); 50 mM Tris (pH8,0)] gesuspendeer. Hierby is 15 µl van 'n 10 mg.ml⁻¹ lisosiem-oplossing (Boehringer Mannheim No. 107255) vars voorberei in STET-buffer, gevoeg. Vir optimale werking van die ensiem is die suspensie vir 60 sekondes in 'n kokende waterbad verhit en direk op ys geplaas. Bakteriese reste is deur sentrifugering in 'n Eppendorfbanksentrifuge vir 30 minute by 4°C gepresipiteer. Na versigtige onttrekking van die supernatant en oordrag in 'n skoon Eppendorf-buisie, is 'n gelyke volume isopropanol bygevoeg. Sentrifugering van plasmied-DNA is vir 30 minute by 4°C uitgevoer nadat die plasmied-DNA-mengsel vir 10 minute by -70°C en 60 minute by -20°C geïnkubeer is. Na verwydering van die supernatant is die buisies versigtig uitgedroog en die presipitaat onder vakuum gedroog. Die presipitaat is in 50 µl Robertsbuffer vir 30 minute by 37°C gesuspendeer.

3.3 VOORBEREIDING EN RADIOAKTIEWE MERKING VAN DNA-FRAGMENTE

3.3.1 ISOLERING VAN DNA-FRAGMENTE

Volledige endonukleasevertering en korrekte isolering van die DNA-fragmente is 'n noodsaaklike voorvereiste vir die suksesvolle gebruik van hierdie fragmente by onder

meer DNase I-afskermingsanalises. Die DNA-fragmente is oor die algemeen soos volg geïsoleer: Die DNA-fragment is deur middel van 'n dubbele endonukleasevertering uit die plasmied verwyder, terwyl tegelykertyd 'n fosfatasereaksie uitgevoer is om die 5'-fosfaatgroepe te verwyder. Na inkubering van hierdie reaksiemengsel vir twee uur by 37°C is 10 µl laaibuffer [2 g % (m/v) Ficoll; 0,5 g % (m/v) SDS; 50 mM EDTA (pH8,0); 0,2 g % (m/v) Orange G] bygevoeg. Die reaksiemengsel is met behulp van elektroforese in 'n 5 % poli-akrielamiedgel vir 2,5 uur teen 150 V geskei. Die betrokke DNA-fragment is met behulp van UV-bestraling by 340 nm gelokaliseer en uitgesny. Nadat die gelstukkies fyngedruk is, is die DNA uit die gel geëluëer deur die mengsel oornag by 37°C op 'n wiel te draai in die teenwoordigheid van twee volumes Maxam en Gilbert elueringsbuffer [500 mM ammoniumasetaat (pH 7,0); 10 mM magnesiumasetaat; 1 mM EDTA]. Na sentrifugering vir 15 minute, is die gelreëte nog een keer met 200 µl elueringsbuffer gewas. Die DNA is na etanolpresipitering, soos voorheen beskryf, oornag in 50 µl TE-buffer [10 mM Tris (pH8,0); 1 mM EDTA] gesuspendeer. Die konsentrasie van die geïsoleerde DNA-fragment is met behulp van spektrofotometrie by A_{260} in 'n Beckman DU 7500-spektrofotometer bepaal.

3.3.2 RADIOAKTIEWE MERKING VAN DNA-FRAGMENTE

3.3.2.1 5'-RADIOAKTIEWE MERKING

Die 5'-termini van fosfatase behandelde DNA-fragmente (Afdeling 3.2.2) is radioaktief gemerk met behulp van die bakteriofaag T4 polinukleotiedkinase. In die voorwaartse reaksie wat plaasvind, kataliseer die PNK-ensiem die oordrag van die γ - ^{32}P -dATP na die hidroksielgroep wat na fosfatasebehandeling ontstaan het. Die reaksie is volgens 'n wysiging van die standaardmetode van Sambrook *et al.* (1989) uitgevoer. 'n Tipiese 20 µl-reaksiemengsel is saamgestel uit 3 pmole 5'-termini van gedefosfateerde DNA-fragment; PNK-buffer [50 mM Tris (pH7,5); 10 mM MgCl_2 ; 5 mM DTT; 0,1 mM spermidien; 0,1 mM EDTA]; 10 µCi γ - ^{32}P -dATP (spesifieke aktiwiteit van 3000 Ci/mole, Amersham) en 1 µl PNK (8U/µl; Promega). Na 'n inkubasie van

een uur by 37°C is die DNA-fragment met 'n spesifieke restriksie-endonuklease vir 'n verdere een uur by 37°C behandel, sodanig dat na vertering net een van die DNA-stringe radioaktief gemerk is. Na byvoeging van 1 μ l 5 M NaCl is die reaksiemengsel opeenvolgend met 'n gelyke volume fenol:chloroform:isoamielalkoholmengsel (25:24:1) en 'n gelyke volume chloroform:isoamielalkoholmengsel (24:1) geëkstraheer. Die boonste waterige fase is onttrek en die gemerkte DNA is oornag deur middel van etanolpresipitering herwin. Na sentrifugering vir 10 minute by 4°C is die supernatant onttrek en die presipitaat is vakuumedroog en vir 30 minute in 100 μ l TE-buffer by 37°C gesuspendeer. Die radioaktiefgemerkte fragmente kan by 4°C gebêre word. Aangesien daar nie van die ongeïnkorporeerde radioaktiwiteit ontslae geraak is nie, is hierdie radioaktiefgemerkte DNA-fragmente direk vir die eksperimente gebruik sonder om die spesifieke aktiwiteit te bepaal.

3.3.2.2

VERVANGINGSMERKING

Vervangingsmerking is volgens 'n aangepaste metode van Lawn *et al.* (1980) uitgevoer. Ongeveer 100-200 ng DNA van 'n betrokke DNA-peiler is radioaktief gemerk met 25 μ Ci α -³²P-dCTP (Amersham). Vir die samestelling van 'n tipiese reaksiemengsel is 25 μ l etanolopgeloste α -³²P-dCTP (> 3 000 Ci/mmol) in 'n Kimble-buisie drooggedamp. Die 20 μ l reaksiemengsel is dan soos volg in dieselfde buisie saamgestel: 50 mM Tris by pH 7,9; 6 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 50 μ g.ml⁻¹ hoogsgesuiwerde BSA; 0,1 mM van dATP, dTTP, dCTP en dGTP asook 0,015 ng DNase I (Boehringer Mannheim No. 104 159). Na inkubasie van 15 minute by 37°C is 5 U endonuklease-vrye *E. coli* DNA polimerase I (Boehringer Mannheim No. 642 711) by die reaksiemengsel gevoeg. Hierdie stap is opgevolg met 'n verdere inkubasie van 2 tot 2,5 uur by 15°C. Die reaksie is daarna deur byvoeging van 5 μ l 0,5 M EDTA getermineer.

Vir die skeiding van radioaktiefgemerkte DNA-fragmente en vrye dNTP's is uitsluitingschromatografie op 'n Sephadex G-50 kolom van 260 mm x 10 mm

uitgevoer. Kolombuffer wat tydens die uitsluitingschromatografie gebruik is, is saamgestel uit 10 mM Tris (pH 7,5); 100 mM NaCl; 1 mM EDTA en 0,1 g% (m/v) SDS. Die eerste vyf fraksies waarin die α - ^{32}P -dCTP gemerkte peiler voorkom, is in 'n 15 ml polipropileenbuis versamel. Ongeveer 10 μl van die versamelde volume is na toevoeging van 0,5 ml Aquasolve I aan vloeistofsintillasiespektrometrie onderwerp. Die spesifieke aktiwiteit van die α - ^{32}P -gemerkte peilers is uit dié waardes bepaal en het gewissel tussen 1×10^8 en 3×10^8 tpm. μg^{-1} DNA. Terselfdertyd is die restant van die versamelde volume aan etanolpresipitering onderwerp na byvoeging van 10 μl 4 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ gesoniseerde salmsperm DNA en NaCl tot 'n finale konsentrasie van 0,3 M.

Etanolgepresipiteerde α - ^{32}P -gemerkte peilers is in 'n Beckman JS-13 rotor teen 9 000 opm en -10°C vir 1 uur gesentrifugeer. Na versigtige dekantering van die supernatant is die presipitaat gedroog onder vakuum en vir 30 minute by 37°C in 200 μl van die volume weer aan vloeistofsintillasiespektrometrie onderwerp en is die spesifieke aktiwiteit weer bereken. Die spesifieke aktiwiteit na etanolpresipitering is gewoonlik tussen 85% en 100% van die oorspronklike berekende spesifieke aktiwiteit van die α - ^{32}P -gemerkte peilers.

3.4 DNASE I-AFSKERMINGSANALISE

Hierdie tegniek is volgens die metode van Briggs *et al.* (1986) uitgevoer. Die 50 μl reaksiemengsel is saamgestel uit die betrokke hoeveelheid ruwe kernekstrak (geskenk deur mej. W.N. de Vries) of suiwer proteïene (aangekoop van Promega), 5 μl 5'-gemerkte DNA-fragment en bindingsbuffer [25 mM Tris (pH8,0); 0,05 M KCl; 6,25 mM MgCl_2 ; 0,5 mM EDTA; 10 g% (m/v) gliserol; 0,5 mM DTT]. In die geval van die ruwe kernekstrak, is 'n voorafbepaalde konsentrasie poli dI-dC ook bygevoeg om as nie-kompeteerder te dien. Die reaksiemengsel is vir 15 minute op ys geïnkubeer, waarna 'n gelyke volume 10 mM MgCl_2 /5 mM CaCl_2 -mengsel bygevoeg is en vir een minuut by kamertemperatuur geïnkubeer is. 'n Spesifieke verdunning van DNase I wat vooraf vir elke individuele DNA-fragment gestandaardiseer is, en vars saamgestel

is uit 5 μ l DNase I (Promega) in 100 μ l Tris, (pH8,0) is by die reaksiemengsel gevoeg en vir presies een minuut by kamertemperatuur geïnkubeer. Negentig mikroliter stopbuffer [0,2 M NaCl; 0,03 M EDTA; 1 g% (m/v) SDS; 100 μ g.ml⁻¹ tRNA] vooraf verhit tot 37°C, is bygevoeg, waarna 'n fenol:chloroform: isoamylalcohol (25:24:1)-ekstraksie uitgevoer is. Na oornag etanolpresipitering is die DNA deur middel van sentrifugering vir 15 minute in 'n Eppendorf-banksentrifuge herwin en vir 15 minute onder vakuum gedroog. Cerenkov-telling van die presipitaat is met behulp van die sintillasieteller in die ¹⁴C-kanaal uitgevoer, waarna die presipitaat in laaibuffer [0,1 M NaOH:formamied (1:2 v/v); 0,1 g% (m/v) xileensianol; 0,1 g% (m/v) bromofenolblou] gesuspendeer is in sodanige hoeveelheid dat daar ewe veel tellings per minuut per mikroliter in elke buis voorkom. Die monster is dan vir drie minute in 'n kokende waterbad verhit, waarna dit direk op ys geplaas is. Vier mikroliter van elke monster is hierna op 'n 6% of 8% denaturerende poliakrielamiedgel (38:2) gelaai en elektroforese is teen 70 W in die teenwoordigheid van 1 x TBE-buffer uitgevoer (Afdeling 3.6). Na elektroforering vir die bestemde tyd is die gel vir 2,5 uur onder vakuum by 80°C gedroog en aan 'n X-straaalfilm (Cronex 105) by -70°C vir ten minste 24 uur blootgestel.

3.5 MAXAM EN GILBERT-VOLGORDEBEPALING

'n Belangrike deel van onder meer die DNase I-afskermingsanalise is om te bepaal waar in die betrokke DNA-fragment die afskerming plaasvind. Die gebruik van die Maxam en Gilbert-volgordebepaling tesame met die DNase I-afskermingsanalise, gee 'n goeie aanduiding waar in die betrokke DNA-fragment afskerming plaasvind. Hierdie Maxam en Gilbert-volgordebepaling is uitgevoer soos wat dit in Ausubel *et al.* (1987) beskryf is. Hoewel vier verskillende reaksies, naamlik G, G+A, T+C en C tydens die Maxam en Gilbert-volgordebepaling uitgevoer kan word, is in hierdie ondersoek net die G+A en T+C-reaksies uitgevoer en slegs hierdie twee reaksies word beskryf. 'n Tydsafhanklike eksperiment is vir elke DNA-fragment uitgevoer, sodat die optimale inkubasietyd van elke fragment vasgestel kon word.

Die metode wat uitgevoer is, is kortliks soos volg: Tien mikroliter DNA-fragment waarvan slegs die een string 5'-radioaktief gemerk is (Afdeling 3.3.2.1), is in Eppendorf- buisies geplaas. By die T+C-reaksiemengsel is 'n verdere 10 μl dH_2O gevoeg. Vir die G+A-reaksie om plaas te vind, word 25 μl mieresuur by die DNA-fragment gevoeg en vir die voorafbepaalde tyd by 25°C geïnkubeer. Die suur veroorsaak 'n verswakking van die adenien en guanien glikosidiese bande. By die T+C-reaksie word 30 μl hidrazien gevoeg en ook vir die voorafbepaalde tyd by 25°C geïnkubeer. Hidrazien veroorsaak splyting van die timien- of sitosienring wat ringfragmente tot gevolg het. Hierdie ringfragmente kan later weer deur piperidien van die suiker verwyder word. Na inkubasie by 25°C is die reaksie deur byvoeging van 200 μl hidrazienstopbuffer [0,3 M NaAc (pH7,0); 0,1 mM EDTA; 25 μg tRNA.ml⁻¹] gestop. Ongeveer 750 μl vrieskoue 100% etanol is bygevoeg en die reaksiemengsel vir 5 minute in 'n droë-ysetanolbad gelaat sodat die DNA kan presipiteer. Die mengsel is vir 5 minute by 4°C in 'n Eppendorf-banksentrifuge gesentrifugeer en daarna twee keer met vrieskoue 70% etanol gewas. 'n Tweede presipiteringstap is uitgevoer om seker te maak dat alle chemikalieë verwyder is. Dit is gedoen deur die presipitaat in 200 μl water te suspendeer en te presipiteer deur die byvoeging van 20 μl 3 M NaAc (pH5,2) en 500 μl vrieskoue 100% etanol. Presipitering, sentrifugering en die wasstappe is uitgevoer presies soos tydens die eerste presipiteringstap. Nadat die presipitate vir 5 minute onder vakuum gedroog is, is die presipitaat in 70 μl 10 g% (m/v) piperidien gesuspendeer en na 'n skoon skroefprop Eppendorf-buisie oorgedra. Piperidien kataliseer die splytingsreaksie van die veranderde base. Die gesuspendeerde mengsel is vir 30 minute in 'n kokende waterbad geplaas waarna die piperidien verwyder is deur droging vir ongeveer 1,5 uur onder vakuum. Om van die piperidien ontslae te raak, is die presipitaat nog twee keer gewas, deur die presipitaat onderskeidelik in 30 μl en daarna 20 μl H_2O te hersuspendeer en telkens onder vakuum te droog. Die onderskeie monsters is dan gereed om aan sintillasietelling deur Cerenkov onderwerp te word en op die denaturerende poliakrielamiedgel gelaai te word soos beskryf word in Afdelings 3.4 en 3.6.

3.6 POLI-AKRIELAMIEDGELLE

Tydens DNase I-afskermingsanalise is deurgaans van 6% of 8% denaturerende poli-akriëlamiedgelle gebruik gemaak. 'n Mengsel van akriëlamied: bisakriëlamied (38:2, Sigma) is eerstens aangemaak. Om van die onsuierhede in die akriëlamiedmengsel ontslae te raak, word geaktiveerde koolstof bygevoeg en die mengsel vir ongeveer 1,5 uur geroer. Filtrering deur dubbel Whatman nr 1-filtreerpapier is gebruik om die koolstof weer te verwyder. Die akriëlamiedmengsel kan in hierdie stadium by 4°C in die donker gebêre word.

Vir die samestelling van die 6% of 8% poli-akriëlamiedgel is die regte hoeveelheid akriëlamiedmengsel in 8 M ureum en dH₂O opgelos. Ureum verminder die effek van sekondêre DNA-strukture op die elektroforesemobiliteit. Die oplossing is vir 20 minute in die teenwoordigheid van 'n dubbelbed ioon-uitruiler geroer. Om die ioon-uitruiler te verwyder, is die oplossing deur Whatman nr 1-filtreerpapier gefiltreer, waarna 'n tiende volume 10 x TBE-buffer bygevoeg word sodat die eindkonsentrasie 1 x TBE-buffer is. (1 x TBE-buffer is saamgestel uit 44 mM Tris (Boehringer); 44 mM boorsuur; 1,2 mM EDTA). Glasplate, waarvan een gesileer is om te voorkom dat die gel aan die glasplate vassit, is stewig op mekaar geplak met tussenin spasieerders aan die sykante. Hierdie spasieerders word geleidelik dikker van 0,4 mm tot 1,2 mm na die onderkant van die glasplate. Die gebruik van hierdie tipe spasieerders voorkom dat die bane tydens elektroforese in 'n punt aan die onderkant van die gel saamtrek.

'n Prop van 7,5 ml van die poli-akriëlamiedmengsel is na die byvoeging van een tiende volume TEMED en een tiende volume 10% ammoniumpersulfaat gegiet om te voorkom dat die gel aan die onderpunt lek. Na polimerisering van ongeveer 15 minute, is die res van die poli-akriëlamiedmengsel na toevoeging van die tiende volume TEMED en die tiende volume 10% ammoniumpersulfaat met behulp van 'n 50 ml spuit versigtig gegiet. Nadat seker gemaak is dat daar geen borrels in die gel voorkom nie, is die plate horisontaal neergesit en 'n 15-put kam in die gel gedruk. Na polimerisering van ongeveer 'n uur is die kam versigtig onder water uitgetrek en

die gel in die elektroforese-apparaat opgestel. Die reservoirs van die apparaat is met 1 x TBE-loopbuffer opgevul. Die gels is gewoonlik oornag gelaat voordat dit gebruik is. In alle gevalle is die gels voor gebruik vir 45 minute gepreëkwilibreer. Die putte is direk voor gebruik met behulp van 'n spuit, uitgespoel om van oortollige ureum ontslae te raak. Die gels is nadat die monsters in die putte gelaai is vir 'n bepaalde tyd by 70 W aan elektroforese onderwerp. Die tyd wat die gels aan elektroforese onderwerp is, word bepaal deur die lengte van die fragment en die posisie waar die verwagte afskerming sou voorkom. Na elektroforese is die gel uit die apparaat gehaal en is die boonste glasplaat versigtig van die gel verwyder. Die gel is dan oorgedra op 'n Whatman nr. 1-filtreerpapier en bo-op 'n Whatman nr. 3-filtreerpapier in die geldroër geplaas. Nadat die gel vir ongeveer 2,5 uur by 80°C onder vakuum gedroog is, is dit vir ten minste 24 uur aan 'n X-straalfilm by -70°C blootgestel (Ausubel *et al.*, 1987; Rickwood & Hames, 1982).

Vir die isolering van DNA-fragmente asook vir die bepaling of radioaktiefgemarkte DNA-fragmente korrek gemerk het, is daar van 5% nie-denaturerende poli-akriëlamiedgelle gebruik gemaak. Die akriëlamiedmengsel is aangemaak soos hierbo beskryf, behalwe dat die akriëlamied: bisakriëlamied in 'n verhouding van 29:1 aangemaak word. Hierdie poli-akriëlamiedgelle is saamgestel uit die benodigde hoeveelheid akriëlamiedmengsel, water; 1 x TBE-buffer en een tiende volume TEMED. Die gel bestaan uit 'n propgedeelte en 'n skeigel. Die prop is gegiet terwyl die skeigel vir 15 minute ontgas is. Nadat die prop gepolimeriseer het, is die skeigel na toevoeging van die 10% ammoniumpersulfaat gegiet, die bepaalde kam is in die gel gedruk en die gel is vir 15 minute gelaat om te polimeriseer. 'n Verskil van die vorige gel is dat die glasplate op die elektroforese-apparaat saamgestel word, waarna die gel tussen die twee plate gegiet word. Die spasieerders wat gebruik word, is ewe dik van bo na onder naamlik 1,2 mm. Die reservoirs van die apparaat word weer eens met 1 x TBE-loopbuffer opgevul. Die kam is onder 1 x TBE-loopbuffer uit die gel getrek en die putte met behulp van 'n spuit goed uitgespoel. Elektroforese van die 5% poli-akriëlamiedgels is gewoonlik vir 2,5 uur teen 150V uitgevoer, waarna dit, indien dit gedroog en blootgestel moet word, by 60°C vir een uur gedroog is. Die gel is dan oornag aan 'n X-straalfilm by -70°C blootgestel.

3.7 ISOLERING VAN TOTALE RNA EN POLI(A)-mRNA

RNA is uit sowel *X. laevis* oösierte as die verskillende weefselkulture geïsoleer. Dit is opgevolg deur 'n verryking van poli(A)-bevattende mRNA uit die totale RNA. Totale RNA is na homogenisering van 5 tot 15 oösierte van elke eksperiment uit die homogenaat geïsoleer. Die oösierte is in 0,5 ml homogeniseringsbuffer (10 mM NaCl, 2 g% (m/v) SDS; 2 mM MgCl₂; 1 mg.ml⁻¹ proteïenase K; 10 mM Tris by pH 7,5) gevoeg. Die totale RNA is met behulp van 'n fenol:chloroformekstraksie na homogenisering geëkstraheer en aan etanol presipitering onderwerp (Probst *et al.*, 1979).

Totale RNA is uit vier 25 cm²-flesse met getransfekteerde selle geïsoleer. Elke fles is twee tot drie keer met PBS gewas, waarna 1,5 ml homogeniseringsbuffer (10 mM Tris by pH 7,5; 4 mM EDTA; 1 g% (m/v) SDS; 100 µg.ml⁻¹ proteïenase K) by elke fles gevoeg is. Die selsuspensie is vir vyf minute by kamertemperatuur gelaat waartydens sellise plaasgevind het. Lisate is hierna in 'n 50 ml polipropileenbuis versamel. Hoë molekulêre massa DNA in die lisaat is meganies deur homogenisering gedegradear, waarna die lisaat een tot twee uur by 43°C geïnkubeer is (Burnett en Rosenbloom, 1979). Na inkubasie is die lisaat twee keer met 'n mengsel van 'n gelyke volume fenolchloroform-isoamielalkohol (50:50:1) geëkstraheer. Die boonste nukleïensuurbevattende waterfase is telkens onttrek en in 'n skoon 50 ml polipropileenbuis oorgedra. Hierna is die boonste waterfase by -20°C in die teenwoordigheid van natriumchloried aan etanolpresipitering onderwerp.

Etanol-gepresipiteerde nukleïensure is vir 1 uur by -4°C herwin deur sentrifugering in 'n Beckmanrotor JS-13 teen 9 000 opm. Die presipitaat is een maal met vrieskoue 70% etanol onder dieselfde sentrifugeringskondisies gewas en gevakuümdroog. Nadat die RNA in 100 µl steriele water gesuspendeer is, is dit met behulp van UV-spektrometrie by 260 nm gekwantifiseer en by óf -20°C óf -70°C weggevries.

Poli(A)-mRNA is met behulp van affiniteitschromatografie uit totale RNA volgens die metode van Werner *et al.* (1984) geïsoleer.

Hybond-mAPTM-papier (Amersham) is in blokkies van 1 cm² gesny en gelugdroog nadat dit in 0,5 M NaCl benat is. Ongeveer 50 tot 100 µl totale RNA is vir vyf minute tot 65°C in 'n waterbad verhit en op ys afgekoel. NaCl is tot 'n finale konsentrasie van 0,5 M hierby gevoeg. Nadat die voorbereide Hybond-mAPTM 1 cm²-blokkies in 'n skoon petribakkie geplaas is, is die RNA daarop oorgedra. Die voorbereide RNA is in 20 µl-hoeveelhede op die filterblokkie geplaas en tussen elke toevoeging vir vyf tot tien minute gelaat om te droog. Deur gebruik te maak van 'n etanol-gevlamde tang is die filterblokkie hierna op 'n skoon filtreerpapier (Whatman nr. 3) geplaas. Die agtergeblewe vloeistof in die petribakkie is op die filter oorgedra, waarna die filter laat staan is om te droog. Nadat die filter in 'n sluitbare polipropileenbuis van 15 ml oorgedra is, is die filter soos volg gewas:

Drie keer met 5 ml 0,5 M NaCl vir 5 minute;

Een keer met 5 ml 0,25 M NaCl vir 5 minute;

Een keer met 5 ml 0,15 M NaCl vir 5 minute; en

Drie keer met 5 ml 70% etanol (kamertemperatuur) vir 2 minute.

Die wasprosedure is uitgevoer deur die buis stadig heen en weer te laat beweeg op 'n skudmasjien. Na die laaste was is die filter weer op filtreerpapier geplaas en gedroog totdat alle oortollige etanol verdamp het. Hierna is die filter in 'n steriele Eppendorf-buisie geplaas en na toevoeging van 300 µl steriele water in 'n waterbad van 70°C vir 5 minute verhit. Deur die filter aan die bopunt van die buisie te plaas en liggies in 'n Eppendorf-banksentrifuge te sentrifugeer, is die RNA-oplossing uit die filter geswaai. Na verwydering van die filter is 2 µl van 20 µg·µl⁻¹ gis tRNA by die agtergeblewe oplossing gevoeg. Daarna is dit soos voorheen beskryf aan normale etanolpresipitering onderwerp. Filterblokkies is te alle tye slegs met 'n etanol-gevlamde tang gehanteer.

3.8 KWANTIFISERING VAN SPESIFIEKE mRNA

Verrykte poli(A)-mRNA, geïsoleer uit totale RNA (Afdeling 3.7), is met behulp van die DOT-BLOT-metode (De Wet *et al.*, 1983) gekwantifiseer. 'n Verdunningsreeks

van die poli(A)-mRNA is opgestel, sodanig dat ekwivalente hoeveelhede poli(A)-mRNA onafhanklik van die beginkonsentrasie, vir elke geïsoleerde RNA op die nitrosellulosemembrane geplaas is. Aangesien daar van verskillende peilers in hierdie studie gebruik gemaak is, is identiese nitrosellulosemembrane vir elke peiler voorberei.

Die nitrosellulosemembrane (Schleicher en Schuell BA 85; 0,45 μm) is voor gebruik in 1 cm^2 -blokkies afgemerk en vir ten minster agt uur in 10 x SSC geïmpregneer, waarna die membrane gelugdroog is. Ongeveer 3 μl van elke verdunning is in so 'n afgemerkte blokkie op die membraan geplaas. Na lugdroging is die membraan 2,5 uur by 78°C in 'n vakuuomond gebak. Die membraan was dan gereed vir hibridisering.

Prehibridisering van die nitrosellulosemembrane geskied by 42°C vir vier tot agt uur. Nadat die membrane in 10 x SSC benat is, is dit tesame met 25 μl prehibridiseringsmengsel. cm^{-2} in 'n Seal-a-mealTM-plastieksakkie verseël. Die prehibridiseringsmengsel is saamgestel uit 50 g% (m/v) formamied; 3 x SSC; 0,05 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ gesoniseerde salmsperm DNA; 0,1 g% (m/v) SDS en 40 mg% (m/v) elk van Ficoll, BSA en PVP. Na prehibridisering is die membraan vir twee dae by 42°C gehibridiseer. Die hibridiseringsmengsel is saamgestel uit 25 μl prehibridiseringsmengsel. cm^{-2} en 15 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ radopaktiefgemerkte peiler. Hierna is die membrane gewas.

Gehibridiseerde membrane is soos volg opeenvolgend in hoeveelhede van 500 ml gewas:

- Twee keer met 2 x SSC-0,1% SDS by kamertemperatuur vir 10 minute;
- Een keer met 1 x SSC-0,1% SDS by 50°C vir 10 minute;
- Een keer met 0,5 x SSC-0,1% SDS by 50°C vir 10 minute; en
- Een keer met 0,1 x SSC-0,1% SDS by 50°C vir 10 minute.

Na die wasproses is die membrane gedroog en vir ongeveer 24 uur by -70°C aan X-straalplate blootgestel.

Die nitrosellulosemembrane is na ontwikkeling van die outoradiogramme in die verskillende afgemerkte blokkies van 1 cm² elk opgesny. Spesifieke aktiwiteit van elke blokkie is na toevoeging van 3 ml TPP met behulp van vloeistofsintillasiespektrometrie bepaal.

HOOFTUK 4

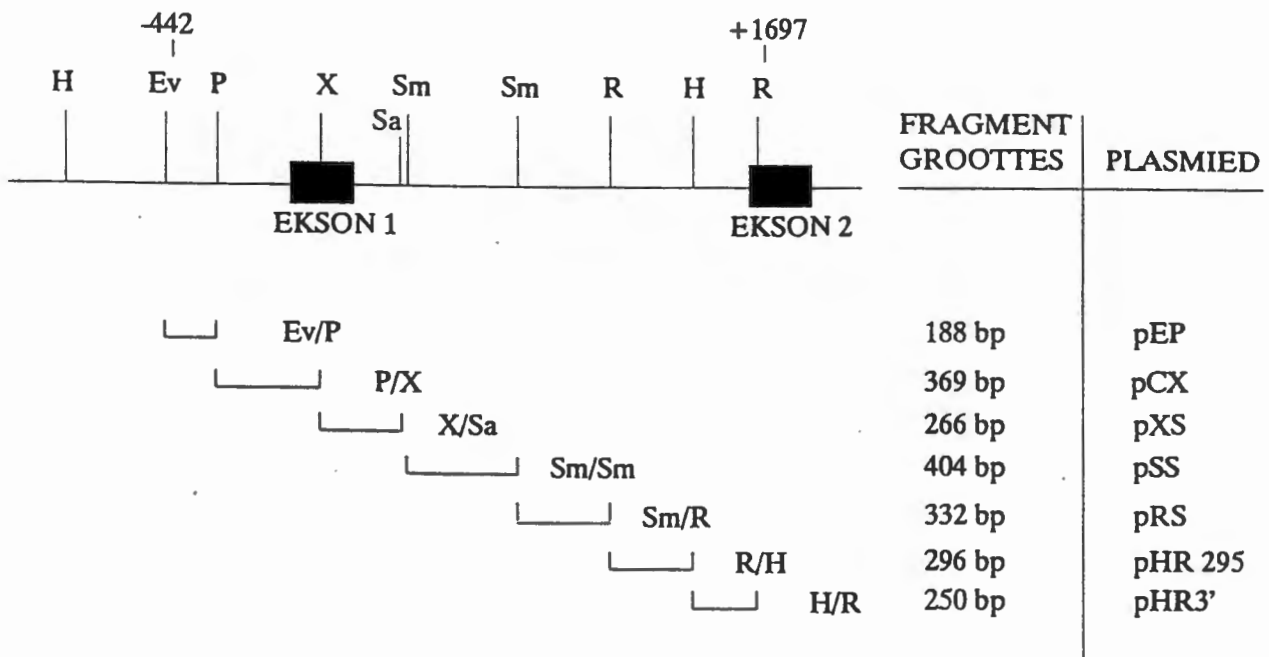
KONSTRUKSIE VAN PLASMIEDE

4.1 INLEIDING

Verskeie transkripsiefaktore bind aan die reguleringsgebiede van die mens pro- α 1(I) kollageengeen. Om te bepaal waar hierdie transkripsiefaktore bind, is die gebied van hierdie geen wat bestudeer word, vir eksperimentele doeleindes in kleiner fragmente verdeel. Hierdie verdeling is gedoen deur gebruik te maak van unieke snitpunte vir 'n aantal restriksie-ensieme wat in hierdie gebied voorkom. Die 2140 bp DNA-fragment is gevolglik in sewe fragmente met groottes wat wissel tussen 200 bp en 400 bp verdeel. Die betrokke gebied van die pro- α 1(I)-kollageengeen wat bestudeer word en die sewe fragmente waarin dit verdeel is, word diagrammaties in Figuur 4.1 voorgestel.

Elk van die sewe fragmente is in die vektor pSP64 gekloneer. Hierdie vektor is gebruik omdat dit oor 'n meerdoelige kloneringsgebied (Engels: multiple cloning site) beskik, wat pSP64 uiters geskik maak vir die klonering van fragmente wat met behulp van verskillende restriksie-ensieme verkry is. Na die klonering van die fragmente in pSP64 is die nuwe plasmiede getoets en op groot skaal gekweek soos dit in Afdeling 3.2.1. beskryf is.

In hierdie hoofstuk word die samestelling en konstruksie van die verskillende plasmiede wat in hierdie studie gebruik is, uiteengesit. In die diagrammatiese voorstellings van die verskillende konstrukte word in alle gevalle verwys na "Amp^R" as die ampicillienweerstandbiedendheidsgeen, "ori" as die oorsprong van replisering en die pyle as die rigting waarin transkripsie van die bepaalde geen plaasvind. In opvolgende hoofstukke sal na hierdie konstrukte slegs by name verwys word.



Figuur 4.1

Diagrammatiese voorstelling van die verdeling in sewe fragmente van die gedeelte van die pro- α 1(I)-kollageengeen onder bestudering. Die fragmente is verkry deur gebruik te maak van unieke snitpunte vir restriksie-ensieme in hierdie gebied. Hierdie gedeelte van die geen strek vanaf -442 tot + 1697.

Snitpunte vir die restriksie-ensieme wat gebruik is, word soos volg aangedui:

H = Hind III; Ev = Eco RV; P = Pvu II; X = Xba I;
Sa = Sac I; Sm = Sma I; R = Rsa I

Die groottes van die fragment in basepare word heel regs in die figuur aangedui, tesame met die naam van die plasmied waarin die fragment gekloneer is.

■ = dui 'n ekson aan.

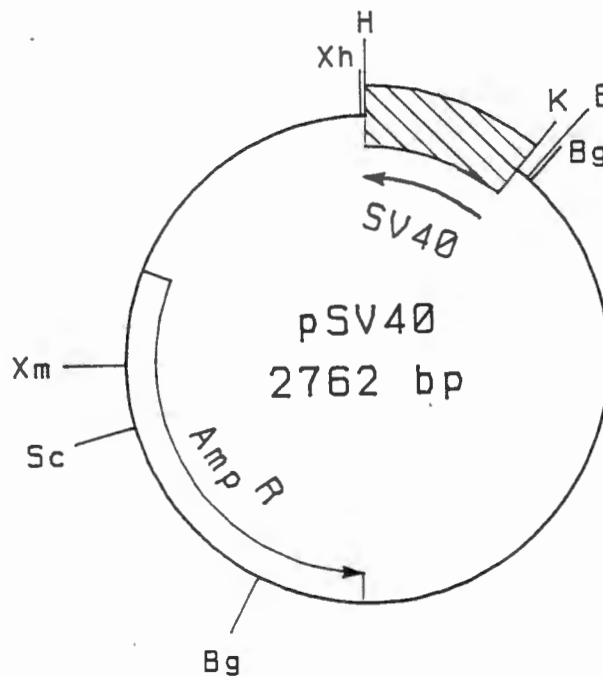
4.2 PLASMIED pSV40

Heelwat inligting ten opsigte van die SV40-vroeë promotor-DNA en die binding van transkripsiefaktore aan dié DNA, is reeds in die literatuur opgeteken (Afdeling 2.4 en Mitchell *et al.*, 1987). Op grond hiervan is besluit om in hierdie studie van SV40-DNA as standaard gebruik te maak, dit wil sê standaardisering van die eksperimentele metodes sowel as vergelykende eksperimente, is met behulp van die SV40-DNA-fragment uitgevoer. 'n Plasmied, pSV40, waarin SV40-volgordes voorkom, is vir hierdie doel van Promega aangekoop.

Plasmied pSV40 bevat 'n 300 bp Hind III - Kpn I-fragment van die SV40 vroeë promotor-DNA. Hierdie 300 bp fragment is in vektor pSP72 wat met Hind III en Kpn I voorberei is, gekloneer om plasmied pSV40 met 'n grootte van 2719 bp te vorm. 'n Skematiese voorstelling van pSV40 word in Figuur 4.2 gegee.

Vir die gebruik van hierdie 300 bp Hind III - Kpn I-fragment in DNase I-afskermingsanalise is die fragment soos volg geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk:

Die koderende string is geïsoleer en radioaktief gemerk deur plasmied pSV40 met die restriksie-ensieme Eco RI en Xho I te verteer en daarna aan behandeling met alkaliese fosfatase (Afdeling 3.2.2) te onderwerp. Na isolering van die 320 bp Eco RI - Xho I-fragment is die fragment 5'-radioaktief gemerk met behulp van γ -³²P-dATP volgens die metode wat in Afdeling 3.3.2.1. beskryf is. Aangesien slegs een punt van die fragment radioaktief gemerk mag wees vir gebruik in DNase I-afskermingsanalise, is van die ander gemerkte punt ontslae geraak deur die fragment met Hind III te behandel. 'n 5'-Radioaktiefgemerkte Eco RI - Hind III-fragment met 'n grootte van 308 bp en radioaktief gemerk aan die Eco RI-punt is so gevorm, gereed vir gebruik in DNase I-afskermingsanalisetegniek.



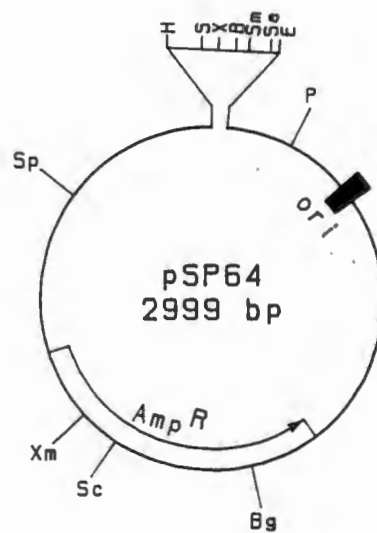
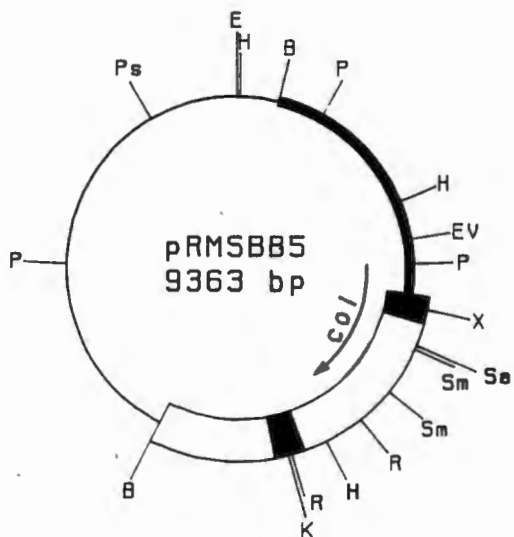
Figuur 4.2

Skematiese voorstelling van plasmied pSV40.

pSV40 is saamgestel uit pSP72 volgordes en 'n 300 bp Hind III - Kpn I-fragment van die SV40-vroeë promotor.

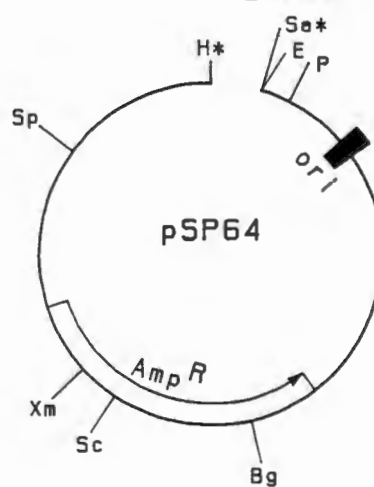
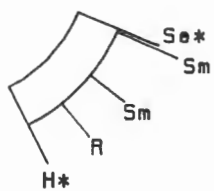
Snitpunte vir restriksie-ensieme en hul posisies wat aangedui is:

Afkorting	Ensiem	Ligging
Xh	Xho I	4
P	Pvu II	12
H	Hind III	16
Bgl	Bgl II	85
K	Kpn I	316
E	Eco RI	324
Bg	Bgl I	342; 1585
Sc	Sca I	1945
Xm	Xmn I	2064

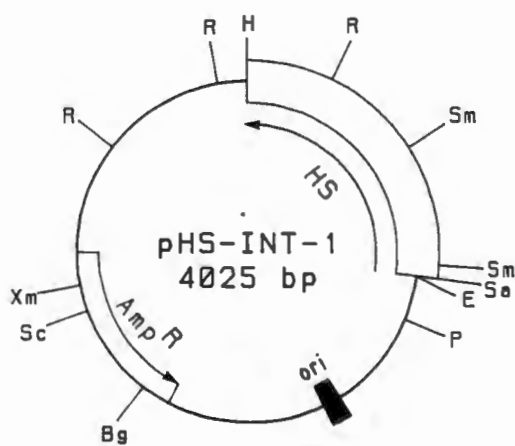


Hind III
Sac I
↓
Elueer

Hind III
Sac I
Fosfatase
↓
Elueer



Ligering
↓



Figuur 4.3 Voorstelling van die konstruksie en die struktuur van pHS-int-I.

Plasmiede pRMSBB5 en pSP64 is beide met die restriksie-ensieme Hind III en Sac I behandel. Na alkaliese fosfatasebehandeling van die pSP64-fragment, is die korrekte fragmente geëlueer. Die 1068 bp Hind III - Sac I- fragment van pRMSBB5 is aan die pSP64-fragment met behulp van oorvleuelende ligering geligeer om pHS-int-I te vorm.

Restriksie-ensiemsnitpunte wat aangetoon is, is:

E = Eco RI; H = Hind III; B = Bam HI; P = Pvu II; EV = Eco RV; X = Xba I; Sa = Sac I; Sm = Sma I; R = Rsa I; K = Kpn I; S = Sal I; Ps = Pst I; Bg = Bgl I; Sc = Sca I; Xm = Xmn I; Sp = Sph I.

Ligging van die snitpunte vir die restriksie-ensieme in pHS-int-I is:

Ensiem	Ligging
Hind III	7
Rsa I	305; 2308; 3485; 3949
Sma I	635; 1039
Sac I	1075
Eco RI	1081
Pvu II	1259
Bgl I	2444
Sca I	2808
Xmn I	2925

Restriksie-ensiemsnitpunte met asteriske toon snitpunte aan wat vernietig word.

Vir die nie-koderende string is plasmied pSV40 aan vertering met die restriksie-ensieme Bgl II en Hind III onderwerp. Na fosfatasebehandeling is die 326 bp Hind III - Bgl II-fragment geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk. Om van die een 5'-gemerkte punt ontslae te raak, is die fragment met Eco RI behandel. 'n Radioaktiefgemerkte Hind III - Eco RI-fragment met 'n grootte van 308 bp en aan die Hind III-punt gemerk, is so gevorm.

4.3 KONSTRUKSIE VAN PLASMIEDE pSS, pRS EN pHR295

Konstruksie van die drie plasmiede pSS, pRS en pHR295 vereis eerstens die isolering van die onderskeie pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen-fragmente (Figuur 4.1). Aangesien daar 'n groot aantal snitpunte vir restriksie-ensieme in die gebied voorkom wat isolering kan bemoeilik, is 'n voorgangerplasmied, pHS-int-I, vir hierdie doel gebou. Isolering van die verlangde fragmente uit pHS-int-I vergemaklik die bou van die verskillende konstrukte.

4.3.1 pHS-int-I

In Figuur 4.3 word 'n diagrammatiese voorstelling van die konstruksie van plasmied pHS-int-I gegee. Plasmied pRMSBB5 (reeds in die laboratorium beskikbaar) is saamgestel uit pBR322-volgordes en 'n 5 kbp Bam HI-fragment wat die promotor, die eerste intron en 'n gedeelte van die tweede intron van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen bevat. Hierdie plasmied sowel as die basisvektor pSP64 is aan Hind III-en Sac I-behandeling onderwerp. Na defosforilering van die pSP64-DNA met behulp van alkaliese fosfatase (Afdeling 3.2.2) is die fragmente geëlueer. Die 1068 bp Hind III - Sac I-fragment van pRMSBB5 is deur middel van oorvleuelende ligering aan die pSP64-fragment geligeer om plasmied pHS-int-I met 'n grootte van 4025 bp te vorm. Plasmied pHS-int-I beskik dan oor 'n groot gedeelte van die eerste intron van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen.

4.3.2 pSS, pRS EN pHR295

Vir die konstruksie van die drie plasmiede pSS, pRS en pHR295, is plasmied pHS-int-I (Figuur 4.3) aan behandeling met restriksie-ensieme Hind III en Sac I onderwerp. Na eluering van die fragment is dit aan verdere behandeling met die restriksie-ensieme Rsa I en Sma I onderwerp. Oorhangende termini wat ontstaan het na behandeling met Hind III is met behulp van die Klenow-fragment soos in Afdeling 3.2.2 beskryf, opgevol. Behandeling met Rsa I en Sma I lei reeds tot die vorming van stomptermi. Drie fragmente is hierna geëlueer, naamlik: 'n 296 bp Hind III - Rsa I-fragment, 'n 332 bp Rsa I - Sma I-fragment en 'n 404 bp Sma I - Sma I-fragment (Figuur 4.1). Die basisvektor pSP64 is opeenvolgend met die restriksie-ensiem Sma I en alkaliese fosfatase behandel en daarna geëlueer.

Plasmiede pSS, pRS en pHR295 is gekonstrueer deur onderskeidelik die 296 bp Hind III - Rsa I, 332 bp Rsa I - Sma I en die 404 Sma I - Sma I-fragmente deur middel van stomppuntligering aan die pSP64-fragment te ligger. Sodoende is plasmiede pSS, pRS en pHR295 met groottes van onderskeidelik 3403 bp, 3331 bp en 3295 bp gevorm. Elk van hierdie konstruksie beskik dan oor 'n gedeelte van die eerste intron van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen. Plasmied pHR295 beskik oor die gebied van die eerste intron waar aktiveringsvolgorde aktiwiteit (Afdeling 2.3.3.2) waargeneem is. 'n Diagrammatiese voorstelling van die samestelling en konstruksie van bogenoemde drie plasmiede word in Figuur 4.4 gegee.

Fragmente vir die gebruik in DNase I-afskermingsanalises is op presies dieselfde wyse uit hierdie drie plasmiede geïsoleer en radioaktief gemerk. Vir hierdie doel is plasmiede pHR295, pRS en pSS met die restriksie-ensieme Eco RI en Xba I verteer en daarna met alkaliese fosfatase behandel. Na isolering van die 326 bp Eco RI - Xba I-fragment van pHR295, die 355 bp Eco RI - Xba I-fragment van pRS en die 428 bp Eco RI - Xba I-fragment van pSS is die fragmente met behulp van γ -³²P-dATP 5'-radioaktief gemerk. Die een radioaktiefgemerkte punt is verwyder deur die fragmente met die restriksie-ensiem Sac I te behandel. 'n Xba I - Sac I-fragment met

'n grootte van 320 bp by pHR295, 345 bp by pRS en 426 bp by pSS en radioaktiefge-merkte Xba I-punte is so gevorm.

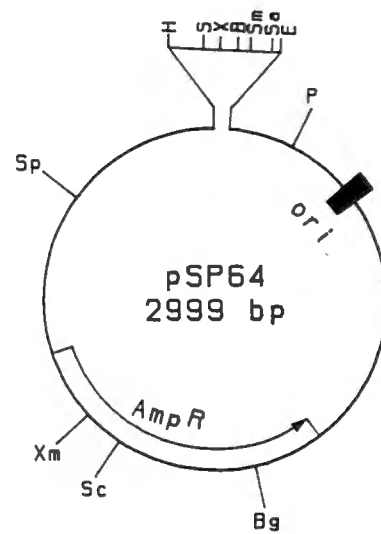
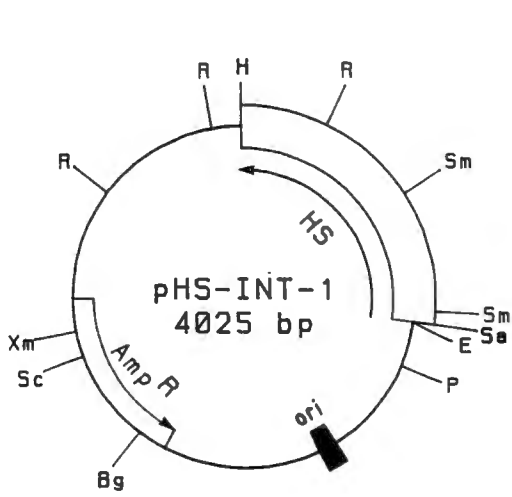
Die teenoorgestelde stringe van die drie plasmiede is geïsoleer en radioaktief gemerk deur die plasmiede aan vertering met restriksie-ensieme Eco RI en Pst I te onderwerp. Na behandeling met alkaliese fosfatase is die 335 bp Eco RI - Pst I-fragment van pHR295, die 371 Eco RI - Pst I-fragment van pSS geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk. Deur van die restriksie-ensiem Xba I gebruik te maak, is die een radioaktiefgemerkte punt van die fragmente verwyder. 'n Eco RI - Xba I-fragment met 'n grootte van 323 bp by pHR295, 355 bp by pRS en 428 bp by pSS en radioaktief gemerk aan die Eco RI-punt is so gevorm.

4.4 KONSTRUKSIE VAN PLASMIED pXS

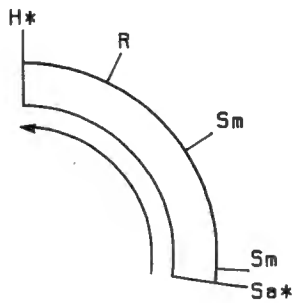
Vir die konstruksie van plasmied pXS, is weer eens van 'n voorgangerplasmied gebruik gemaak. Hierdie voorgangerplasmied, pHS-EX-I, is soos pHS-int-I, uit plasmied pRMSBB5 verkry.

4.4.1 pHS-EX-I

Behandeling van plasmied pRMSBB5 met die restriksie-ensieme Hind III en Sac I gee 'n fragment met 'n grootte van 1183 bp. Hierdie fragment beskik oor die 5'-gebied en promotor, asook die eerste ekson van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen. Die basisvektor pSP64 is ook aan Hind III en Sac I-behandeling onderwerp. Na alkaliese fosfatasebehandeling is die 2957 bp pSP64-fragment sowel as die 1183 bp pRMSBB5-fragment geëluëer. Ligerig van hierdie twee fragmente vorm die 4140 bp plasmied pHS-EX-I. 'n Diagrammatiese voorstelling van die konstruksie van hierdie plasmied word in Figuur 4.5 gegee.

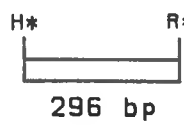
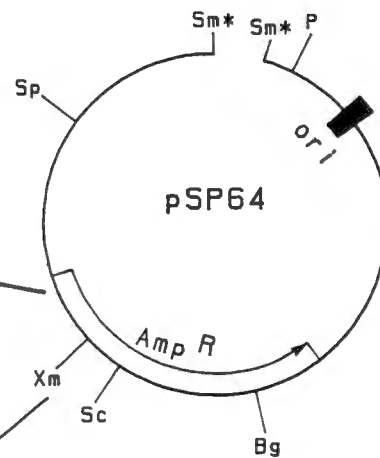


Hind I
Sac I
Eueer

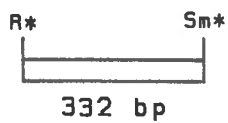


Sma I
Fosfatase
Eueer

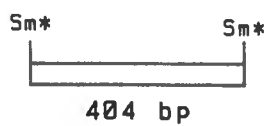
Rsa I
Sma I
Klenow



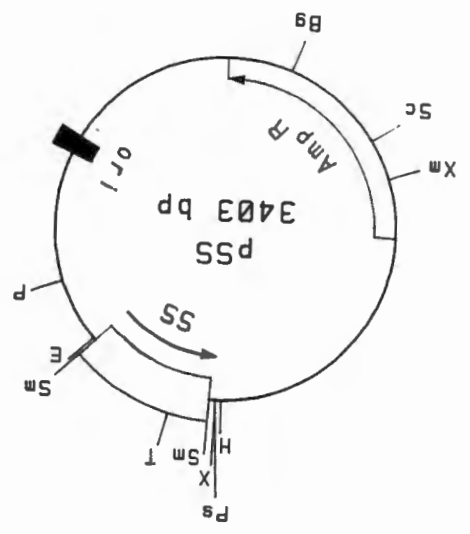
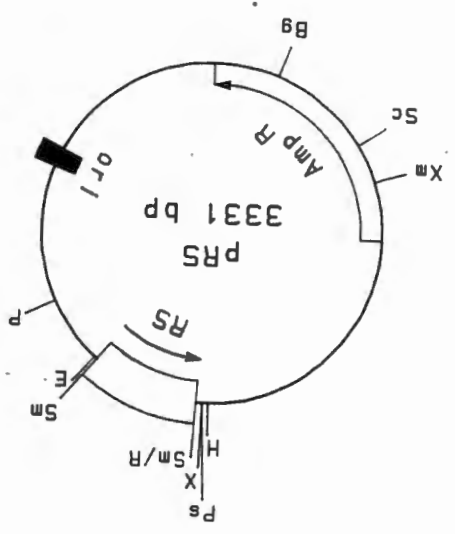
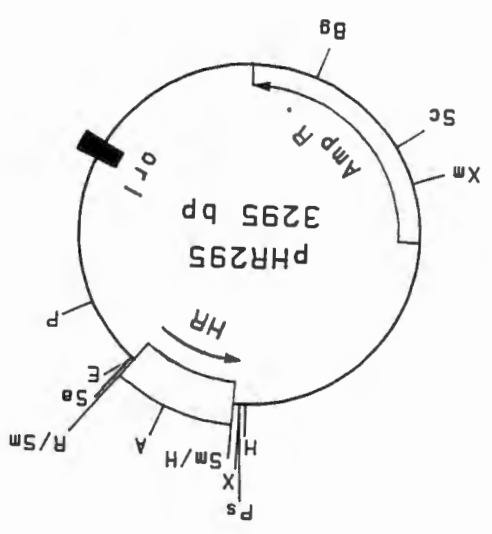
Ligering



Ligering



Ligering



Figuur 4.4 **Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pHR295 (A); pRS (B) en pSS(C).**

Die drie plasmiede is gekonstrueer uit pHS-int-I en pSP64. Na behandeling van pHS-int-I met Hind III en Sac I is die geëluëerde fragment aan verdere vertering met Rsa I en Sma I onderwerp. Oorvleuelende termini is met behulp van die Klenow-fragment opgevol en die drie korrekte fragmente is geëluëer. Die drie fragmente is elk met behulp van stomppuntligering aan die alkaliese fosfatasebehandelde Sma I-fragment van pSP64 geligeer om pSS, pRS en pHR295 te vorm.

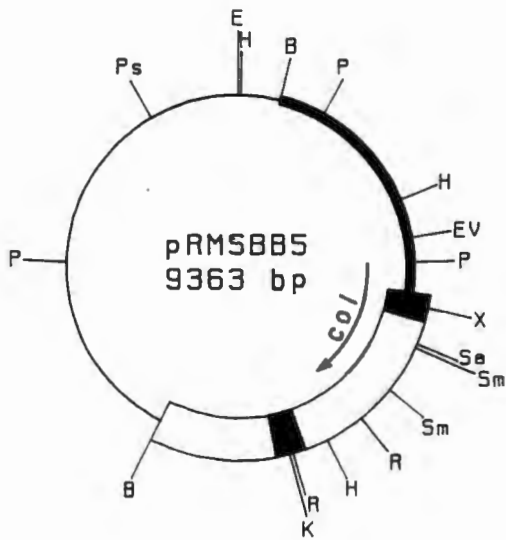
Restriksie-ensiemsnitpunte wat aangedui is, is:

H = Hind III; R = Rsa I; Sm = Sma I; Sa = Sac I; E = Eco RI;
P = Pvu II; Bg = Bgl I; Sc = Sca I; Xm = Xmn I; S = Sal I; X = Xba I;
Sp = Sph I

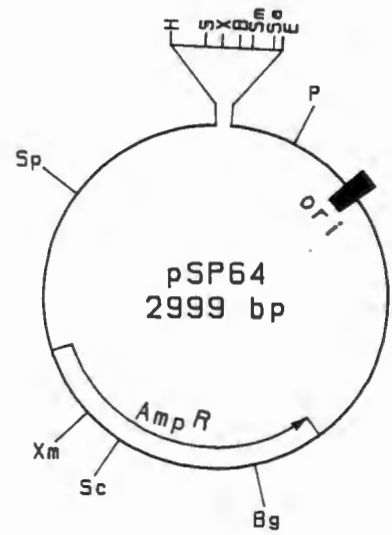
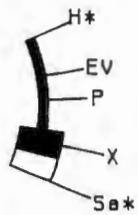
Asteriske toon snitpunte aan wat vernietig is.

Ligging van die snitpunte vir die restriksie-ensieme is:

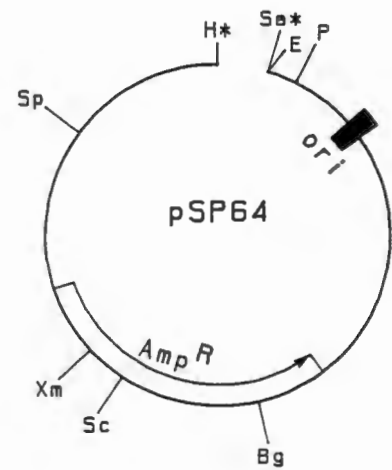
Ensiem	Ligging		
	pHR295	pRS	pSS
Hind III	7	7	7
Pst I	20	20	20
Xba I	28	28	28
Sac I	346	382	454
Pvu II	527	563	669
Bgl I	1716	1752	1825
Sca I	2076	2112	2185
Xmn I	2195	2231	2304
Eco RI	382	418	490
Sma I	-	373	41; 445



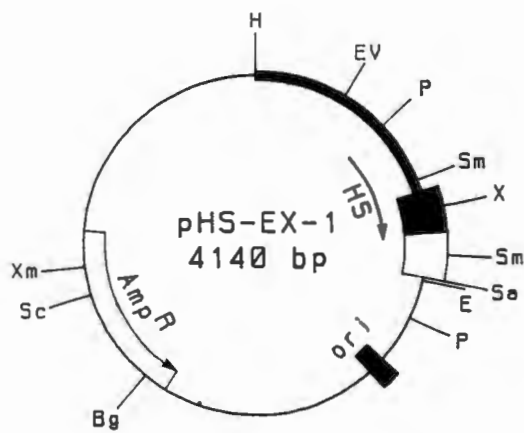
Hind III
Sac I
↓
Elueer



Hind III
Sac I
Fosfatase
↓
Elueer



Ligering



Figuur 4.5 Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pHS-EX-I.

Plasmiede pRMSBB5 en pSP64 is beide met die restriksie-ensieme Hind III en Sac I behandel. Na behandeling met alkaliese fosfatase is die 2957 bp pSP64-fragment sowel as die 1183 bp pRMSBB5-fragment geëlueer en met behulp van oorvleuelende ligering geligeer om pHS-EX-I te vorm.

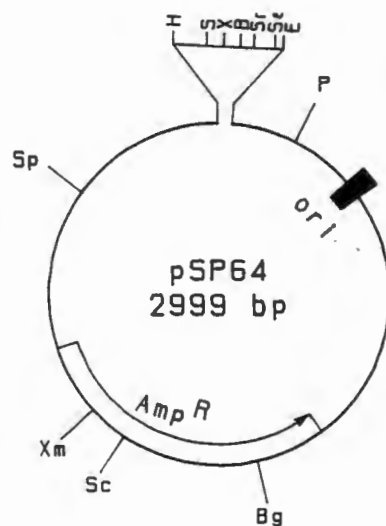
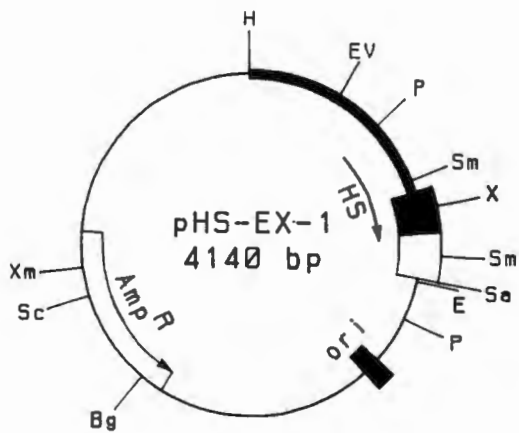
Restriksie-ensiemsnitpunte wat aangedui is, is:

E = Eco RI; H = Hind III; B = Bam HI; P = Pvu II; EV = Eco RV; X = Xba I; Sa = Sac I; Sm = Sma I; R = Rsa I; K = Kpn I; Bg = Bgl I; Sc = Sca I; Xm = Xmn I; Sp = Sph I.

Asteriske toon snitpunte aan wat vernietig is.

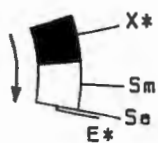
Ligging van die snitpunte vir die restriksie-ensieme in pHS-EX-I is soos volg:

Ensiem	Ligging
Hind III	7
Eco RV	367
Pvu II	555; 1373
Sma I	794; 1090
Xba I	924
Sac I	1190
Eco RI	1195
Bgl I	2558
Sca I	2922
Xmn I	3039

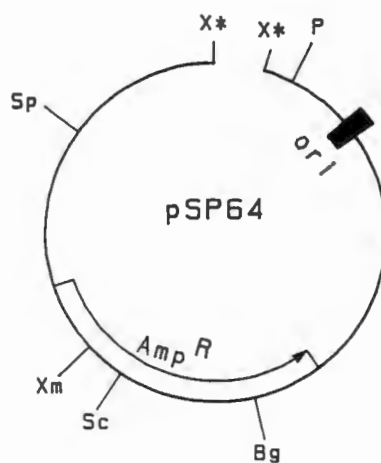


EcoR 1
Xba 1
Klenow
Elueer

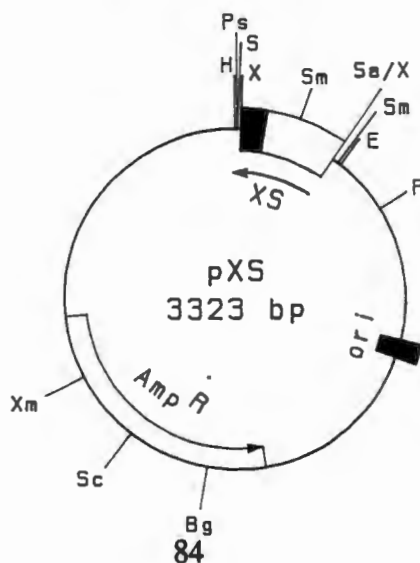
Xba 1
Klenow
Fosfatase
Elueer



324 bp



Ligering



Figuur 4.6 Voorstelling van die konstruksie en samestelling van plasmied pXS.

Plasmied pHS-EX-I is met Sac I en Xba I behandel, terwyl pSP64 met Xba I oopgemaak is. Na opvulling van die oorhangende termini met Klenow-fragment is die pSP64-fragment met alkaliese fosfatase behandel. Die korrekte fragmente is geëlueer en met behulp van stomppuntligering aan mekaar geligeer om plasmied pXS met 'n grootte van 3323 bp te vorm.

Restriksie-ensiemsnitpunte wat aangedui is, is:

H = Hind III; X = Xba I; Sm = Sma I; Sa = Sac I; E = Eco RI; P = Pvu II; Bg = Bgl I; Sc = Sca I; Xm = Xmn I; S = Sal I; Ev = Eco RV; Sp = Sph I.

Asteriske toon snitpunte aan wat vernietig is.

Ligging van die snitpunte vir die restriksie-ensieme in pXS is:

Ensiem	Ligging
Hind III	7
Xba I	28
Sma I	195; 365
Eco RI	410
Pvu II	590
Bgl I	1779
Sca I	2139
Xmn I	2258
Pst I	20
Sal I	22

4.4.2 pXS

In Figuur 4.6 word 'n diagrammatiese voorstelling van die konstruksie van plasmied pXS gegee. Plasmied pHS-EX-I is met die restriksie-ensieme Xba I en Sac I behandel en 'n fragment met 'n grootte van 324 bp is hieruit verkry. Die plasmied pSP64 is met Xba I behandel en na opvulling van die oorhangende termini met behulp van die Klenow-fragment gedefosforileer. Hierdie twee fragmente is deur middel van stomppuntligering aan mekaar geligee om die plasmied pXS met 'n grootte van 3323 bp te vorm. Plasmied pXS beskik dan oor 'n gedeelte van die eerste intron van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen.

Isolering en 5'-radioaktiefmerking van die fragment uit plasmied pXS is soos volg gedoen: Plasmied pXS is met die restriksie-ensieme Eco RI en Sal I verteer en daarna met alkaliese fosfatase behandel. Nadat die 339 bp Eco RI - Sal I-fragment geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk is, is die een radioaktiewe punt verwyder deur die fragment met Bam HI te behandel. 'n Sal I - Bam HI-fragment met 'n grootte van 321 bp en radioaktief aan die Sal I-punt gemerk is, is so gevorm.

Die teenoorgestelde string is gemerk deur plasmied pXS met restriksie-ensieme Eco RI en Pst I te behandel. Die 349 bp Eco RI - Pst I-fragment is na alkaliese fosfatasebehandeling radioaktief met behulp van γ -³²P-dATP gemerk. Die een radioaktiefgemerkte punt is verwyder deur die fragment met die restriksie-ensiem Sal I te behandel. 'n Eco RI - Sal I-fragment met 'n grootte van 339 bp en radioaktief aan die Eco RI-punt gemerk is sodoende gevorm.

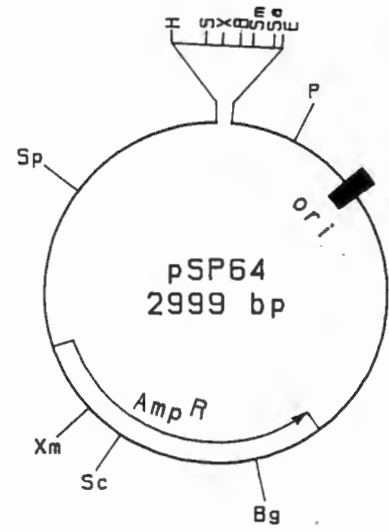
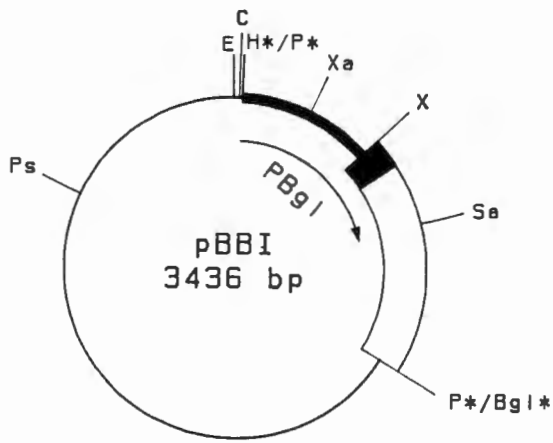
4.5 KONSTRUKSIE VAN PLASMIED pCX

Plasmied pBBI (wat reeds in die laboratorium beskikbaar was) is gebruik vir die konstruksie van pCX. Plasmied pBBI is uit 'n 1110 bp Pvu II - Bgl II-fragment van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen wat in die snitpunte Hind III en Pvu II van die plasmied pBR322 gekloneer is, is saamgestel. Aangesien die Pvu II-snit tydens

konstruksie van pBBI vernietig is, is vir die konstruksie van pCX van die nuttige snitpunt vir die restriksie-ensiem Cla I in die pBR322-volgordes in pBBI gebruik gemaak. Na die behandeling van pBBI met restriksie-ensieme Cla I en Xba I, is die oorhangende termini met behulp van die Klenow-fragment opgevul. Die vektor pSP64 is met Xba I behandel, die oorhangende termini met die Klenow-fragment opgevul en daarna is die fragment deur middel van alkaliese fosfatasebehandeling gedefosforileer. Na eluering van die 370 bp Cla I - Xba I-fragment en pSP64-DNA, is plasmied pCX gevorm deur die 370 bp-fragment deur middel van stomppuntligering aan die pSP64-fragment te ligeer. Plasmied pCX bestaan dan uit 'n grootte van 3369 bp en bevat die promotorgebied van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen. 'n Voorstelling van die konstruksie van pCX word in Figuur 4.7 gegee.

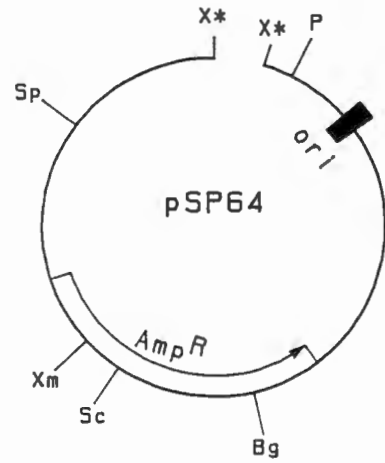
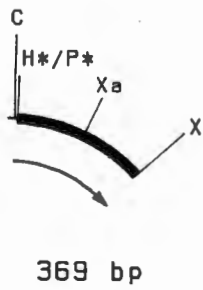
Isolering en 5'-radioaktiefmerking van die CX-fragment uit plasmied pCX vir gebruik in DNase I-afskermingsanalise, geskied deur plasmied pCX met die restriksie-ensieme Eco RI en Sal I te behandel. Na behandeling met alkaliese fosfatase is die 413 bp Eco RI - Sal I-fragment geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk. Deur die fragment met Bam HI te verteer, is die een radioaktiefgemerkte punt verwyder. 'n Sal I - Bam HI-fragment met 'n grootte van 395 bp en radioaktief op die Sal I-punt gemerk is so gevorm.

Die teenoorgestelde string is gemerk deur die plasmied pCX met die restriksie-ensieme Eco RI en Pst I te behandel. 'n Eco RI - Pst I-fragment van 423 bp is na alkaliese fosfatasebehandeling geïsoleer en radioaktief gemerk. Die een radioaktiefgemerkte punt is verwyder deur die fragment met Sal I te behandel. 'n Eco RI - Sal I-fragment met 'n grootte van 413 bp en radioaktief aan die Eco RI-punt gemerk, is so gevorm.

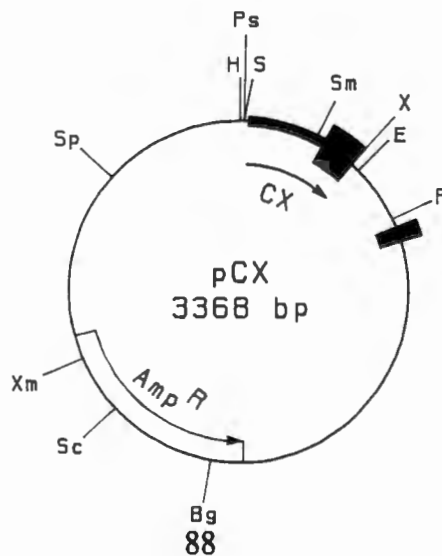


↓
 Cla1
 Xba 1
 Klenow
 Elueer

↓
 Xba 1
 Klenow
 Fosfatase
 Elueer



Ligering



Figuur 4.7 Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pCX.

Plasmied pBBI is met Cla I en Xba I behandel, terwyl pSP64 met Xba I behandel is. Na opvulling van die oorhangende termini met behulp van die Klenow-fragment, is pSP64 deur alkaliese fosfatase gedefosforileer. Die korrekte fragmente is geëlueer en deur middel van stomppuntligering geligeer om pCX te vorm.

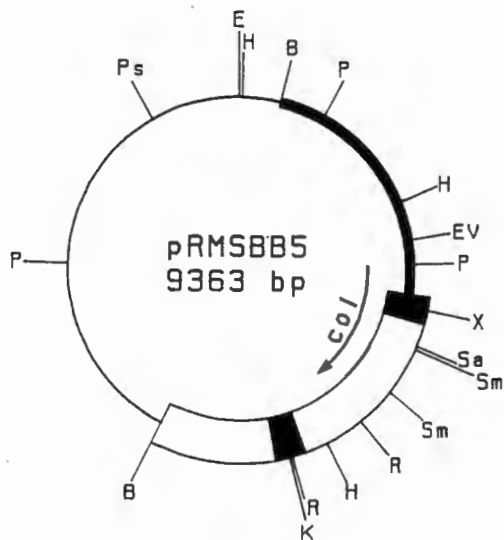
Restriksie-ensiemsnitpunte wat aangedui is, is.

E = Eco RI; H = Hind III; P = Pvu II; Sa = Sac I; Ps = Pst I; Xm = Xmn I; Bg = Bgl I; Sc = Sca I; Sp = Sph; X = Xba I; Xa = Xma III; Sm = Sma I; C = Cla I

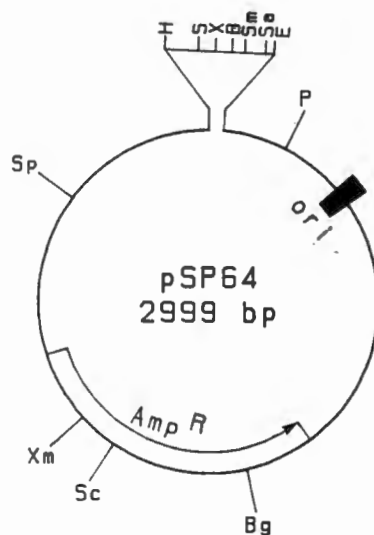
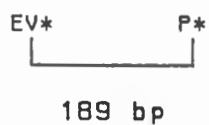
Asteriske toon snitpunte aan wat vernietig is.

Ligging van die snitpunte vir die restriksie-ensieme in pCX is:

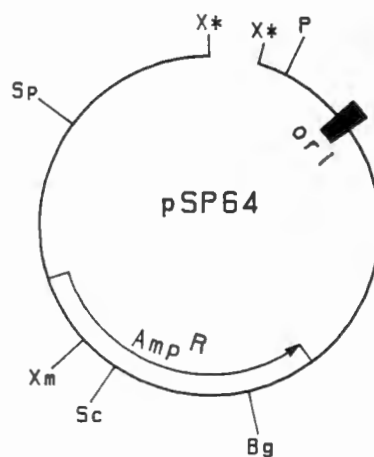
Ensiem	Ligging
Hind III	7
Pst I	20
Sal I	22
Sma I	266
Xba I	395
Eco RI	419
Pvu II	599
Bgl I	1788
Sca I	2148
Xmn I	2267
Sph I	2934



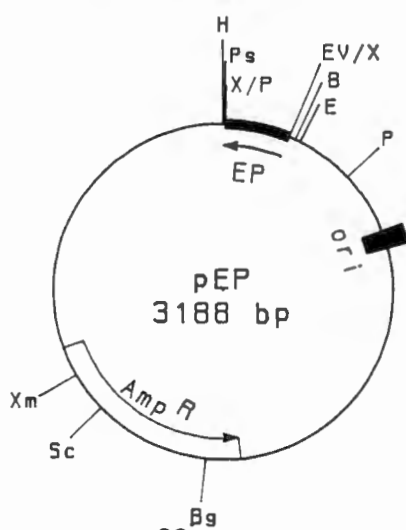
Pvu II
EcoR V
Klenow
Elueer



Xba I
Klenow
Fosfatase
Elueer



Ligering



Figuur 4.8 Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pEP.

Plasmied pRMSBB5 is met Eco RV en Pvu II behandel, terwyl pSP64 met Xba I behandel is. Na opvulling van die oorhangende termini met die Klenow-fragment en alkaliese fosfatasebehandeling is die fragmente geëluëer. Plasmied pEP is gevorm deur stomppuntligering van die 189 bp Eco RV - Pvu II-fragment aan die pSP64-fragment.

Restriksie-ensiemsnitpunte wat aangedui is, is:

H = Hind III; X = Xba I; P = Pvu II; Bg = Bgl I; Sc = Sca I; Xm = Xmn I; Ev = Eco RV; E = Eco RI; B = Bam HI; Sa = Sac I; Sm = Sma I; R = Rsa I; K = Kpn I; Ps = Pst I; S = Sal I; Sp = Sph I.

Asteriske toon snitpunte aan wat vernietig is.

Ligging van die snitpunte vir die restriksie-ensieme in pXS is:

Ensiem	Ligging
Hind III	7
Pst I	20
Bam HI	188
Eco RI	240
Pvu II	420
Bgl I	1609
Sca I	1969
Xmn I	2088

4.6 KONSTRUKSIE VAN PLASMIED pEP

In Figuur 4.8 word 'n diagrammatiese voorstelling van die konstruksie van plasmied pEP gegee. Plasmied pRMSBB5 is met restriksie-ensieme Eco RV en Pvu II behandel, terwyl die vektor pSP64 met die restriksie-ensiem Xba I behandel is. Oorhangende termini is met behulp van die Klenow-fragment opgevul. Na defosforilering van die pSP64-fragment met behulp van alkaliese fosfatase, is beide die korrekte fragmente geëlueer. Plasmied pEP is hierna gevorm deur die 189 bp Eco RV - Pvu II-fragment met behulp van stomppuntligering aan die pSP64-DNA te ligeer. Plasmied pEP met 'n grootte van 3188 bp word gevorm en beskik oor 'n gedeelte van die 5'-gebied van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen.

Vir DNase I-afskermingsanalise is die fragment uit plasmied pEP geïsoleer, deur die plasmied met die restriksie-ensieme Eco RI en Sal I te behandel. Na alkaliese fosfatasebehandeling is die 218 bp Eco RI - Sal I-fragment geïsoleer en daarna met behulp van γ - 32 P-dATP 5'-radioaktief gemerk. Die een radioaktiefgemerkte punt is verwyder deur die fragment met die restriksie-ensiem Bam HI te behandel. 'n Sal I - Bam HI- fragment van 200 bp-gemerk aan die Sal I-punt is so gevorm.

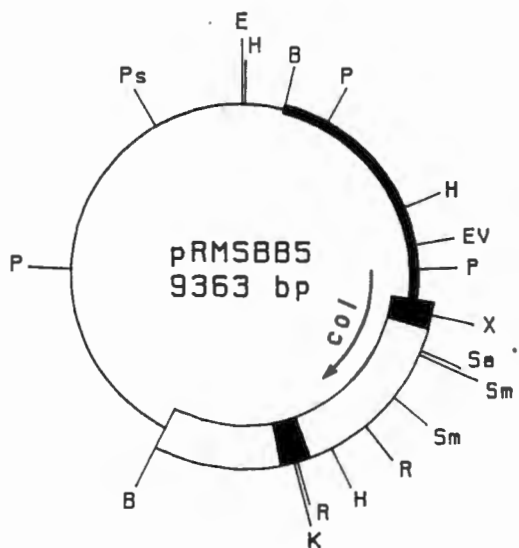
Die teenoorgestelde string is geïsoleer en radioaktief gemerk deur die plasmied pEP aan vertering met die restriksie-ensieme Eco RI en Pst I te onderwerp. Die 228 bp Eco RI - Pst I-fragment is na alkaliese fosfatasebehandeling geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk. Deur die fragment met Sal I te behandel, is daar van die een radioaktiefgemerkte punt ontslae geraak. 'n Eco RI - Sal I-fragment met 'n grootte van 217 bp en radioaktief aan die Eco RI-punt gemerk, word so gevorm.

4.7 KONSTRUKSIE VAN PLASMIED pHR3'

Vir die konstruksie van plasmied pHR3' moet die Hind III - Rsa I-fragment van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen geïsoleer word (Figuur 4.1). Aangesien restriksie-ensiem Rsa I meer as een keer voorkom in die plasmied pRMSBB5, waaruit die

fragment geïsoleer moet word, moes van 'n ander nabygeleë unieke restriksie-ensiem snitpunt gebruik gemaak word. In hierdie geval is daar van die restriksie-ensiem snitpunt Kpn I wat naby die Rsa I-snitpunt geleë is, gebruik gemaak. Behandeling van die plasmied pRMSBB5 met die restriksie-ensieme Hind III en Kpn I lewer 'n fragment van 266 bp. Hierdie fragment is vervolgens met Rsa I behandel, waarna die oorhangende termini met behulp van die Klenow-fragment opgevolg en die 250 bp fragment geëluëer is. Vir die invoeging van hierdie fragment in die basisvektor, is pSP64 voorberei deur behandeling met die restriksie-ensiem Sma I. Omdat behandeling met Sma I reeds stomppunttermini tot gevolg het, is geen behandeling met die Klenow-fragment uitgevoer nie. Defosforilering van die fragment met behulp van alkaliese fosfatase is opgevolg deur die eluering van die fragment. Plasmied pHR3' is gevorm deur stomppuntligering van die 250 bp Hind III - Rsa I-fragment aan die pSP64-fragment. Plasmied pHR3' bestaan dan uit 'n grootte van 3249 bp en beskik oor die laaste gedeelte van die eerste intron en 'n gedeelte van die tweede ekson van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen. 'n Diagrammatiese voorstelling van die konstruksie van plasmied pHR3' word in Figuur 4.9 gegee.

Vir die isolering en radioaktiefmerking van die fragment uit plasmied pHR3' vir gebruik in die DNase I-afskermingstegniek is plasmied pHR3' aan behandeling met restriksie-ensieme Eco RI en Xba I onderwerp. Na behandeling met alkaliese fosfatase is die fragment met 'n grootte van 279 bp geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk. Die een radioaktiefgemerkte punt is verwyder deur hierdie Eco RI - Xba I-fragment aan behandeling met die restriksie-ensiem Sac I te onderwerp. 'n Xba I - Sac I-fragment met 'n grootte van 273 bp en gemerk aan die Xba I-punt is so gevorm. Die teenoorgestelde string is geïsoleer en radioaktief gemerk deur plasmied pHR3' met die restriksie-ensieme Eco RI en Pst I te behandel. 'n Eco RI - Pst I-fragment van 291 bp is na alkaliese fosfatasebehandeling geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk. Deur die fragment met die restriksie-ensiem Xba I te behandel, is een radioaktiefgemerkte punt verwyder. 'n Eco RI - Xba I-fragment met 'n grootte van 279 bp en gemerk aan die Eco RI-punt is so gevorm.



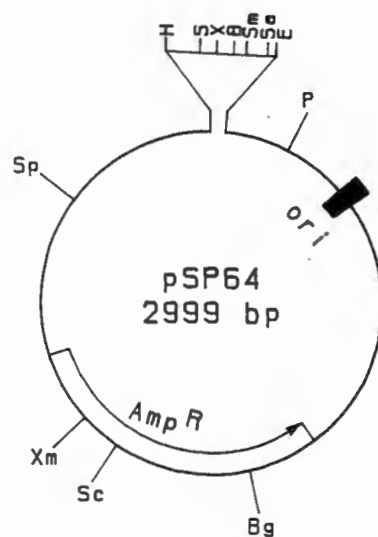
Hind III
Kpn I
↓
Elueer



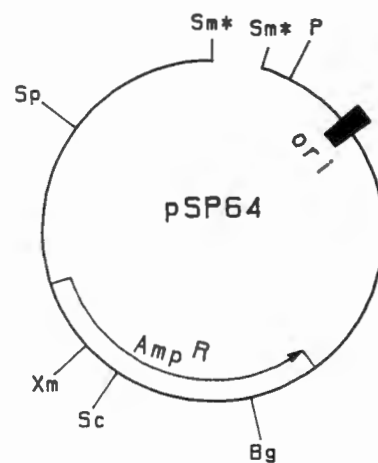
Rsa I
Klenow
↓
Elueer



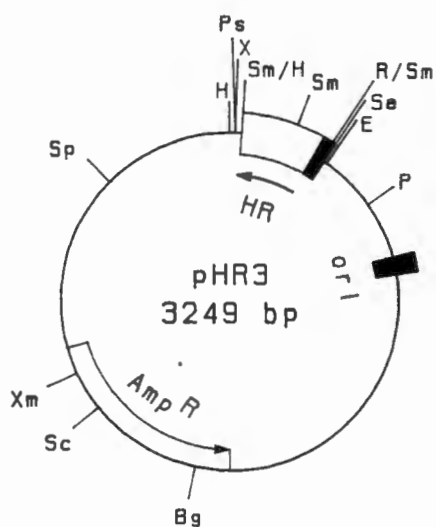
250 bp



Sma I
Fosfatase
↓
Elueer



Ligering



Figuur 4.9 Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pHR3’.

Plasmied pRMSBB5 is met Hind III en Kpn I behandel, waarna die ge  lueerde 266 bp fragment verder met Rsa I behandel is. Oorhangende termini is met die Klenow-fragment opgevul. pSP64 is met Sma I en daarna met alkaliese fosfatase behandel. Na eluering van die korrekte fragmente is die 250 bp Hind III - Rsa I-fragment aan pSP64-DNA met behulp van stomppuntligering geligeer om pHR3’ te vorm.

Restriksie-ensiemsnitpunte wat aangedui is, is:

E = Eco RI; H = Hind III; B = Bam HI; P = Pvu II; EV = Eco RV; X = Xba I; Sa = Sac I; Sm = Sma I; R = Rsa I; K = Kpn I; S = Sal I; Ps = Pst I; Bg = Bgl I; Sc = Sca I; Xm = Xmn I; Sp = Sph I.

Asteriske toon snitpunte aan wat vernietig is.

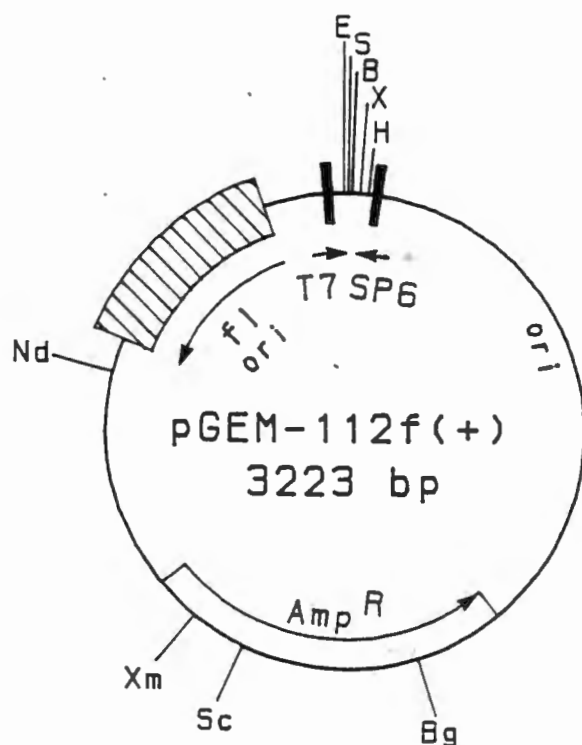
Ligging van die snitpunte vir die restriksie-ensieme in pHR3’ is:

Ensiem	Ligging
Hind III	7
Pst I	20
Xba I	28
Sma I	204
Sac I	267
Eco RI	303
Pvu II	481
Bgl I	1666, 80
Sca I	2030
Xmn I	2147
Sph I	2814

4.8 KONSTRUKSIE VAN pGEM-BB5

Gedurende hierdie studie is ook van elektronmikroskopiese ondersoeke gebruik gemaak (Hoofstuk 8). Vir die doel van hierdie analyses was dit noodsaaklik dat die hele gebied van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen wat bestudeer is (Figuur 4.1) in een plasmied gekloneer moet wees. Hoewel plasmied pRMSBB5 (Figuur 4.3) hierdie volledige gebied bevat, is dit ten opsigte van elektronmikroskopiese ondersoeke nie bruikbaar nie, aangesien 'n groot tekortkoming van pRMSBB5 is dat die plasmied nie oor 'n merkergeen beskik wat tydens elektronmikroskopiese analyses noodsaaklik is vir die oriëntering van die DNA nie. Daarom is die plasmied pGEM-11zf(+) (Figuur 4.10) van Promega aangekoop om as kloneringsvektor te dien. Plasmied pGEM-11zf(+) beskik onder meer oor twee merkergebiede wat weerskante van 'n meervoudige kloneringsgebied geleë is. Die een merkergeen is die promotor vir T7 RNA-polimerase en die ander die promotor vir SP6 RNA-polimerase. Die T7 en SP6 RNA-polimerasepromotors asook die meerdoelige kloneringsgebied is binne-in die α -peptied koderingsgebied van die ensiem β -galaktosidase geleë. Deur 'n fragment in die meerdoelige kloneringsgebied in te kloneer en die verkreeë plasmied dan op 'n ander punt met behulp van 'n unieke restriksie-ensiem soos byvoorbeeld Sca I oop te maak, word 'n linieêre DNA-fragment verkry met merkergene aan weerskante van die gekloneerde fragment, 'n ideale templaar vir die gebruik vir elektronmikroskopiese ondersoeke.

Vir die konstruksie van plasmied pGEM-BB5 is die pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen-fragment geïsoleer deur middel van die behandeling van plasmied pRMSBB5 met die restriksie-ensiem Bam HI. Behandeling van hierdie plasmied met Bam HI lei tot die isolering van 'n 5 kb-fragment wat beskik oor 'n gedeelte van die 5'-gebied, die promotor, eerste intron en 'n gedeelte van die tweede intron van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen. Terselfdertyd is plasmied pGEM-11zf(+) ook met Bam HI behandel en die fragment met behulp van alkaliese fosfatase gedefosforileer. Na eluering van die 5 kb Bam HI-fragment en van die pGEM-11zf(+) DNA, is plasmied pGEM-BB5 gevorm deur ligering van die twee fragmente. 'n Diagrammatiese voorstelling van die konstruksie van hierdie 8223 bp plasmied word in Figuur 4.11 gegee.

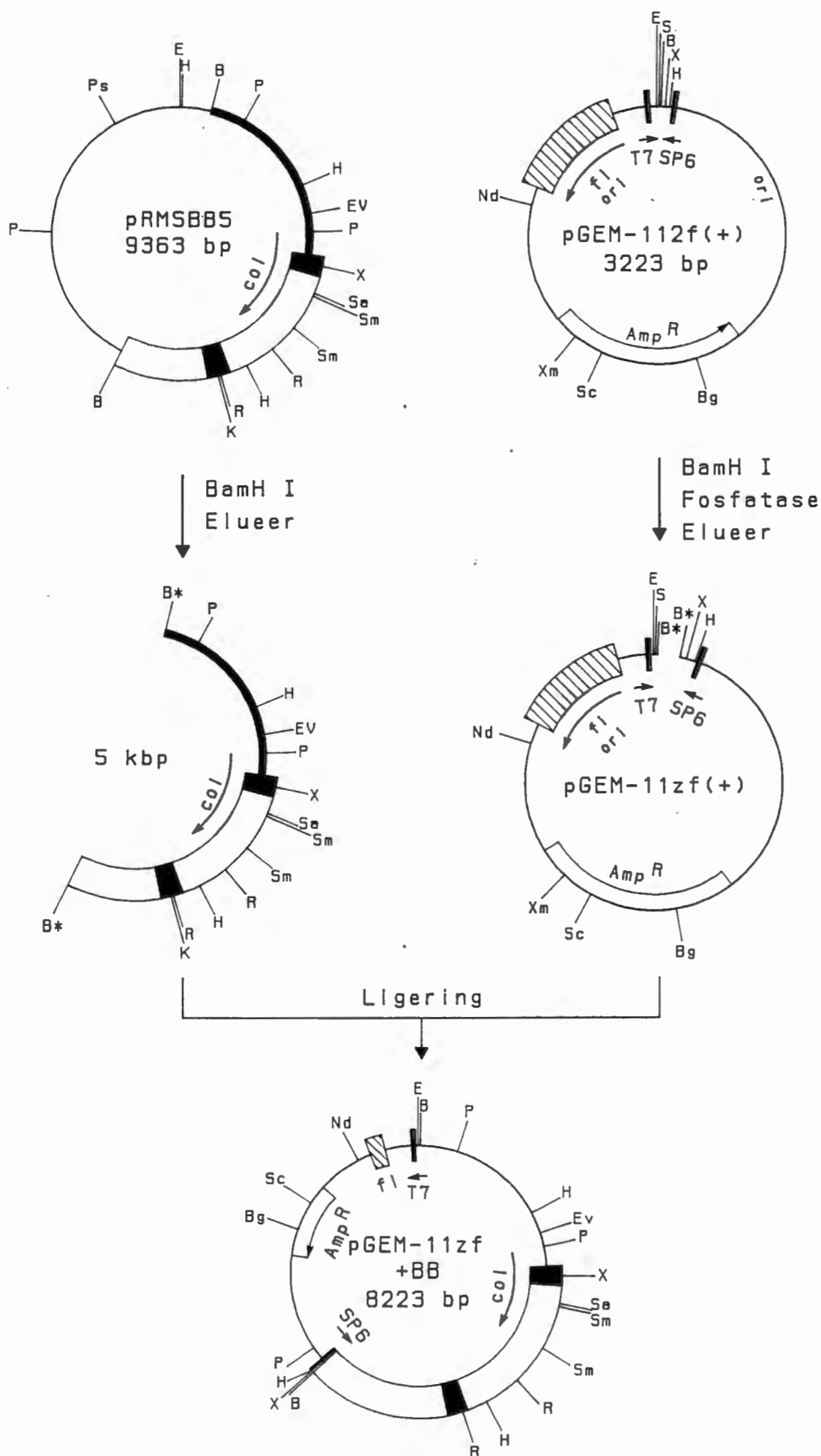


Figuur 4.10 Skematiese voorstelling van plasmied pGEM-11zf(+).

'n T7 RNA en 'n SP6 RNA-promotor is weerskante van 'n meerdoelige kloneringsgebied geleë, binne die α -peptied koderingsgebied van β -galaktosidase. 'n F1 ori is ook in die plasmied teenwoordig indien enkelstring DNA in 'n viruskapsied verpak moet word. Die res van die plasmied bestaan uit pBR322-volgordes.

Snitpunte vir restriksie-ensieme en hul posisie wat aangedui is, is:

Afkorting	Ensiem	Ligging
E	Eco RI	29
S	Sal I	35
B	Bam HI	47
X	Xba I	59
H	Hind III	80
Bg	Bgl I	1482
Sc	Sca I	1842
Xm	Xmn I	1961
Nd	Nde I	2533



Figuur 4.11 Voorstelling van die konstruksie en struktuur van pGEM-BB5.

Beide plasmiede pGEM11zf(+) en pRMSBB5 is met Bam HI behandel. Na defosforilering van die pGEM-11zf(+)-fragment is die fragmente geëlueer en met behulp van oorvleuelende ligering geligieer om plasmied pGEM-BB5 te vorm.

Restriksie-ensiemsnitpunte wat getoon is, is:

E = Eco RI; H = Hind III; B = Bam HI; P = Pvu II; Ev = Eco RV; X = Xba I; Sa = Sac I; Sm = Sma I; R = Rsa I; Ps = Pst I; Bg = Bgl I; Sc = Sca I; Nd = Nde I.

Ligging van die snitpunte vir die restriksie-ensieme in pGEM-BB5 is:

Ensiem	Ligging
Eco RI	29
Bam HI	47;5047
Pvu II	422; 1945; 5293
Hind III	1397; 3648; 5080
Eco RV	1757
Xba I	2317; 5059
Sac I	2580
Sma I	2616; 3020
Rsa I	3352; 3898
Bgl I	6482
Sca I	6842
Nde I	7533

4.9 KARAKTERISERING VAN DIE KONSTRUKTE

Die verskillende stappe wat beskryf is om die onderskeie konstrukte te bou, is uitgevoer en die transformering van *E. coli* MC1061 met die onderskeie ligeringsmengsels is uitgevoer soos dit in Afdeling 3.2.3 beskryf is. Individuele transformante van elke konstruk is soos volg met behulp van die vinnige DNA-isoleringsmetode (Afdeling 3.2.3) vir die verwagte korrekte konstruk geanaliseer. Die DNA van die transformante is eers sonder behandeling met restriksie-ensieme op 'n 1% agarosegel geanaliseer, waarna 'n aantal transformante op grond van die verskil in skeidingspatroon vir verdere analise geïdentifiseer is. Hierdie analise is uitgevoer deur middel van behandeling van die DNA met verskeie restriksie-ensieme. Om te bepaal in watter oriëntasie die verskillende fragmente ingevoeg het, is van unieke snitpunte vir restriksie-ensieme in die konstrukte gebruik gemaak, wat sodanig geleë is dat die oriëntasie vanuit die skeidingspatrone afgelei kan word. Die oriëntasie van die fragmente in die onderskeie konstrukte word telkens in die figure waarin hulle voorgestel word, aangedui. Dit is noodsaaklik om te weet in watter oriëntasie die fragmente in die onderskeie plasmiede ingevoeg is sodat hierdie oriëntasies tydens DNase I-afskermingsanalises gebruik kan word om te bepaal waar op die fragment binding van die proteïene plaasgevind het. Nadat die verlangde transformante geïdentifiseer is, is elk van die konstrukte op groot skaal opgekweek en is die DNA geïsoleer soos in Afdeling 3.2.1 beskryf is. Finale karakterisering van die plasmiede is uitgevoer deur die plasmied-DNA met verskillende restriksie-ensieme te behandel, waarna dit op 'n 1% agarosegel geanaliseer is.

Elk van hierdie plasmiede met die verskillende gedeeltes van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen wat gekonstrueer en gekweek is, is vir die analisering van die betrokke kollageengeengebiede in hierdie studie gebruik. Die bepaling en analisering van waar die verskillende proteïene aan die betrokke kollageengeengebiede bind, word in die volgende hoofstukke uiteengesit.

HOOFSTUK 5

IDENTIFISERING VAN REGULERINGSGEBIEDE IN DIE MENS PRO- α 1(I)-KOLLAGEENGEEN

5.1 INLEIDING

Alvorens daar ondersoek ingestel kan word na die interaksie van transkripsiefaktore met die reguleringsgebiede van die mens pro- α 1(I)-kollageen, is dit noodsaaklik om die reguleringsgebiede van die geen te identifiseer. Tipe I-prokollageen, die voorloper van Tipe I-kollageen, is uit twee pro- α 1(I)- en een pro- α 2(I)-polipeptiedkettings saamgestel (Prockop en Kivirikko, 1984). Om die meganisme waarvolgens die uitdrukking van hierdie prokollageengene aan- of afgeskakel word te kan verklaar, is dit noodsaaklik dat die reguleringsgebiede in prokollageengene geïdentifiseer moet word.

Identifisering van reguleringsgebiede in die gene maak dit noodsaaklik om daardie gebiede wat as reguleringselemente tydens geenuitdrukking optree, te eien. Twee sulke verskillende *cis*-werkende reguleringselemente wat volledig in Hoofstuk 2, Afdeling 2.2.1, beskryf word, is identifiseerbaar, naamlik:

- * promotor-reguleringselemente wat direk stroom-op van die inisiasiepunt vir transkripsie voorkom en benodig word vir die akkurate en effektiewe inisiasie van transkripsie; en
- * aktiveringsvolgordes, dit is reguleringselemente wat in die koderingsgebied en veral in die introns van gene voorkom en wat die tempo van transkripsie vanaf die promotors verhoog.

Vir die doel van hierdie studie is daar slegs op die identifisering van reguleringsgebiede in die pro- α 1(I)-kollageengeen gekonsentreer.

Die reguleringsgebiede vir die mens pro- α 1(I)-kollageengeen is, soos beskryf in die literatuuroorsig, reeds bekend (Afdeling 2.3.3.2. en Rossouw *et al.*, 1987). In

hierdie hoofstuk word die resultate tesame met bykomende data kortliks geskets om 'n duideliker beeld van die identifisering van die reguleringsgebiede te gee. Tydens die bestudering van reguleringsgebiede en die ondersoek na die identifisering van *cis*-werkende reguleringselemente in die pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen in die laboratorium, is daar van twee verskillende *in vivo* transkripsiesisteme gebruik gemaak, naamlik die *Xenopus laevis* oösietsisteem en die meer homoloë sisteem van transfeksie. Die benaderingswyse wat gevolg is, is kortliks soos volg: Chimeriese plasmiede, saamgestel uit 'n bepaalde gedeelte van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen en 'n spesifieke merkergeen, word onderskeidelik óf deur middel van oösietskerninspuitings óf deur middel van transfeksies in fibroblaste en fibroblastagtige selle in die *in vivo* transkripsiesisteme ingedra. Na 'n inkubasieperiode word die transkripsieprodukte uit die selle geïsoleer en met behulp van DOT-BLOT analyses gekwantifiseer.

Die doel van hierdie deel van die studie is dan:

- * Om die *cis*-werkende reguleringselemente in die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen te identifiseer; en
- * om te bepaal of die resultate tussen die twee *in vivo* transkripsiesisteme ooreenkom.

5.2 DIE *XENOPUS LAEVIS* OÖSIETSISTEEM

5.2.1 KONSTRUKSIE VAN CHIMERIESE PLASMIEDE

Chimeriese gene waarin potensiële reguleringsgebiede van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen voorkom, is aan 'n merkergeen gekoppel. Globiengene wat nie in fibroblaste, die homoloë uitdrukkingssisteem vir Tipe 1-kollageengene, uitgedruk word nie, is in hierdie studie as merkergeen gebruik. Die mens $\alpha 1$ -globiengene is bo die β -globiengene verkies op grond van die posisie van benutbare restriksie-ensiemsnitpunte in die globiengene.

Plasmiede asook verdere aanvullende konstrunkte is deur CMS Rossouw gekonstrueer soos beskryf is in Rossouw *et al.* (1987). Twee voorloper chimeriese konstrunkte,

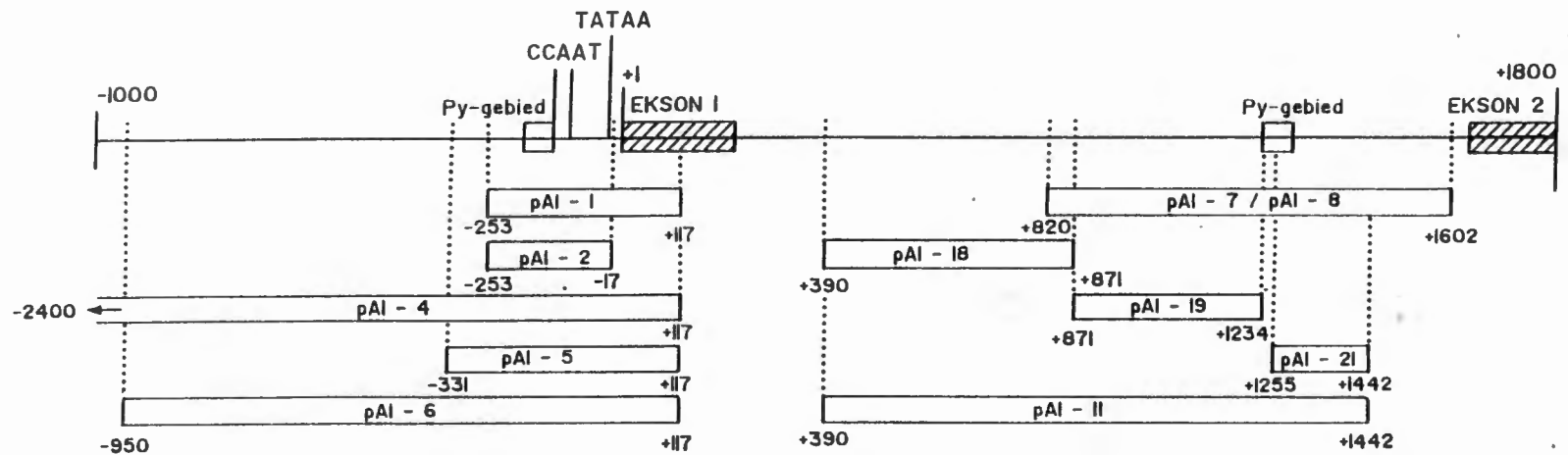
pAI-1 en pAI-2 waarvan die ander konstruëte later afgelei is, is eers gekonstrueer. Uit die genomiese kloon RMS-8 (Chu *et al.*, 1984) is 'n 370 bp Pvu II - Xba I-fragment wat oor die gebied vanaf -253 tot +117 van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen strek, geïsoleer. Hierdie gebied sluit onder meer die TATA- en CCAAT-homologieë asook 'n gedeelte van die 5'-nie transleerbare gebied in. Terselfdertyd is 'n 1 kb Cla I - Nco I-fragment uit plasmied pRB $\alpha 1$, wat die mens $\alpha 1$ -globiengene bevat, geïsoleer. Laasgenoemde fragment beskik oor onder meer die inisiasiepunt vir translasië (+37) en 'n 3'-oorvleuelende gebied van die mens $\alpha 1$ -globiengene. Oorhangende termini van beide geïsoleerde fragmente is met behulp van die Klenow-fragment soos in Afdeling 3.2.2 beskryf, opgevol, waarna die twee fragmente deur middel van stomppuntligering met mekaar geligeeer is om 'n chimeriese geen te vorm. Hierdie chimeriese geen bestaan dan uit 'n promotorgedeelte van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen gekoppel aan die transleerbare gebied van die mens $\alpha 1$ -globiengene. Vertering van die basisvektor pBR322 is met behulp van die restriksie ensieme Eco RV en Hind III uitgevoer, waarna die chimeriese geen aan hierdie pBR322-plasmied geligeeer is om plasmied pAI-1 te vorm.

Konstruksie van plasmied pAI-2 is op 'n soortgelyke wyse uitgevoer. Uit genomiese kloon RMS-8 is 'n 236 bp Pvu II - Sma I-fragment wat die gebied -253 tot -17 van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen beslaan, geïsoleer. Slegs die TATA- en CCAAT-homologieë is in hierdie promotorgedeelte teenwoordig. Vanuit plasmied pRB $\alpha 1$ is 'n 1293 bp Pvu II - BssH II-fragment geïsoleer, waarna die oorhangende termini met behulp van die Klenow-fragment opgevol is. Na ligering van die twee fragmente om 'n chimeriese geen te vorm, is hierdie geen op dieselfde wyse as vir pAI-1 in pBR322 ingevoeg om plasmied pAI-2 te vorm. Dieselfde 236 bp kollageenfragment wat in die konstruksie van pAI-2 gebruik is, is aan 'n tweede BssH II-punt, geleë op posisie +107 van die $\alpha 1$ -globiengene, geligeeer waarna die geen weer eens in pBR322 ingevoeg is. Die chimeriese plasmied pAI-3 wat sodanig gevorm is, beskik nie oor 'n inisiasiepunt vir transkripsie of translasië nie.

Om te bepaal wat die effek van verskillende geengebiede van die pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen op die relatiewe transkripsievlak is, is die kort promotorgebied in pAI-

1 stapsgewys verleng. Plasmied pAI-4 is gekonstrueer deur 'n 2,3 kb Bam HI - Apa I-fragment uit genomiese kloon RMS-8 te isoleer en tussen Pvu II (-253) en Apa I (-17) van pAI-1 in te voeg. Hierdie chimeriese plasmied beskik oor 'n groot 5'-oorvleuelende gebied en die TATA- en CCAAT-homologieë en strek vanaf -2400 tot +117. Die kollageenfragment is gekoppel aan posisie +37, die vernietigde Nco I-punt van die mens $\alpha 1$ -globiengene. Behandeling van plasmied pAI-4 met restriksie-ensieme Nco I en Eco RI of met restriksie-ensieme Xba I en Eco RI lei tot die vorming van onderskeidelik plasmied pAI-6 en pAI-5. Oorhangende termini is met behulp van die Klenow-fragment opgevul, waarna die grootste fragment geïsoleer en met homself geligier is. Plasmied pAI-6 beskik oor die pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeengebied wat strek vanaf -950 tot +117, terwyl pAI-5 vanaf -331 tot +117 strek.

In 'n tweede reeks chimeriese konstrakte is verskillende gedeeltes van die eerste intron van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengene aan die kort promotorgebied in pAI-2 gekoppel. Om die posisie van die intronvolgordes relatief tot die promotor na te maak, is van die unieke Sma I restriksie-ensiemsnitpunt in die eerste intron van die mens $\alpha 1$ -globiengene in plasmied pAI-2 gebruik gemaak. Vir plasmiede pAI-7 en pAI-8 is 'n 782 bp Sma I-fragment (+820 tot +1602) uit kloon RMS-8 geïsoleer en onderskeidelik op 'n kloksgewyse en antikloksgewyse oriëntasie in pAI-2 ingevoeg deur middel van oorvleuelende ligering. Uit plasmied pHS-int 1 (Figuur 4.3) is 'n 1000 bp BssH II - Hind III-fragment geïsoleer en in 'n opvolgende stap met 'n verdere restriksie-ensiem BstN I behandel. Drie fragmente met groottes van 460 bp, 350 bp en 190 bp is geïsoleer en oorhangende termini is met behulp van die Klenow-fragment opgevul. Elk van hierdie drie fragmente is in die Sma I-punt van pAI-2 ingevoeg deur middel van stomppuntligering om plasmiede pAI-18, pAI-19 en pAI-21 te vorm. Die introngedeelte van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengene wat in elke plasmied voorkom, strek vir pAI-18 vanaf +390 tot +871, pAI-19 vanaf +871 tot +1234 en vir pAI-21 vanaf +1255 tot +1442. Die 1000 bp BssH II - Hind III-fragment is ook as een geheel in pAI-2 ingevoeg om plasmied pAI-11 te vorm. Elk van die geengedeeltes van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengene wat tydens die konstruksie van die verskillende chimeriese plasmiede gebruik is, word tesame met die naam van die plasmied waarin die geengedeelte voorkom in Figuur 5.1 gegee.



Figuur 5.1 Skematiese uiteensetting van die geengedeeltes van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen betrokke by die konstruksie van die verskillende chimeriese plasmiede.

5.2.2 *XENOPUS LAEVIS* OÖSIETSISTEEM

5.2.2.1 INLEIDING

'n *In vivo* transkripsiesisteem soos die kerninspuiting van *X. laevis* oösiete verskaf 'n sensitiewe sisteem vir die identifikasie van mRNA's en die bestudering van die beheer van translase in lewende selle. Die voordeel van hierdie sisteem is kortliks soos volg:

- * Klein hoeveelhede DNA kan in die kerne van die *X. laevis* oösiete nagegaan word;
- * DNA ondergaan nie integrasie in die chromosome nie en kan na 'n kort periode bestudeer word;
- * die oösiete is in staat tot die transkripsie van 'n wye verskeidenheid eukariotiese gene met korrekte splytlas van die primêre transkripsieprodukte, translase van die mRNA en uitgebreide prosessering van die gesintetiseerde proteïene;
- * mens kollageen- en globiengene kan redelik maklik van die endogene gene onderskei word; en
- * die sisteem is al deur verskeie navorsingsgroepe benut vir die bepaling van die promotoraktiwiteit van 'n verskeidenheid eukariotiese gene (Lane *et al.*, 1976).

Die *X. laevis* oösiete wat in die eksperimente gebruik is, is uit wyfies wat aangekoop is van die African Xenopus Facility, verkry. Die voordeel van *X. laevis* oösiete bo ander oösiete is dat dié oösiet 'n enkel intakte sel met min eiergeel is en ook betreklik onaktief is. Hierdie oösiete is ook maklik in groot hoeveelhede bekombaar en is betreklik groot in verhouding tot ander oösiete, met 'n deursnee van ongeveer 1 mm. *X. laevis* oösiete is ook maklik bewerkbaar omdat dit elasties genoeg is om tot 5% van sy volume wat ingespuut word, te weerstaan. Die selle bly tot 72 uur na isolering nog aktief en vertoon min spesie-spesifisiteit ten opsigte van die mRNA wat getransleer word. Die konfigurasie van die DNA wat ingespuut word, beïnvloed wel die

transkripsie-effektiwiteit. Lineêre DNA-molekules het 'n laer transkripsie-effektiwiteit as sirkelvormige DNA (Gurdon *et al.*, 1971; Lane, 1976).

5.2.2.2 METODE

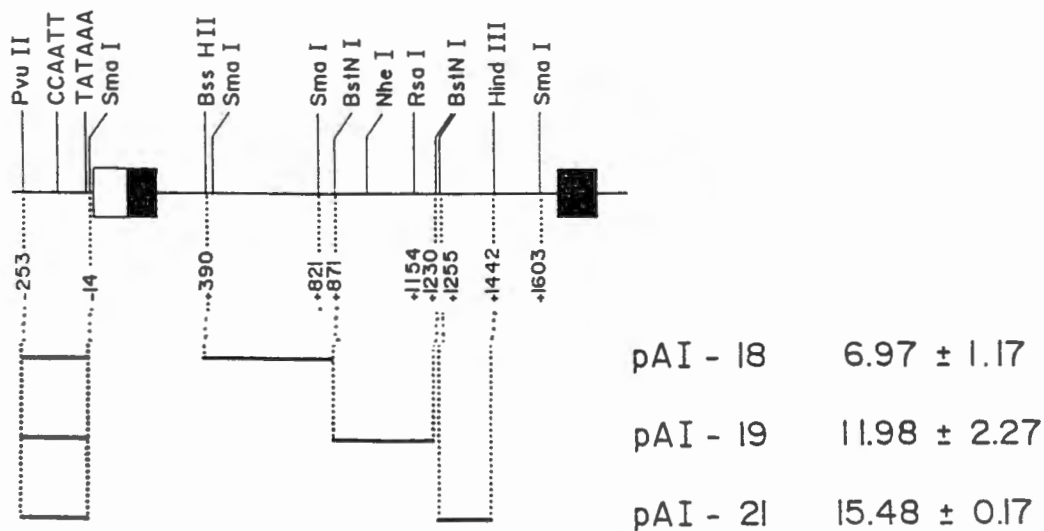
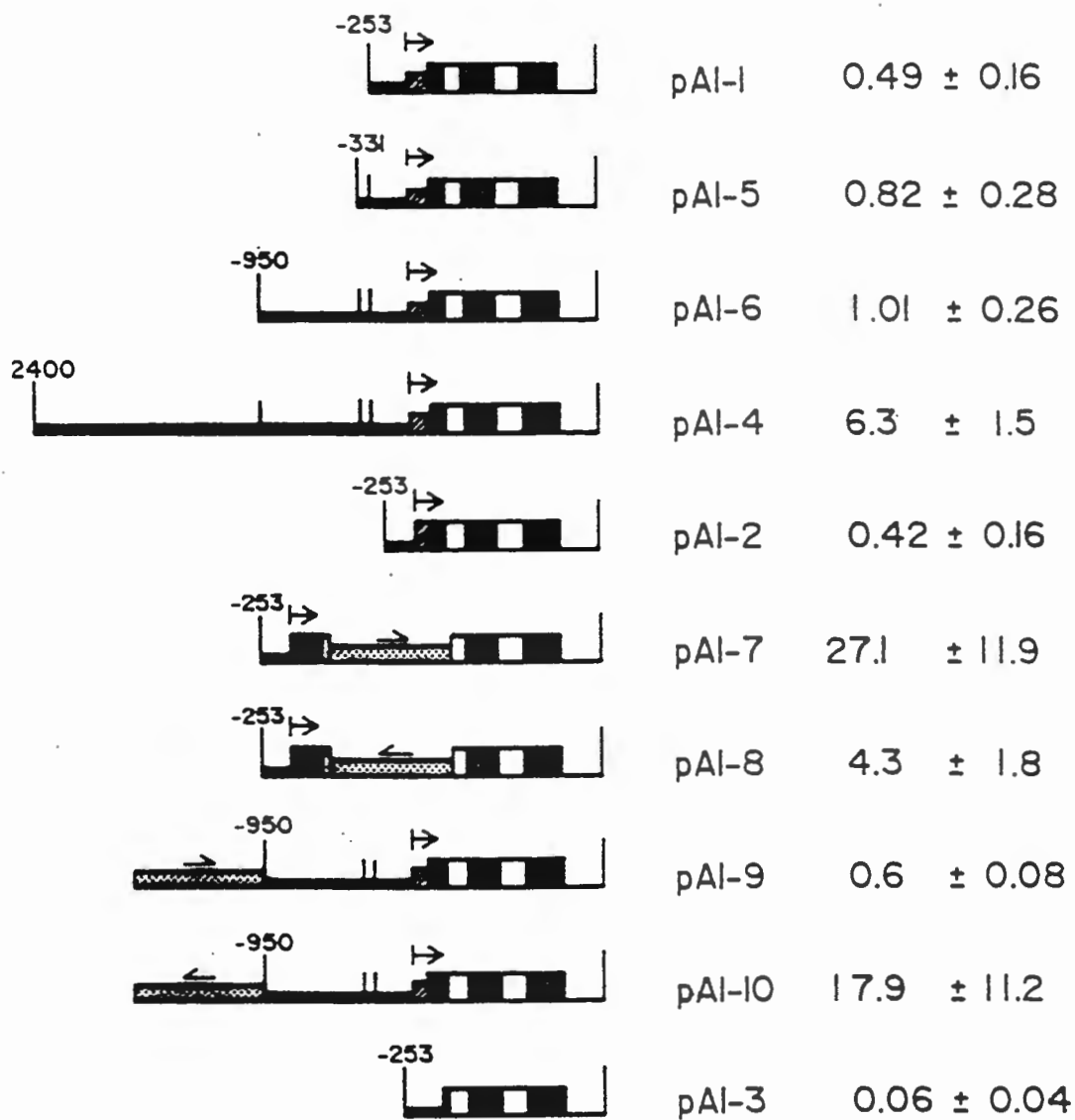
Die β -globienbevattende plasmied β pstd is vooraf in 'n vaste verhouding van 150 tot 350 met die verskillende chimeriese plasmiede gemeng. Klein hoeveelhede van hierdie plasmiedmengsel is dan met behulp van 'n mikro-manipuleerder in die kerne van die oösiere gespuut volgens die voorskrifte van Gurdon en Wickens (1983). Die metode is kortliks soos volg: Ongeveer 20 tot 40 nl plasmiedmengsel met 'n konsentrasie van $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ is in die oösietkerne ingespuut. Dertig oösiete is per analise ingespuut. Aangesien analyses getoon het dat slegs 'n derde van die oösiete tydens roetinesessies in die kerne ingespuut word, beteken dit dat transkripsie in ongeveer tien oösiete per analise plaasvind. Vir die transkripsie van eksogene gene is dit noodsaaklik dat die eksogene materiaal binne die oösietkern ingespuut word. Na inspuiting in die kerne is die oösiete vir ongeveer sestien uur by 19°C in gemodifiseerde Barth-buffer (88 mM NaCl ; 1 mM KCl ; $2,4 \text{ mM NaHCO}_3$; $10 \text{ mM Hepes (pH7,5)}$; $0,82 \text{ mM MgSO}_4$; $0,33 \text{ mM Ca(NO}_3)_2$; $0,41 \text{ mM CaCl}_2$) geïnkubeer. Vir die analise van die transkripte word die RNA uit die oösiete geëkstraheer deur die homogenisering van vyf tot vyftien oösiete in $0,5 \text{ ml}$ homogeniseringsbuffer (10 mM NaCl ; $2\% \text{ SDS}$; 2 mM MgCl_2 ; 1 mg.ml^{-1} proteïnase K; $10 \text{ mM Tris by pH 7,5}$). Totale RNA is hierna geëkstraheer deur middel van 'n fenol:chloroform (1:1)-ekstraksie, waarna die RNA aan etanolpresipitering onderwerp is. Poli(A)-RNA is met behulp van papieraffiniteitschromatografie volgens die metode van Werner *et al.* (1984) uit die totale RNA geïsoleer (Afdeling 3.7). Kwantifisering van die mRNA is deur middel van die DOT-BLOT-metode (Afdeling 3.8) uitgevoer. Die peilers wat tydens die hibridiseringsproses gebruik is, is met behulp van α - ^{32}P -dCTP vervangingsmerking (Afdeling 3.3.2.2.) radioaktief gemerk. Die twee peilers wat gebruik is, is die $880 \text{ bp Nco I} - \text{Pvu II } \alpha 1$ -globienfragment van die plasmied

pRB α 1 en die 1353 bp Nco I - Eco RI β -globienfragment van die plasmied β pstd.

Vir 'n kwantitatiewe bepaling van die transkripsie van onderskeidelik die chimeriese gene en die β -globiengene, is die nitrosellulosemembraan filters opgesny en aan vloeistofsintillasiepektrometrie onderwerp. Die spesifieke aktiwiteit van elke gehibridiseerde poli(A)-mRNA is bepaal, waarna 'n hibridiseringskromme van pg-peilers wat aan die mRNA gebonde is tot die relatiewe konsentrasie van die poli(A)-mRNA verkry is. Uit die helling van die lineêre fase van die hibridiseringskromme is die transkripsie van die α 1-globiengene en die β -globiengene bereken. Om die relatiewe transkripsievlakke (RTL) van die gene te kan bepaal, moet eerstens die verhouding tussen die transkripsiewaardes van die α -globiengene en die β -globiengene (soos verkry uit die hibridiseringskromme) bereken en genormaliseer word ten opsigte van die verhouding waarin hulle in die kerne ingespuut is. Die RTL-waardes is dan bereken deur die vergelyking van Dierks *et al.* (1983) te gebruik wat bekend staan as die verhouding van die mutantetranskripte tot die verwysingsgeentranskripte (β pstd), gedeel deur die verhouding tussen die pseudo-wilde tipe geentranskripte (pRB α 1) tot die verwysingsgeentranskripte. Indien die transkripte van die mutante geen struktureel identies is aan die pseudo-wilde tipe word aanvaar dat die stabiliteit dieselfde is en die RTL-waarde van die mutantegeen 'n direkte bepaling van die relatiewe effek van die promotor is.

5.2.2.3 EKSPERIMENTELE DATA

Nadat analyses vir elke chimeriese plasmied uitgevoer is en die RTL-waardes vir elkeen bereken is, is die waardes van Tabel 5.1 verkry. Vergelyk ook Figuur 5.2.



Figuur 5.2 Samestelling van die onderskeie chimeriese gene en hul RTL-waardes.

TABEL 5.1 Samevatting van die RTL-waardes van die mutante gene verkry na inspuiting in *X. laevis* oösiere

PLASMIED	RTL
pAI-1	0,49 ± 0,16
pAI-5	0,82 ± 0,28
pAI-6	1,01 ± 0,26
pAI-4	6,30 ± 1,50
pAI-3	0,06 ± 0,04
pAI-2	0,42 ± 0,16
pAI-7	27,1 ± 11,9
pAI-8	4,30 ± 1,80
pAI-11	5,01 ± 3,63
pAI-18	6,97 ± 1,17
pAI-19	11,98 ± 2,27
pAI-21	15,48 ± 0,17

Soos uit die RTL-waardes in die tabel afgelei kan word, is die minimale promotor in plasmied pAI-2 genoeg om tot inisiasie van transkripsie te lei. Die hoë RTL-waarde met die verlengde promotor in pAI-4 toon dat daar waarskynlik volgordes in die 5'-stroom-opgebied weg van die CCAAT- en TATAA-homologieë voorkom wat die vlakke van transkripsie beïnvloed.

Baie hoë vlakke van transkripsie is waargeneem by plasmied pAI-7 wat 'n 782 bp Sma I-intronfragment tesame met die minimale kollageenpromotor (vergelyk AI-2) bevat. 'n Sestigvoudige verhoging in die RTL-waardes is waargeneem. Omgekeerde oriëntasie van die intronfragment (pAI-8) toon steeds verhoogde RTL-waardes, maar is in hierdie geval slegs tienvoudig verhoog. Die RTL-waardes van kleiner gebiede van die 782 bp Sma I-intronfragment (pAI-19 en pAI-21) wys duidelik dat die hele 782 bp Sma I-fragment noodsaaklik is om 'n sestigvoudige verhoging in RTL-waardes teweeg te bring. Ook die intrangebied 5'stroom-op van die Sma I-fragment soos ingebou in chimeriese plasmied pAI-18, vertoon 'n bykans vyftienvoudige verhoging in transkripsievlakke. Hoewel dit voorkom of byna die hele eerste intrangebied tot verhoogde transkripsievlakke bydra, is dit uit die

resultate duidelik dat 'n aktiveringsvolgorde in die gebied wat strek van ongeveer +820 tot +1602 voorkom.

5.3 DIE TRANSFEKSIESISTEEM

Ondersoek na die waargenome aktiveringsaktiwiteit in die eerste intron is ook in die meer homoloë transfeksiesisteem uitgevoer. Om hierdie gebiede te ondersoek, is dit noodsaaklik om die fragmente wat oor 'n eukariotiese seleksiemerkergeen beskik, in 'n vektor te kloneer. Vir die doel van hierdie studie is die vektor pSV2-neo gebruik, wat oor die neomisiengene as seleksiemerker beskik.

5.3.1 KONSTRUKSIE VAN PLASMIEDE

Konstrukte is gebou soos deur Vergeer (1988) beskryf en is kortliks soos volg: Chimeriese plasmiede pAI-2, pAI-7 en pAI-8 is elk agtereenvolgens met die restriksie-ensieme Bam HI en Sca I behandel, terwyl pSV2-neo met die restriksie-ensieme Eco RI en Sma I behandel is. Na eluering van die korrekte fragmente, dit is die 5,2 kb SV2-neo-fragment, die 2,9 kb AI-7 en AI-8 fragmente en die 2,1 kb AI-2 fragment, is die kollageenfragmente met behulp van stomppuntligering elk aan die pSV2-neo-fragment geligier om plasmiede pW1000, pW1001 en pW1002 te vorm. Plasmied pW1000 beskik oor die minimale promotorgebied van pAI-2, terwyl pW1001 en pW1002 oor die 782 bp Sma I-intronfragment in 'n kloksgewyse en antikloksgewyse-oriëntasie beskik soortgelyk aan dié in pAI-7 en pAI-8.

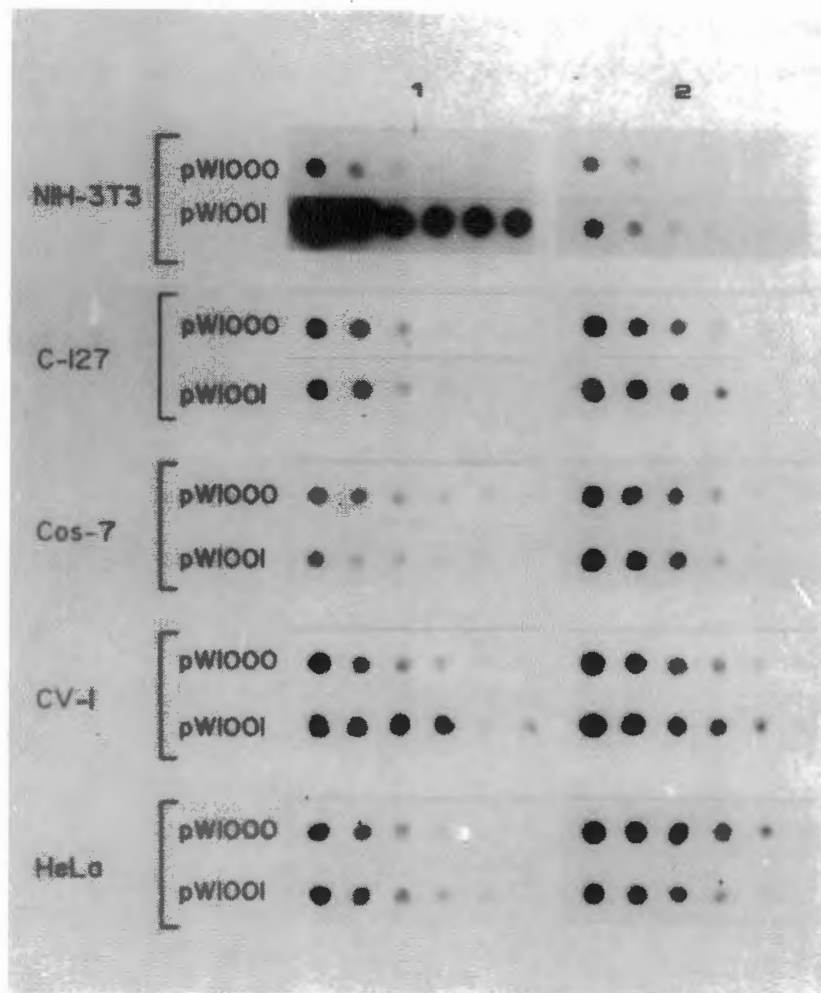
5.3.2 TRANSFEKSIE

Korttermyntransfeksie is deur middel van die kalsiumfosfaatmetode op vyf verskillende sellyne uitgevoer. Hierdie sellyne bestaan uit fibroblastagtige selle soos die COS-7, CV-1 en C127-sellyne, epiteelagtige selle soos die HeLa-sellyn en fibroblaste soos die NIH-3T3-sellyn. Die transfeksie is uitgevoer soos beskryf deur Vergeer (1988). Die opeenvolgende stappe is soos volg:

Weefselkulture wat ongeveer 70-80% volgroeid is, is 24 uur voor transfeksie in 'n subkultuurverhouding van 1:1 verdeel. Drie uur voor transfeksie is die medium met vars medium vervang. Die kalsiumfosfaat-DNA-presipiteringsmengsel is ondertussen saamgestel. Samestelling van hierdie presipiteringsmengsel is 'n belangrike stap en moet in die regte volgorde geskied. Aanvanklik is 5 μ g DNA (gesuiwer deur twee CsCl-gradiënte, vergelyk 3.2.1) onder steriele toestande tot 0,5 ml in HBS-medium (0,14 M NaCl; 25 mM Hepes; 0,75 mM Na₂HPO₄ by pH 7,1) verdun. Hierby is 31 μ l van 'n 2 M CaCl₂-oplossing stadig drupsgewys bygevoeg, die mengsel is versigtig gemeng en daarna vir 30 minute by kamertemperatuur geïnkubeer. Die pH van die HBS-medium is baie belangrik en moet presies 7,1 wees. Terwyl die weefselkultuurflesse skuins gehou is, is die presipiteringsmengsel stadig op die selle gedrup, waarna die selle vir vier uur by 37°C geïnkubeer is. Vervolgens is die medium gedekanteer en die selle liggies met DMEM in die fles gespoel. Direk daarna is die selle vir drie minute aan 'n gliserolskok onderwerp. Die 3 ml skokmedium bestaan uit 15 g%(m/v) gliserol in HBS. Die selle is na die skok weer eens met DMEM gespoel, waarna volledige groeimedium bygevoeg is en die selle vir 48 uur by 37°C gekweek is. Hierna is totale RNA uit die onderskeie kulture geïsoleer (Afdeling 3.7), waarna dieselfde prosedure as by die oösierte gevolg is om die Poli(A)-mRNA te isoleer en te kwantifiseer. Peilers wat tydens die hibridiseringsproses gebruik is, is die 880 bp Nco I - Pvu II α 1-globienbevattende fragment van plasmied pRB α 1 en die 881 bp BssH II - Hind III neomisien-bevattende fragment van plasmied pSV2-neo.

5.3.3 EKSPERIMENTELE DATA

Die verskillende poli(A)-mRNA's is aan DOT-BLOT-analise (Afdeling 3.8) onderwerp. Na die hibridisering van die twee betrokke peilers aan die membraangebonde mRNA is die membrane aan X-straalfilm blootgestel. 'n Voorbeeld van die resultate wat verkry is, word in Figuur 5.3 gegee. In hierdie figuur word die hibridiseringspatroon van die peilers aan die poli(A)-mRNA van al die onderskeie sellyne getransfekteer met pW1000 en pW1001 aangetoon. Soortgelyke resultate is al vir die poli(A)-mRNA van pW1002 getransfekteerde selle verkry. Vir 'n kwantitatiewe bepaling van die transkripsie van die α -globien- en neo-gene is die



Figuur 5.3 Dot-Blot-analise van poli(A)-mRNA van pW1000 en pW1001 getransfekteerde soogdiersellyne.

Poli(A)-mRNA is uit totale RNA van getransfekteerde selle geïsoleer met behulp van papieraffiniteitschromatografie. Die mRNA is in $3 \mu\text{l}$ hoeveelhede op die nitrosellulosemembrane geplaas en met twee verskillende ^{32}P -gemarkte peilers gehibridiseer:

1. Die 880 bp Nco I - Pvu II $\alpha 1$ -globienbevattende fragment van plasmied pRB $\alpha 1$; en
2. Die 881 bp BssH II - Hind III neo-bevattende fragment van plasmied pSV2-neo.

Outoradiografie is vir 24 uur by -70°C uitgevoer.

filters opgesny en aan vloeistofsintillasiespektrometrie onderwerp. Na berekening van die spesifieke aktiwiteit van elke gehibridiseerde poli(A)-mRNA monsters, is 'n hibridiseringskromme van pg peilergebonde aan die mRNA tot die relatiewe konsentrasie van die poli(A)-mRNA verkry (resultate nie getoon nie).

Vir hierdie transkripsiesisteen is die RTL-waardes van pW1000; pW1001 en pW1002 bereken uit die verhouding tussen die α 1-globiengene en die neomisiengene soos verkry uit die hibridiseringskrommes. Die waardes wat uit die hibridiseringskrommes verkry is, is dan weer eens in die vergelyking van Dierks *et al.* (1983) gebruik. In die vergelyking is die waardes van pW1001 en pW1002 as mutante geentranskripte gebruik, die neomisiengene as verwysingsgeentranskripte en pW1000 as pseudo-wildetipe transkripte. Die berekende RTL-waardes word in Tabel 5.2 gegee.

Tabel 5.2 Relatiewe transkripsievlakke van die mutante gene in soogdier-sellyne

Sellyn	Plasmied	RTL	
NIH-3T3	pW1001	101,40 ± 14,48	(4)
	pW1002	12,33 ± 2,23	(4)
CV-1	pW1001	8,39 ± 3,40	(2)
	pW1002	5,61 ± 2,20	(2)
HeLa	pW1001	5,74 ± 0,93	(2)
	pW1002	7,54 ± 1,10	(2)
COS-7	pW1001	3,57 ± 0,48	(3)
	pW1002	2,45 ± 0,07	(2)
C127	pW1001	2,50 ± 1,09	(3)
	pW1002	2,45 ± 0,56	(2)

Bestudering van die RTL-waardes in Tabel 5.2 toon dat in al die sellyne behalwe HeLa, die RTL-waarde vir pW1001 (kloksgewyse-oriëntasie) of gelyk of hoër is as vir pW1002 (antikloksgewyse-oriëntasie). Opvallend is egter dat 'n bykans honderdvoudige verhoging in transkripsievlakke voorkom met pW1001 getransfekteer in NIH-3T3-selle. Ook die antikloksgewyse oriëntasie toon 'n redelike hoë uitdrukkingsvlak in hierdie fibroblaste. Dit is dus duidelik dat hierdie 782 bp Sma I-intronfragment aktiveringsaktiwiteit besit en hoewel aktiveringsvolgordes onafhanklik van oriëntasie funksioneer (Afdeling 2.2.1.2), hierdie aktiveringsvolgordes by voorkeur in 'n kloksgewyse-orientasie tot die minimale promotor optree. Daarteenoor vertoon die fibroblastagtige C127-selle wat nie oor die vermoë beskik om Tipe I-kollageen uit te druk nie, bykans geen verhoging in transkripsievlakke nie.

5.4 SAMEVATTING

Identifisering van reguleringsgebiede in die mens pro- α 1(I)-kollageengeen is uitgevoer deur middel van twee transkripsiesisteme, naamlik die *X. laevis* oösietsisteem en die transfeksiesisteem. Resultate wat verkry is, kan soos volg opgesom word:

- * Transkripsie van die merkergeen in die oösietsisteem vind plaas;
- * die oösietsisteem is in staat om tussen die transkripsie van verskillende plasmiede te diskrimineer;
- * 'n minimale promotor wat geleë is tussen -253 en -17 is genoeg om transkripsie te inisieer;
- * 'n transkripsionele aktiveringsvolgorde kom in die gebied +820 tot +1602 voor en word deur die transfeksiesisteem bevestig;
- * die aktiveringsvolgorde toon by die transfeksiesisteem selspesifisiteit aan, aangesien 'n honderdvoudige verhoging in transkripsievlakke by NIH-3T3-

fibroblaste teenoor bykans geen verhoging in C127-selle waargeneem word;
en

- * maksimale aktivering van transkripsie is verkry indien die aktiveringsvolgorde in dieselfde oriëntasie as die promotor geleë is.

'n Promotorgebied en aktiveringsvolgorde in die eerste intron van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen is as reguleringsgebiede in beide transkripsiesisteme geïdentifiseer. Vir verdere analise en karakterisering van hierdie reguleringsgebiede is dit noodsaaklik om die *trans*-werkende faktore te karteer en die invloed van hierdie transkripsie-elemente op die reguleringsgebiede te bepaal. Sodoende sal 'n beter begrip van die geenregulering van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen verkry kan word. Om hierdie doel te bereik, is die eksperimente soos in Hoofstukke 6 tot 8 beskryf, uitgevoer.

HOOFSTUK 6

IDENTIFISERING VAN BINDINGSGBIEDE VIR TRANSKRIPSIEFAKTORE IN DIE REGULERINGSGBIEDE VAN DIE MENS PRO- α 1(I)-KOLLAGEENGEEN

6.1 INLEIDING

Interaksie tussen die *trans*-werkende bindingsproteïene en die *cis*-werkende DNA-gebiede vind tydens transkripsionele regulering van sowel prokariotiese as eukariotiese geenuitdrukking plaas. Hierdie *trans*-werkende bindingsproteïene, ook bekend as transkripsiefaktore, kan die transkripsionele regulering van gene positief of negatief beïnvloed, afhangend van die rangskikking en posisie van hierdie faktore in die geen. Die identifisering van die *cis*-werkende reguleringselemente in Hoofstuk 5 deur middel van funksionele toetse het aanleiding gegee tot die volgende twee vrae:

- * Vind binding van transkripsiefaktore aan die reguleringsgebiede plaas; en
- * indien wel, waar op die DNA-volgorde van die reguleringsgebiede vind binding van hierdie transkripsiefaktore plaas?

Gedurende 1980 het Manley *et al.* (1980) aangetoon dat ruwe kernekstrakte transkripsie in die laat promotorgebied van die adenovirus Ad2 inisieer. Die selvrye-sisteem is dus 'n goeie *in vitro*-sisteem om die faktore wat die snelheid van inisiasie in verskillende promotorgebiede beheer, te bestudeer. Ontwikkeling van selvrye-transkripsiesisteme wat daartoe in staat is om in die teenwoordigheid van RNA-polimerase II transkripsie te inisieer, kan dus van groot waarde wees vir die bestudering van die transkripsiegebeure in die eukariote.

Ruwe kernekstrakte bevat 'n mengsel van 'n verskeidenheid proteïene waarvan 'n gedeelte volgorde-spesifieke en 'n gedeelte nie-spesifieke interaksies met die DNA ondergaan (Manley *et al.*, 1980). Aangesien nie-spesifieke proteïene willekeurig aan die DNA bind, kan hierdie binding tot inhibering van transkripsie aanleiding gee. Uitskakeling van hierdie probleem geskied deur die toevoeging van nie-spesifieke

draer-DNA waaraan hierdie nie-spesifieke proteïene tydens analise-eksperimente kan bind. Die nie-spesifieke draer-DNA wat gebruik kan word, is onder meer *E. coli*-DNA, kalftimus-DNA of die sintetiese polimeer poli(dI.dC).

Op grond van die reguleringsgebiede wat deur funksionele analises in Hoofstuk 5 geïdentifiseer is, is besluit om die gebied van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen wat strek vanaf -442 tot +1697, te ondersoek vir die teenwoordigheid van gebiede waar DNA-proteïeninteraksies mag voorkom. Hierdie gebied sluit onder meer die promotor, eerste intron met die aktiveringsvolgorde en 'n gedeelte van die tweede ekson in (Figuur 4.1). Om die doelwitte van hierdie hoofstuk te bereik, is van twee tipes ruwe kernekstrakte en S-300 fraksies, naamlik HeLa en BJA-B, gebruik gemaak. Hierdie ruwe kernekstrakte is uit HeLa en BJA-B-selle geïsoleer en op 'n Sephacryl S-300 kolom verder gesuiwer en gefraksioneer om die S-300-fraksies te verkry. Daar is van hierdie twee verskillende selteipes gebruik gemaak aangesien BJA-B selle onder normale omstandighede nie daartoe in staat is om Tipe I-kollageen uit te druk nie, terwyl HeLa-selle dit wel kan doen. BJA-B selle is limfosiete wat uit 'n mens Burkitt limfoma geïsoleer is (Klein *et al.*, 1974) en HeLa-selle is mens epiteelagtige kankerselle (Puck en Marcus, 1955). Deur van ruwe kernekstrakte uit hierdie twee verskillende sellyne gebruik te maak, kan die rol van selspesifisiteit tydens DNA-proteïeninteraksies terselfdertyd bestudeer word.

Die tegniek van DNase I-afskermingsanalise word gebruik om proteïene wat betrokke is by DNA-proteïeninteraksies, op te spoor. Aangesien die transkripsiefaktore wat teenwoordig is in ruwe kernekstrakte maar slegs 0,001% van die totale sellulêre proteïene uitmaak (Manley *et al.*, 1980) is dit noodsaaklik dat die tegniek optimaal moet funksioneer om die effek van hierdie proteïene op geenuitdrukking te kan waarneem. Om optimale funksionering van hierdie tegniek te verseker, is dit dus noodsaaklik dat die kondisies vir die DNase I-afskermingstegniek eers gestandaardiseer moet word alvorens daar voortgegaan kan word met eksperimente.

6.2 STANDAARDISERING VAN DIE DNase I-AFSKERMINGSTEGNIEK

Die SV40-vroeë promotorgebied is reeds goed bestudeer en interaksie van transkripsiefaktore soos Sp1, Ap1 en Ap2 met die SV40-DNA sowel as die regulering van hierdie geen word breedvoerig in die literatuur beskryf (Mitchell *et al.*, 1987). Op grond hiervan en die feit dat die promotor van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen bykans net so sterk as die SV40-promotor is (Koedood, 1993), is die SV40-vroeë promotorgebied gekies om as standaard vir hierdie studie te dien. In hierdie studie is die standaardisering van tegnieke en vergelykende eksperimente dus met behulp van dié SV40-DNA uitgevoer. Die ruwe kernekstrakte wat tydens eksperimente gebruik is, is in die plaaslike laboratorium volgens die metode van Dignam *et al.* (1983) geïsoleer, terwyl verdere suiweringsstappe met Sephacryl S-300 (Pharmacia) uitgevoer is soos deur Bohmann *et al.* (1989) beskryf.

6.2.1 KWALITEIT VAN DIE GEMERKTE FRAGMENTE

DNA-fragmente wat tydens DNase I-afskermingsanalises gebruik word, mag slegs aan een 5'-termini radioaktief gemerk wees. Om te verseker dat die kwaliteit van sodanig gemerkte fragmente goed is en nie gedegradeer is nie, word die radioaktief gemerkte fragmente na merking getoets. Dit geskied deur die fragmente op 'n 5% nie-denaturerende gel te skei (Afdeling 3.6). In Figuur 6.1 word 'n voorbeeld weergegee van 'n 5'-radioaktief gemerkte fragment van goeie kwaliteit en van 'n 5'-radioaktief gemerkte fragment wat degradasie ondergaan het. Die gevolge van die gebruik van hierdie twee gemerkte fragmente in 'n volgende eksperimentele stap word in Figuur 6.1 paneel B gegee.

In paneel A van Figuur 6.1 word die 5'-radioaktief gemerkte koderende string van SV40- en CX-fragmente na skeiding op 'n 5% nie-denaturerende poli-akriedamiedgel getoon. Die 320 bp Eco RI - Xho I-fragment van SV40 is soos beskryf in Afdeling 4.2, geïsoleer en daarna met behulp van γ -³²P-dATP aan die 5'-termini radioaktief gemerk (Afdeling 3.3.2.1.). Deur behandeling met die restriksie ensiem Hind III is van een 5'-gemerkte termini ontslae geraak en is 'n 308 bp Eco RI - Hind III-

fragment, 5'-gemark aan die Eco RI-punt, verkry. Die 413 bp Eco RI - Sal I CX-fragment is geïsoleer soos beskryf in Afdeling 4.5. Na 5'-radioaktiefmerking is van die een 5'-gemarkte termini ontslae geraak deur behandeling met die restriksie-ensiem Bam HI. 'n Fragment met 'n grootte van 395 bp en 5'-gemark aan die Sal I-punt is sodoende verkry. Tesame met die twee 5'-gemarkte fragmente is pBR322-DNA, behandel met die restriksie-ensiem Msp I, as groottestandaard op die gel geskei. Soos waargeneem kan word uit die resultate in paneel A, vertoon die 5'-gemarkte SV40-fragment (Baan 1) 'n enkel skoon band. Daarteenoor is 'n smeer bo en onder die band van die CX-fragment (baan 2) sigbaar, wat 'n aanduiding van degradasie van die DNA is. Bande sigbaar in en net onder die punt waaruit die DNA geëlektroforeer het, is ook 'n aanduiding dat die DNA nie volledig deur die restriksie-ensieme verteer is nie.

Die gebruik van hierdie twee fragmente in die DNase I-afskermingstegniek word in paneel B aangetoon. DNase I-afskermingsanalise is sonder die byvoeging van proteïene (a) en met byvoeging van suiwer Sp1-proteïene(b) soos beskryf in Afdeling 3.4, op beide fragmente uitgevoer en op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei (Afdeling 3.6). pBR322-DNA behandel met die restriksie-ensiem Msp I is as groottestandaard gebruik. Soos uit die resultate in paneel B waarneembaar is, vertoon die SV40-fragment 'n duidelik onderskeibare DNase I-verteringspatroon in beide bane. 'n Duidelike afskermingsgebied waar binding van die Sp1-proteïene aan die DNA plaasvind, is ook sigbaar. In teenstelling hiermee is geen duidelike DNase I-patroon in enige van die twee bane met die CX-fragment waarneembaar nie. Slegs twee lang smere is sigbaar.

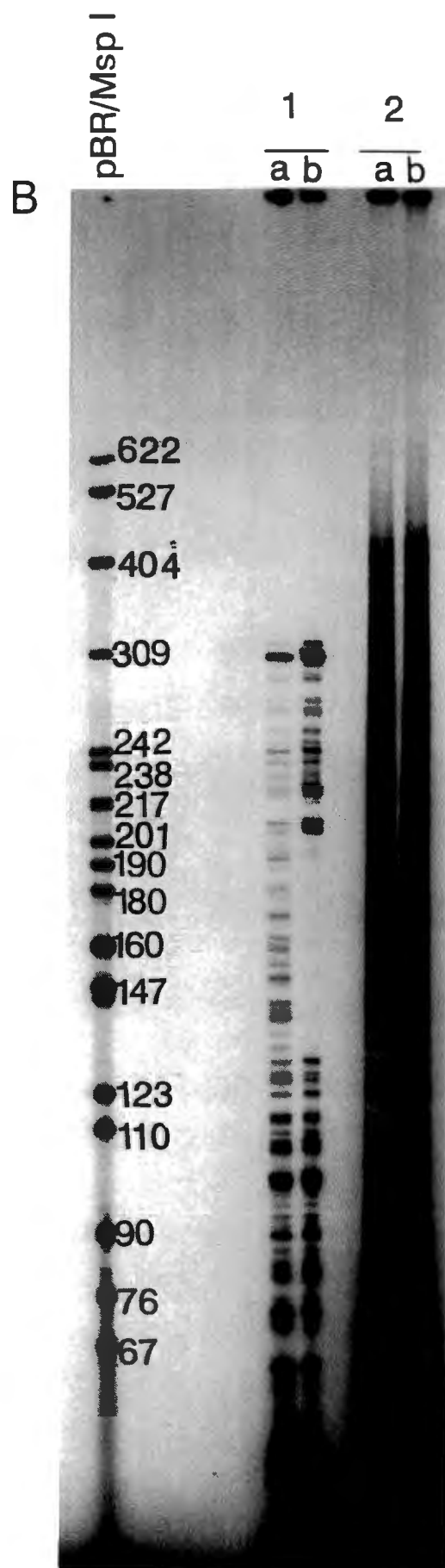
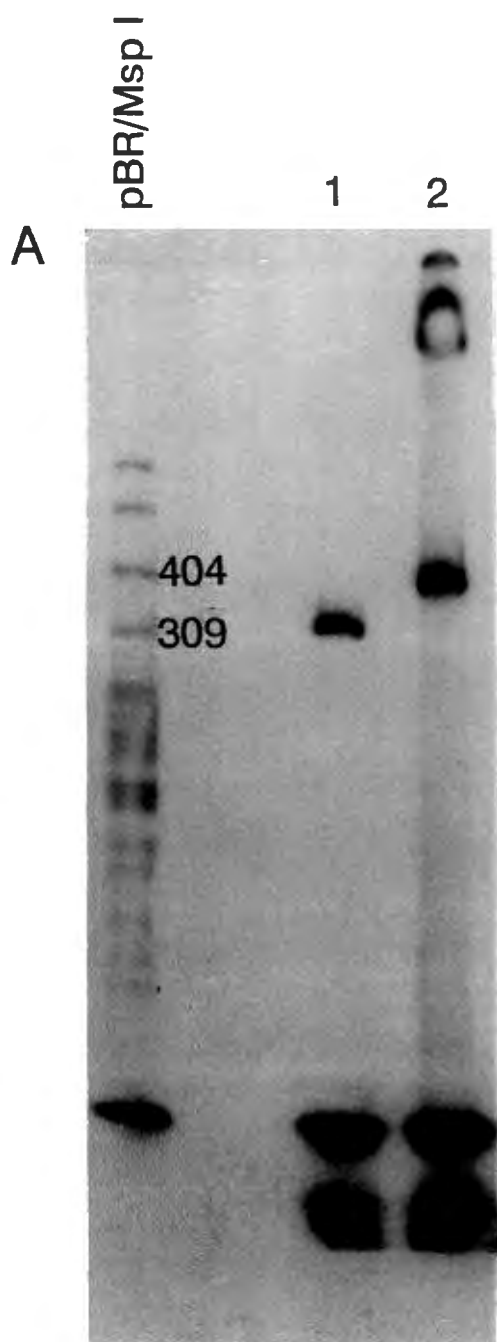
Uit die resultate in Figuur 6.1 is dit dus duidelik dat die kwaliteit van die 5'-radioaktiefgemarkte DNA-fragmente van die uiterste belang is vir gebruik in DNase I-afskermingsanalise. Volledige restriksie-ensiemvertering van die DNA en geen degradasie van die radioaktiefgemarkte DNA-fragment is 'n voorvereiste om goeie kwaliteit radioaktiefgemarkte fragmente te verseker.

6.2.2 DNase I-KONSENTRASIE

Die gebruik van 'n korrekte DNase I-konsentrasie tydens DNase I-afskermingsanalise is uiters noodsaaklik, aangesien te veel of te min DNase I kan veroorsaak dat 'n onvolledige DNase I-verteringspatroon verkry kan word. Optimale DNase I-konsentrasie moet vir elke DNA-fragment wat in DNase I-afskermingsanalise betrokke is, afsonderlik bepaal word. Die optimale DNase I-konsentrasie word as optimaal beskou wanneer ongeveer een snit per DNA-molekule sodanig voorkom dat ongeveer 50% van die fragment willekeurige snitte bevat en 50% nog intakt is (Murray *et al.*, 1992).

Vir die "standaard" DNA in hierdie studie, naamlik die SV40-fragment, is die optimale DNase I-konsentrasie reeds deur die vervaardigers van DNase I bepaal. DNase I-afskermingsanalise word in die geval van die SV40-vroeë promotor-DNA waargeneem wanneer na verdunning van 5 μ l DNase I (0,2 μ g/ μ l) in 100 μ l 10 mM Tris Cl (pH8,0) 3 μ l van die verdunde DNase I (30 ng) gebruik word. Vertering van die DNA met DNase I word vir een minuut by kamertemperatuur uitgevoer (Promega Technical Bulletin Nr 111). Optimale DNase I-konsentrasies vir die sewe kollageen-fragmente (Figuur 4.1) is bepaal deur elk van die fragmente aan 'n DNase I-konsentrasiereeks te onderwerp.

Twee voorbeelde van die optimalisering van die DNase I-konsentrasie vir die kollageenfragmente word in Figuur 6.2 gegee. Beide hierdie fragmente is met behulp van DNase I-afskermingsanalise in die afwesigheid van bindingsproteïene met wisselende DNase I-konsentrasies verteer. DNase I is vooraf op dieselfde wyse as vir die SV40-DNA verdun en is vir elke eksperiment vars voorberei. Figuur 6.2, paneel A toon die DNase I-konsentrasiereeks met die 395 bp Sal I - Bam HI-fragment van plasmied pCX5 en paneel B die van die 320 bp Xba I - Sac I-fragment van plasmied pHR295. Die CX-fragment is geïsoleer en radioaktief gemerk soos beskryf in Afdeling 4.5, terwyl die HR295-fragment geïsoleer en radioaktief gemerk is soos in Afdeling 4.3.2 beskryf. Na verdunning is die DNase I in konsentrasies wat wissel



Figuur 6.1 Onderzoek na die kwaliteit van die 5'-radioaktiefgemarkte peilers.

A: Skeiding van 5'-radioaktiefgemarkte DNA-fragmente op 'n 5% nie-denaturerende poli-akriëlamiedgel na merking.

Baan 1: die 320 bp Eco RI - Xho I-fragment van SV40.

Baan 2: die 413 bp Eco RI - Sal I-fragment van plasmied pCX.

B: DNase I-afskermingsanalise in die teenwoordigheid van Sp1 met die 5'-radioaktiefgemarkte fragmente en skeiding van die fragmente op 'n 6% denaturerende poli-akriëlamiedgel.

Baan 1: (a) die SV40-fragment sonder Sp1

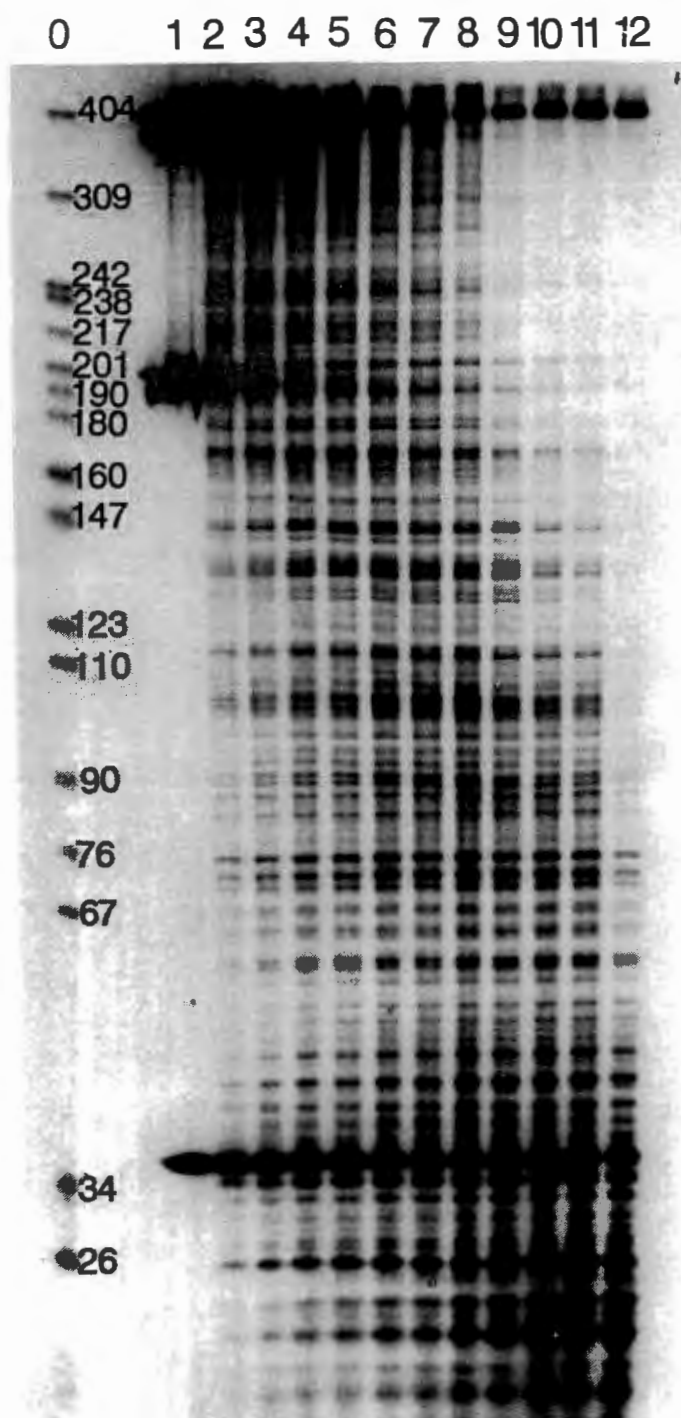
 (b) die SV40-fragment + 1µl Sp1 (15 ng/µl)

Baan 2: (a) die CX-fragment sonder Sp1

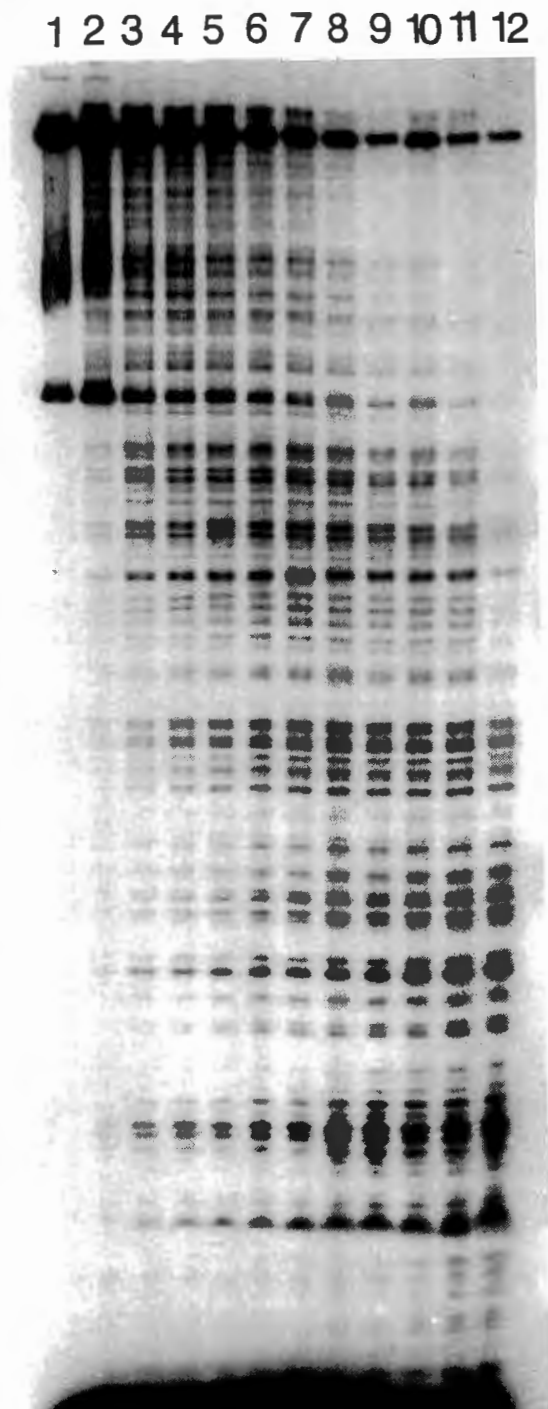
 (b) die CX-fragment + 1µl Sp1 (15 ng/µl)

pBR322/Msp I is as groottestandaard saam met die DNA op beide gelle geskei.

A



B



Figuur 6.2 Optimalisering van die DNase I-konsentrasie.

Die kollageenfragmente is aan wisselende DNase I-konsentrasies onderwerp en op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. pBR322/Msp I is as groottestandaard (baan 0) saam met die DNA op die gel geskei. Die twee fragmente wat getoon word, is:

A: Die 395 bp Sal I - Bam HI-fragment van plasmied pCX; en

B: Die 320 bp Xba I - Sac I-fragment van plasmied pHR295.

Dieselfde wisselende DNase I-konsentrasies is vir beide fragmente gebruik en is:

Baan 1:	0 ng	Baan 7:	30 ng
Baan 2:	5 ng	Baan 8:	40 ng
Baan 3:	10 ng	Baan 9:	50 ng
Baan 4:	15 ng	Baan 10:	60 ng
Baan 5:	20 ng	Baan 11:	75 ng
Baan 6:	25 ng	Baan 12:	100 ng

van 0,5 μ l (5 ng) tot 10 μ l (100 ng) by die DNA gevoeg en een minuut by kamertemperatuur verteer. Die res van die eksperiment is uitgevoer soos in Afdeling 3.4 beskryf, waarna die DNA op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei is.

Ondervertering van die DNA-fragment met DNase I vertoon 'n oneweredige DNase I-bandpatroon. Die intensiteit van die bande is laag aan die onderpunt van die gel, terwyl intakte DNA-fragment hoë intensiteit aan die bopunt van die gel tot gevolg het. Hierdie tendens kan in die eerste vyf bane van Figuur 6.2 paneel A en B duidelik waargeneem word. In teenstelling hiermee vertoon oorvertering van die DNA met DNase I ook 'n oneweredige bandpatroon, maar met die hoogste bandintensiteit aan die onderpunt van die gel. Aan die bopunt van die gel begin die DNA verdwyn as gevolg van die oorvertering van die DNA met DNase I. Ook hierdie tendens is duidelik waarneembaar in bane 8 tot 12 van die CX-fragment in paneel A en bane 7 tot 12 van die HR295-fragment in paneel B. Volledige bandpatrone is vir die CX-fragment in paneel A bane 6 en 7, na vertering met onderskeidelik 2,5 μ l (25 ng) en 3,0 μ l (30 ng) DNase I, verkry. Fragment HR295 vertoon in paneel B baan 6 'n volledige DNase I-bandpatroon na vertering van die DNA met 2,5 μ l (25 ng) DNase I. Die optimale DNase I-konsentrasie is op soortgelyke wyse vir die ander vyf kollageenfragmente bepaal (resultate nie getoon nie).

Optimale DNase I-konsentrasies wat tydens DNase I-afskermingsanalise vir die verskillende fragmente in hierdie studie gebruik is, word in Tabel 6.1 opgesom.

TABEL 6.1 Optimale DNase I-konsentrasies vir die SV40- en kollageen-fragmente

FRAGMENT	[DNase I]	FRAGMENT	[DNase I]
SV40	3 μ l (30 ng)	SS	4 μ l (40 ng)
EP	4 μ l (40 ng)	RS	3 μ l (30 ng)
CX	2,7 μ l (27 ng)	HR295	2,5 μ l (25 ng)
XS	2,6 μ l (26 ng)	HR3'	5 μ l (50 ng)

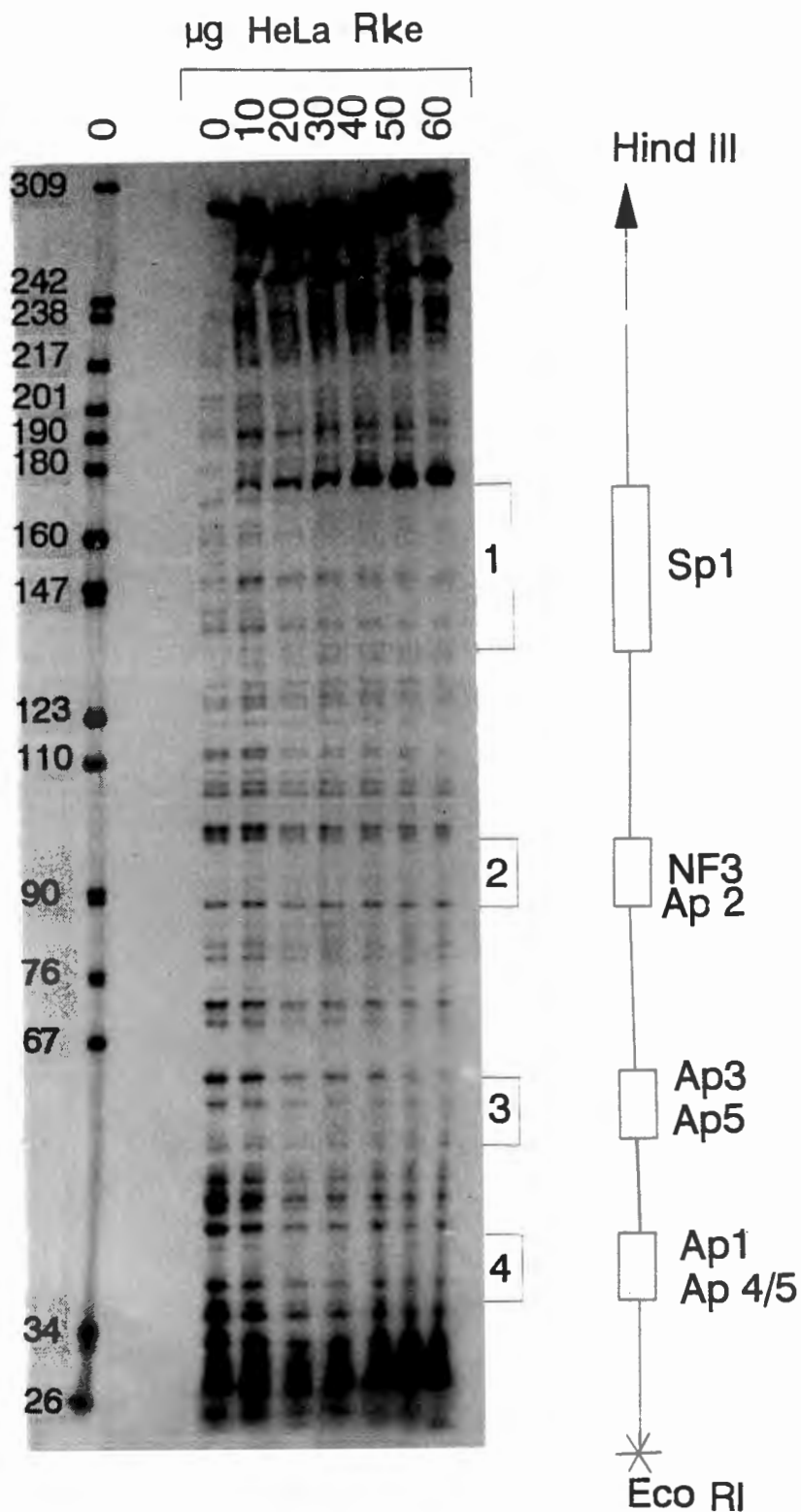
6.3 INTERAKSIE VAN DIE BINDINGSPROTEÏENE MET DIE DNA-FRAGMENTE VAN DIE PRO- α 1(I)-KOLLAGEENGEENGEBIED

6.3.1 RUWE KERNEKSTRAK

6.3.1.1 OPTIMALISERING VAN DIE KONSENTRASIE VAN DIE RUWE KERNEKSTRAKTE

Soos reeds genoem, bevat ruwe kernekstrakte 'n mengsel van 'n groot verskeidenheid DNA-bindingsproteïene, waarvan sommige volgorde-spesifiek en ander nie-spesifiek aan DNA bind. In hierdie studie is van die sintetiese nie-spesifieke kompeteerder poli(dI.dC) gebruik gemaak om die effek van die nie-spesifieke proteïene uit te skakel. Alvorens vasgestel kan word of proteïene wat in die ruwe kernekstrak teenwoordig is aan die DNA bind, moet die konsentrasie ruwe kernekstrak wat nodig is om DNase I-afskermingsanalise te kan waarneem, bepaal word. Vir hierdie doel is die DNase I en poli(dI.dC) konsentrasies konstant gehou en is slegs die konsentrasie ruwe kernekstrak gevarieer.

Deur van DNase I-afskermingsanalise en die "standaard" SV40 DNA-fragment gebruik te maak, is die korrekte konsentrasie HeLa ruwe kernekstrak bepaal (Figuur 6.3). In hierdie eksperiment is die 308 bp Eco RI - Hind III fragment van SV40 geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk soos beskryf in Afdeling 4.2. DNase I-afskermingsanalise is uitgevoer soos in Afdeling 3.4 beskryf. Poli (dI.dC) wat as 'n nie-spesifieke kompeteerder gebruik is, is by die DNA-ruwe kernekstrakmengsel bygevoeg tot 'n eindkonsentrasie van 2,5 μ g. Hierdie konsentrasie is die standaard hoeveelheid poli(dI.dC) wat by vertragingsgels in die laboratorium gevoeg word (W.N. de Vries, persoonlike kommunikasie). HeLa ruwe kernekstrakte is in toenemende konsentrasies vanaf 0 μ g tot 60 μ g by die DNA gevoeg. Skeiding van die DNA is op 'n 6% denaturerende poli-arkrielamiedgel uitgevoer. Tydens alle DNase I-afskermingsanalises is dit belangrik om altyd 'n "0"-baan, dit wil sê 'n baan wat DNA sonder proteïene bevat, in die eksperiment in te sluit. Binding van proteïene aan die DNA kan



Figuur 6.3 Optimalisering van de ruwe kernekstrakkonsentrasie.

Die 308 bp Eco RI - Hind III-fragment van SV40 is tesame met 2,5 µg poli(dI.dC) en wisselende HeLa ruwe kernekstrakkonsentrasie aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. pBR322/Msp I (baan 0) is as groottestandaard tesame met die DNA op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei.

dan bepaal word deur DNase I-bandpatrone in bane met DNA + bindingsproteïene te vergelyk met DNase I-bandpatrone in die baan met slegs DNA. Deur die verdwyning van bande, die verskuiwing van bande of die vorming van donker bande (DNase I-hipersensitiwiteitspunte) in die bindingspatroon van bane met DNA + proteïene ten opsigte van die bindingspatroon in die "0"-baan kan die gebied van afskerming waargeneem word. Afskerming vind plaas deurdat binding van die proteïene aan die DNA die vertering van die DNA deur DNase I verhoed en sodoende 'n verandering in die DNase I-bandpatroon tot gevolg het.

Afskerming van die SV40-DNA in die teenwoordigheid van HeLa ruwe kernekstrak is reeds vanaf 20 μg ruwe kernekstrak waarneembaar (Figuur 6.3). Byvoeging van verdere ruwe kernekstrak tot 'n konsentrasie van 60 μg , toon geen verdere veranderinge in die gebiede van afskerming nie. Dieselfde vier afskermingsgebiede word dus vanaf 20 μg tot 60 μg HeLa ruwe kernekstrak waargeneem. Slegs in die geval van byvoeging van 10 μg HeLa ruwe kernekstrak is 'n kleiner afskermingsgebied aangetoon en vertoon die DNase I-bindingspatroon bykans dieselfde verteringspatroon as vir die "0"-baan.

Aangesien die DNA-volgorde sowel as die posisie van die transkripsiefaktore wat aan die SV40-DNA bind bekend is, kan deur gebruik te maak van die pBR322-MspI as groottestandaard afgelei word watter transkripsiefaktore in die verskillende afgeskermde gebiede verteenwoordig is. Afskermingsgebied 1 kom ooreen met die DNA-volgorde waar bindingspunte vir onder meer die transkripsiefaktore Sp1 en die Ap2 voorkom. Gebied 2 kom ooreen met DNA-volgordes waarin bindingspunte vir NF3 en Ap2 voorkom, gebied 3 met DNA-volgordes waarin bindingspunte vir Ap3 en Ap5 voorkom, terwyl gebied 4 DNA-volgordes met bindingspunte vir Ap1, Ap4 en Ap5 bevat. Vier afskermingsgebiede waarin bekende transkripsiefaktore bind, is dus in DNase I-afskermingsanalise met SV40-DNA, 2,5 μg poli(dI.dC) en vanaf 20 μg HeLa ruwe kernekstrak, geïdentifiseer.

Aangesien 'n mengsel van bindingsproteïene en ander selonsuiwerhede in ruwe kernekstrakte voorkom, het die vraag ontstaan of die optimale DNase I-konsentrasie soos bepaal vir DNA sonder proteïene en DNA plus suiwer proteïene nog geskik sal wees as van ruwe kernekstrakte gebruik gemaak word. Vir hierdie doel is 40 μ g HeLa ruwe kernekstrak tesame met SV40-DNA aan DNase I-afskermingsanalise in die teenwoordigheid van toenemende hoeveelheid DNase I onderwerp (Figuur 6.4). In hierdie eksperiment is weer eens van die 308 bp 5'-radioaktiefgemerkte Eco RI - Hind III SV40-fragment (Afdeling 4.2) gebruik gemaak. Uit die resultate in Afdeling 6.3.1.1 is besluit om van 40 μ g HeLa ruwe kernekstrak gebruik te maak, omdat aangetoon is dat 'n konsentrasie van tussen 20 en 60 μ g geskik is vir afskerming. Die nie-spesifieke DNA-kompeteerder poli(dI.dC) is, soos in die geval van Figuur 6.3, weer tot 'n eindkonsentrasie van 2,5 μ g bygevoeg. DNase I is 'n toenemende konsentrasies vanaf 0 tot 40 μ l (400 ng) by die DNA gevoeg na verdunning soos reeds beskryf in Afdeling 6.2.2., waar 3 μ l (30 ng) die optimale DNase I-konsentrasie vir SV40-DNA met of sonder suiwer proteïene is. 'n "0"-baan as verwysingsbaan waarin 30 ng DNase I by SV40-DNA sonder proteïene gevoeg is, is in baan 1 van die 6% denaturerende poli-akriel-amiedgel geskei. Die laaste twee bane, baan 10 en baan 11 op die gel, bevat die SV40-DNA met 1 μ l (15 ng) suiwer Sp1 en SV40-DNA met ruwe kernekstrak en 1 μ l suiwer Sp1.

Hoewel afskerming soos in die geval van Figuur 6.3 by 30 ng DNase I waargeneem word, wil dit in Figuur 6.4 voorkom of vertering van die SV40-DNA met 90 ng DNase I (baan 5) 'n meer eweredige bindingspatroon en duideliker afskermingsgebiede as met 30 ng en 60 ng DNase I-vertoon. Die vierde afskermingsgebied in Figuur 6.3 is nie in Figuur 6.4 waargeneem nie, waarskynlik aangesien die gel nie so lank as in die geval van Figuur 6.4 geëlektroforeer is nie. DNase I-konsentrasies hoër as 90 ng dui duidelik oorvertering aan soos beskryf in Afdeling 6.2.2. In baan 10 waar die SV40-

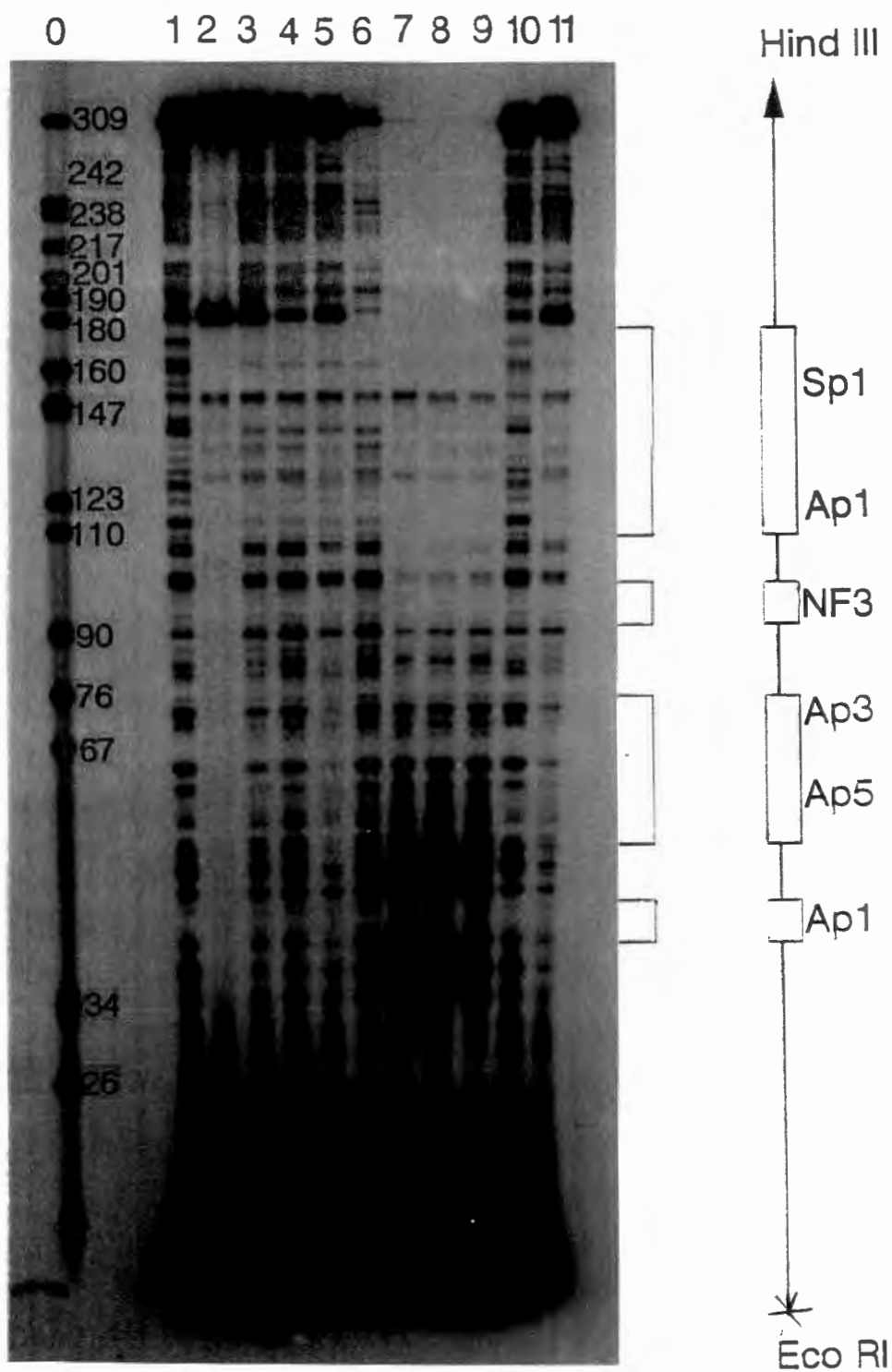
DNA met suiwer Sp1 deur 3 μ l DNase I verteer is, is die afskermingsgebied vir Sp1 geïdentifiseer. Toevoeging van Sp1 by die HeLa ruwe kernekstrak soos weergegee in baan 11, toon dieselfde afskermingsgebiede as met net HeLa ruwe kernekstrak, behalwe dat dit voorkom of afskermingsgebied 1, soos beskryf in Afdeling 6.3.1.1, 'n versterkte afskerming vertoon. Uit die resultate in Figuur 6.4 kan dus afgelei word dat 'n hoër DNase I-konsentrasie in die teenwoordigheid van ruwe kernekstrakte gebruik kan word, hoewel afskermingsgebiede ook waargeneem kan word na vertering van die DNA met die optimale DNase I-konsentrasie van 3 μ l (30 ng), soos aangetoon in Figure 6.3 en 6.4 (baan 3).

6.3.1.3 POLI(dI.dC) KONSENTRASIE

Die hoeveelheid nie-spesifieke kompeteerder poli(dI.dC), is in afskerming-analise-eksperimente gevarieer om die optimale konsentrasie te bepaal. DNase I-afskermingsanalise is met die 308 bp 5'radioaktief gemerkte Eco RI - Hind III-fragment van SV40 (Afdeling 4.2) in die teenwoordigheid van 40 μ g HeLa ruwe kernekstrak en vertering met 3 μ l-verdunde DNase I (30 ng) uitgevoer. Poli(dI.dC) is in toenemende konsentrasie van 0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 en 5,0 μ g gelyktydig met die SV40-DNA bygevoeg. Afskermingsgebiede soos in Figure 6.3 en 6.4 vir die SV40-DNA sigbaar is, is by poli(dI.dC) konsentrasies van 1,0 tot 5,0 μ g waargeneem (resultate nie getoon nie). Die poli(dI.dC) konsentrasie van 2,5 μ g wat in die eksperimente van Figuur 6.3 en Figuur 6.4 gebruik is, is dus voldoende om nie-spesifieke binding van die kernproteïene aan die DNA te voorkom.

6.3.1.4 IDENTIFISERING VAN DIE PROTEÏENAFSKERMINGSGBIEDE

Na al die optimaliseringseksperimente is die SV40-fragment sowel as die sewe kollageengeenfragmente (Figuur 4.1) se koderende en nie-koderende DNA-string met HeLa en BJA-B ruwe kernekstrakte getoets. Hierdie DNase I-afskermingsanalises is uitgevoer om afskermingsgebiede op die verskillende DNA's te identifiseer waar bindingsproteïene aan die DNA gebind het.



Figuur 6.4 Optimalisering van die DNase I-konsentrasie in die teenwoordigheid van ruwe kernekstrak.

Die 308 bp Eco RI - Hind III-fragment van plasmied SV40 is in die teenwoordigheid van 40 μg HeLa ruwe kernekstrak (rke) en 2,5 μg poli(dI. dC) teen wisselende DNase I-konsentrasies aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. pBR322/Msp I (baan 0) is as groottestandaard tesame met die DNA op 'n 6% denaturerende poliakrielamiedgel geskei. Die DNase I-konsentrasies wat gebruik is, is:

Baan 1:	0 ng + 0 μg rke	
Baan 2:	0 ng	
Baan 3:	30 ng	
Baan 4:	60 ng	
Baan 5:	90 ng	
Baan 6:	150 ng	
Baan 7:	200 ng	
Baan 8:	300 ng	
Baan 9:	400 ng	
Baan 10:	30 ng + 15 ng Sp1 + 0 μg rke	
Baan 11:	30 ng + 15 ng Sp1 + 40 μg rke	

}

+ 40 μg rke

Tydens hierdie eksperimente is in al die gevalle van 0, 10, 20 en 50 μg HeLa of BJA-B ruwe kernekstrak gebruik gemaak. Hoewel 'n hoër konsentrasie DNase I gebruik kan word, is daar besluit om die optimale DNase I-konsentrasies soos bepaal in Afdeling 6.2.2 en saamgevat in Tabel 6.1 te gebruik, aangesien afskermingsgebiede met optimale DNase I-konsentrasie vir SV40 ook waargeneem is. As nie-spesifieke kompeteerder is daar in alle gevalle van 2,5 μg poli(dI.dC) gebruik gemaak. Die DNA is saam met van Maxam en Gilbert-volgordebepalings (Afdeling 3.5) op 'n 6% denaturerende poli-akriëlamiedgel geskei. In Figure 6.5 en 6.6 word voorbeelde van resultate van hierdie eksperimente gegee.

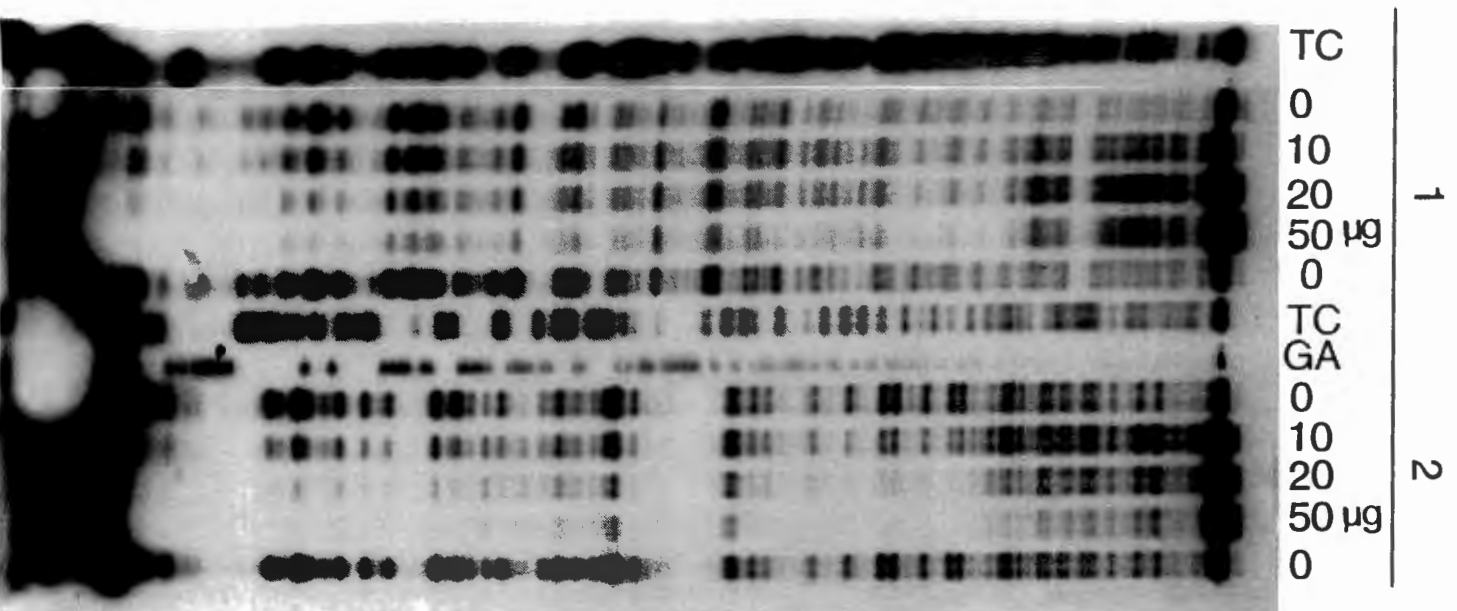
Figuur 6.5 toon die interaksie van bindingsproteïene in HeLa (paneel A) en BJA-B (paneel B) ruwe kernekstrakte met die koderende (1) en nie-koderende (2) DNA-stringe van die SV40-fragment (Afdeling 4.2). Ligte afskerming is met die nie-koderende DNA-string in die teenwoordigheid van 10 μg BJA-B ruwe kernekstrak waargeneem, terwyl daar by nie een van die ander bane met 10 μg ruwe kernekstrak enige afskerming waargeneem kon word nie. Dat geen afskerming met 10 μg HeLa ruwe kernekstrak waargeneem is nie, kom ooreen met die resultate van Figuur 6.3. Die afskermingsgebied wat met 10 μg BJA-B ruwe kernekstrak op die SV40 teenoorgestelde DNA-string geïdentifiseer is, bevat DNA-volgordes wat ooreenkom met bindingsgebiede vir die transkripsiefaktore Sp1 en Ap2. In die teenwoordigheid van 20 μg HeLa ruwe kernekstrak is afskerming in die SV40 teenoorgestelde DNA-string geïdentifiseer, wat ooreenkom met bindingsgebiede vir Sp1 en Ap2. 'n Groot gebied van afskerming is op die teenoorgestelde DNA-string van SV40 in die teenwoordigheid van 20 μg BJA-B ruwe kernekstrak waargeneem. Hierdie afskermingsgebied bevat bindingsvolgordes vir verskeie transkripsiefaktore tot by die ses Sp1-bindingspunte. Die teenwoordigheid van 50 μg HeLa ruwe kernekstrak by die koderende DNA-string van SV40 vertoon afskerming in 'n gebied waar bindingspunte vir onder meer Sp1, Ap2, Ap4 en Ap5 transkripsiefaktore voorkom. Daarteenoor vind afskerming in die teenoorgestelde DNA-string plaas in dieselfde gebied as waar afskerming met 20 μg BJA-B

ruwe kernekstrak waargeneem is. By die koderende DNA-string van SV40 in die teenwoordigheid van 50 μg BJA-B ruwe kernekstrak, is afskerming wat Ap4, Ap5, Ap3, Ap2, Ap1 en Sp1 bindingspunte insluit, waargeneem. In die teenoorgestelde DNA-string is afskerming so groot dat die DNA in hierdie baan bykans totaal afgeskerm word.

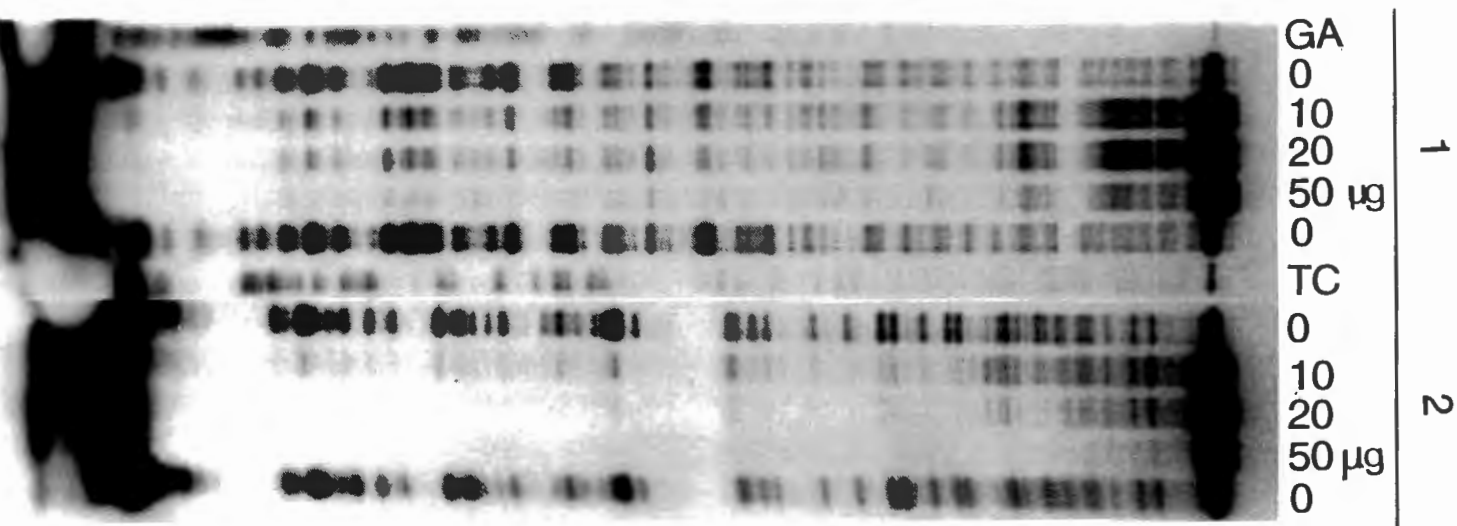
In Figuur 6.6 word die DNase I-afskermingsanalise van die 395bp Sal I - Bam HI-fragment van CX (Afdeling 4.5) met HeLa en BJA-B ruwe kern-ekstrakte gegee. In die teenwoordigheid van 10 μg HeLa ruwe kernekstrak vind effense afskerming in die eerste 50 bp van die fragment plaas waar onder meer potensiële Ap2 en Ap5 bindingsgebiede voorkom. Hierteenoor vind afskerming van die DNA in die teenwoordigheid van 10 μg BJA-B ruwe kernekstrak oor die eerste 90 bp plaas. Dieselfde potensiële Ap2 en Ap5 bindingsgebiede soos waargeneem by 10 μg HeLa ruwe kernekstrak, kom hier voor. Met 20 μg HeLa ruwe kernekstrak teenwoordig by die CX-DNA, is dieselfde afskermingsgebied as by 10 μg BJA-B ruwe kernekstrak geïdentifiseer. Ook by 20 μg BJA-B en 50 μg HeLa ruwe kernekstrakte word dieselfde afskermingsgebiede geïdentifiseer. In hierdie geval vind afskerming bykans oor driekwart van die DNA plaas waar verskeie potensiële bindingspunte vir verskillende transkripsiefaktore voorkom. Die totale DNA word in die teenwoordigheid van 50 μg BJA-B ruwe kernekstrak afgeskerm.

Hoe hoër die konsentrasie ruwe kernekstrak teenwoordig in DNase I-afskermingsanalises, hoe meer proteïene is teenwoordig om aan die DNA te kan bind. By hierdie hoër konsentrasies is die nie-spesifieke kompeteerder ook nie meer optimaal nie, en dra nie-spesifieke bindingsproteïene verder by tot afskerming sodat DNA bykans totaal afgeskerm word, soos in Figuur 6.6 waargeneem is. Uit die resultate kom dit voor of BJA-B ruwe kernekstrak oor baie meer bindingsproteïene per μg ekstrak beskik as wat die geval by HeLa ruwe kernekstrak is. Soos die resultate in Figuur 6.5 en Figuur 6.6 ook aantoon, is groot gebiede van afskerming op die DNA's geïdentifiseer, wat

A

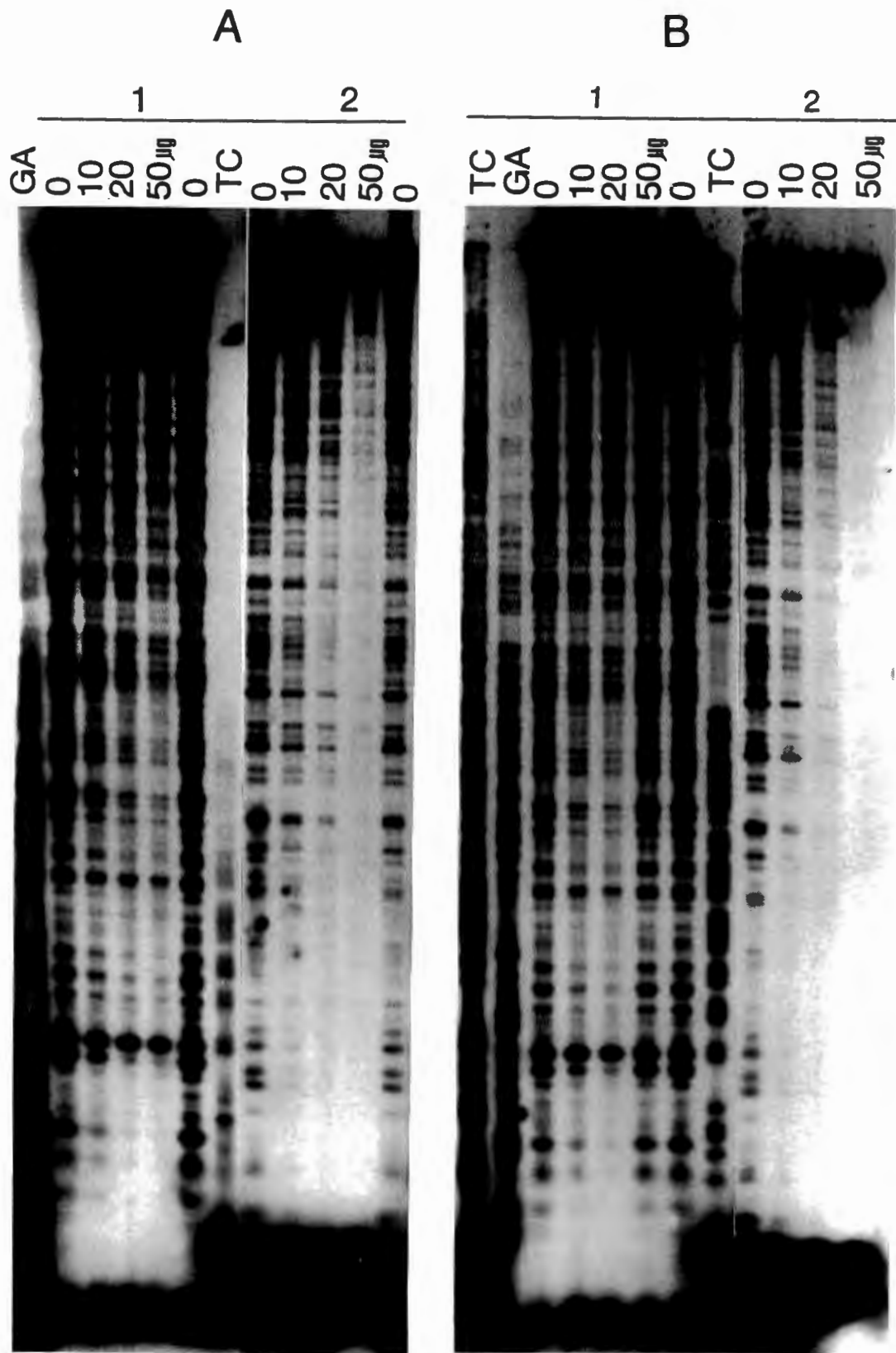


B



Figuur 6.5 **Identifisering van proteïenbindingsgebiede in SV40-DNA in die teenwoordigheid van HeLa en BJA-B ruwe kernekstrakte.**

Die koderende (1) en nie-koderende (2) DNA-stringe van die 308 bp SV40 DNA-fragment is in die teenwoordigheid van wisselende HeLa (paneel A) en BJA-B (paneel B) ruwe kernekstrakkonsentrasies aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Nie-spesifieke kompeteerder poli(dI.dC) is in 'n konsentrasie van 2,5 μ g bygevoeg en vertering is met behulp van 30 ng DNase I uitgevoer. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 6% denaturerende poli-akriëlamiedgel geskei.



Figuur 6.6 Identifisering van proteïenbindingsgebiede van die CX DNA-fragment.

Die koderende (1) en nie-koderende (2) DNA-stringe van die CX DNA-fragment is in die teenwoordigheid van wisselende HeLa (paneel A) en BJA-B (paneel B) ruwe kernerstrakkonsentrasies aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Nie-spesifieke kompeteerder poli(dI.dC) is in 'n konsentrasie van 2,5 µg bygevoeg en vertering is met behulp van 30 ng DNase I uitgevoer. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 6% denaturerende poli-akriëlamiedgel geskei.

verskeie bindingspunte vir transkripsiefaktore bevat. Om te bepaal of meer spesifieke afskermingsgebiede geïdentifiseer kan word, is die ruwe kernekstrakte vervolgens verder gesuiwer.

6.3.2 S-300 FRAKSIES

HeLa en BJA-B ruwe kernekstrakte is met behulp van 'n Sephacryl S-300-kolom (Pharmacia) in die plaaslike laboratorium gefraksioneer. Hierdie fraksioneringstap lei tot verdere suiwering van die ruwe kernekstrak, deurdat die mengsel van proteïene wat in die ruwe kernekstrakte voorkom, van mekaar geskei word. Deur die verskillende fraksies na fraksionering te versamel, kan piekfraksies van sekere proteïene in van die kolomfraksies voorkom. Verskillende van hierdie fraksies is in DNase I-afskermingsanalise tesame met die DNA van die kollageenfragmente of die "standaard" SV40-DNA gebruik om te bepaal of meer spesifieke afskermingsgebiede op die DNA geïdentifiseer kan word, as wat die geval is met die ruwe kernekstrakte.

Fraksie 74 van BJA-B S-300-fraksies en fraksie 70 van HeLa S-300-fraksies is as piekfraksies vir Sp1 geïdentifiseer (persoonlike kommunikasie, W.N. de Vries). Deur van hierdie fraksies gebruik te maak, kan bepaal word of Sp1-afskerming of afskerming van enige ander proteïene wat in die fraksies teenwoordig mag wees, op die "standaard" SV40-fragment waargeneem kan word. In Figuur 6.7 is die afskerming van fraksie 74, die Sp1-piekfraksie van BJA-B S-300-fraksies, op die SV40-fragment ondersoek. Aangesien S-300-fraksies suiwerder as ruwe kernekstrakte is en daar waarskynlik minder poli(dI.dC) as nie-spesifieke kompeteerder nodig word, is daar in hierdie eksperiment terselfdertyd na die poli(dI.dC) konsentrasie ondersoek ingestel.

Tydens DNase I-afskermingsanalise is die 308 bp 5'-radioaktiefgemerkte EcoRI - Hind III-fragment van SV40 tesame met 5 μ l fraksie 74 op 'n 6% denaturerende poli-akriëlamiedgel geskei. Poli(dI.dC) is tesame met die DNA as nie-spesifieke kompeteerder in konsentrasies van 0,1; 0,5 en 1,0 μ g bygevoeg. 'n Vergelyking tussen die DNase I-bindingspatroon in die "0"-baan (baan 1), dit wil sê die baan waar

slegs DNA sonder fraksie geskei is, met die DNase I-bindingspatrone in bane 2 tot 4, toon 'n duidelike afskermingsgebied. Hierdie afskermingsgebied kom ooreen met die DNA-volgordes waarin die ses bindingspunte vir Sp1 voorkom (vergelyk Mitchell *et al.*, 1987). 'n Verdere bewys dat Sp1-binding in die geïdentifiseerde afskermingsgebied voorkom, is die feit dat die afskerming in baan 5 waar die DNA tesame met 1 μ l Sp1 (15 ng/ μ l) geskei is, dieselfde gebied afskerm. Indien 'n verdere 1 μ l Sp1 by die fraksie gevoeg word, verbreed die gebied van afskerming (bane 6 tot 8). Hierdie groter gebied van afskerming is waarskynlik daaraan te wyte dat as gevolg van verryking van die fraksie met Sp1, meer Sp1-molekules by dieselfde bindingspunt bind en sodoende die naasliggende gebied van die DNase I afskerm. Uit die resultate in Figuur 6.7 wil dit voorkom of 'n poli(dI.dC) konsentrasie van 0,1 μ g voldoende is om afskerming op die DNA te verkry. Geen ander afskermingsgebiede is geïdentifiseer nie, wat daarop dui dat fraksie 74 in BJA-B inderdaad die piekfraksie van Sp1 is en dat geen ander proteïene wat moontlike bindingpunte op die SV40-DNA het, daarin voorkom nie. Soortgelyke resultate is met fraksie 70 die Sp1-piekfraksie van HeLa S-300-fraksies verkry (resultate nie getoon nie).

Om te bepaal of verskillende afskermingsgebiede waargeneem kan word, is 'n reeks fraksies aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Alternerende fraksies wat strek vanaf fraksie 64 tot fraksie 90 is van BJA-B en HeLa S-300 fraksies gebruik, tesame met óf die SV40-fragment óf die CX-kollageenfragment (Afdeling 4.5) óf die HR-295-kollageenfragment (Afdeling 4.3.2). DNA van beide die koderende en die teenoorgestelde DNA-string is gebruik. Poli(dI.dC) is in 'n konsentrasie van 0,1 μ g as nie-spesifieke kompeteerder bygevoeg. Figuur 6.8 toon 'n voorbeeld van die resultate van so 'n eksperiment.

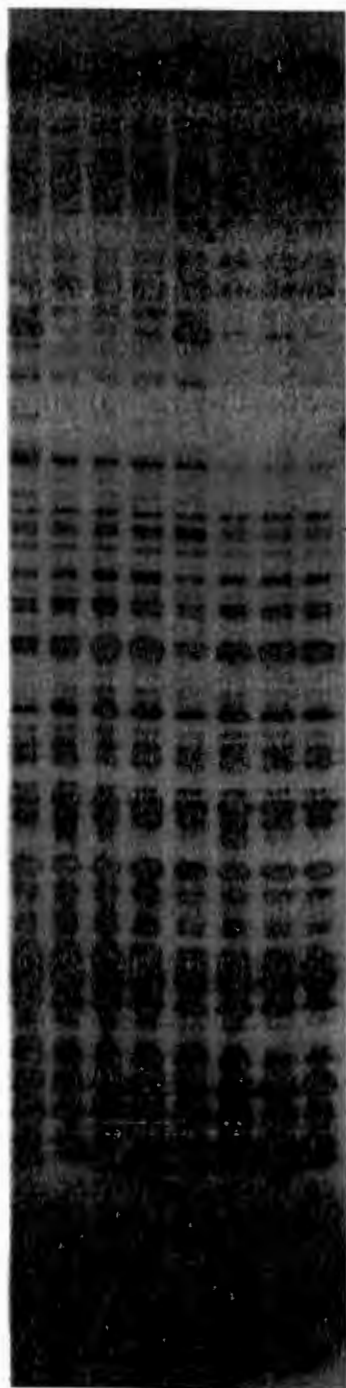
In Figuur 6.8 word die resultate van 'n DNase I-afskermingsanalise met die 308 bp Eco RI - Hind III-fragment van SV40 in beide rigtings tesame met die verskillende HeLa S-300 fraksies gegee. Sommige fraksies soos byvoorbeeld fraksies 64 tot 68 het geen afskermingsgebiede vir Sp1 getoon nie, terwyl ander fraksies soos byvoorbeeld fraksie 82 tot 90 weer groot gebiede van afskerming, byna soos in die geval van ruwe kernekstrakte (vergelyk Figuur 6.5), aantoon. Afskerming op die

DNA in die gebied waar Ap1-binding waargeneem is (Mitchell *et al.*, 1987) word egter wel aangetref in fraksies 66 tot 74. Bekende gebiede van afskerming van ander transkripsiefaktore word langs die onderskeie gelle in Figuur 6.8 aangetoon. Fraksies wat geen afskerming op die DNA veroorsaak nie, beskik waarskynlik oor bindingsproteïene waarvoor daar geen bindingspunte op die SV40-DNA voorkom nie. Die groot gebiede van afskerming op die DNA soos veroorsaak deur fraksies 82 tot 90, dui daarop dat daar nog steeds 'n mengsel van verskillende bindingsproteïene in hierdie fraksies teenwoordig is wat nie deur middel van die S-300-kolom van mekaar geskei kon word nie. Die teenwoordigheid van fraksies 70 tot 80 by die SV40-DNA toon afskerming op die DNA aan in die gebied waar Sp1-binding geïdentifiseer is (vergelyk Mitchell *et al.*, 1987). Hoewel afskerming vir Sp1 in verskeie fraksies waargeneem is en ook verskillende afskermingsgebiede in 'n enkele fraksie waargeneem is, is geen ander piekfraksie behalwe vir Ap1 vir van die ander proteïene wat aan die SV40-DNA kan bind, geïdentifiseer nie.

In die eksperiment waar daar van die CX-fragment as DNA gebruik gemaak is, is geen afskermingsgebiede in enige van die fraksies 64 tot 90 waargeneem nie. Hierdie resultaat dui daarop dat daar waarskynlik geen piekfraksie van enige van die proteïene wat potensieel aan die CX-DNA kan bind, teenwoordig is nie (resultate nie getoon nie). In die geval waar daar van die HR295-fragment gebruik gemaak is by DNase I-afskermingsanalise en S-300 fraksies, is afskermingsgebiede waargeneem. Meer as een afskermingsgebied op dieselfde DNA is waargeneem. DNA met fraksies 78 tot 90 van die BJA-B S-300 fraksies en DNA met fraksies 84 tot 90 van HeLa S-300 fraksies het afskermingsgebiede aangetoon (resultate nie getoon nie). Afskermingsgebiede wat wel by HR295-DNA waargeneem is, kom ooreen met potensieële bindingspunte vir onder meer die transkripsiefaktore Sp1 en Ap2. Verskeie afskermingsgebiede veroorsaak deur een fraksie toon weer eens aan dat die S-300-kolom nog steeds nie die mengsel van bindingsproteïene suiwer genoeg kan skei nie.

Hoewel piekfraksies vir spesifieke bindingsproteïene buiten Sp1 en Ap1 in die geval van SV40-DNA nie geïdentifiseer kon word nie, is meer afgebakende gebiede waargeneem as in die geval van die ruwe kernekstrakte.

1 2 3 4 5 6 7 8



Hind III



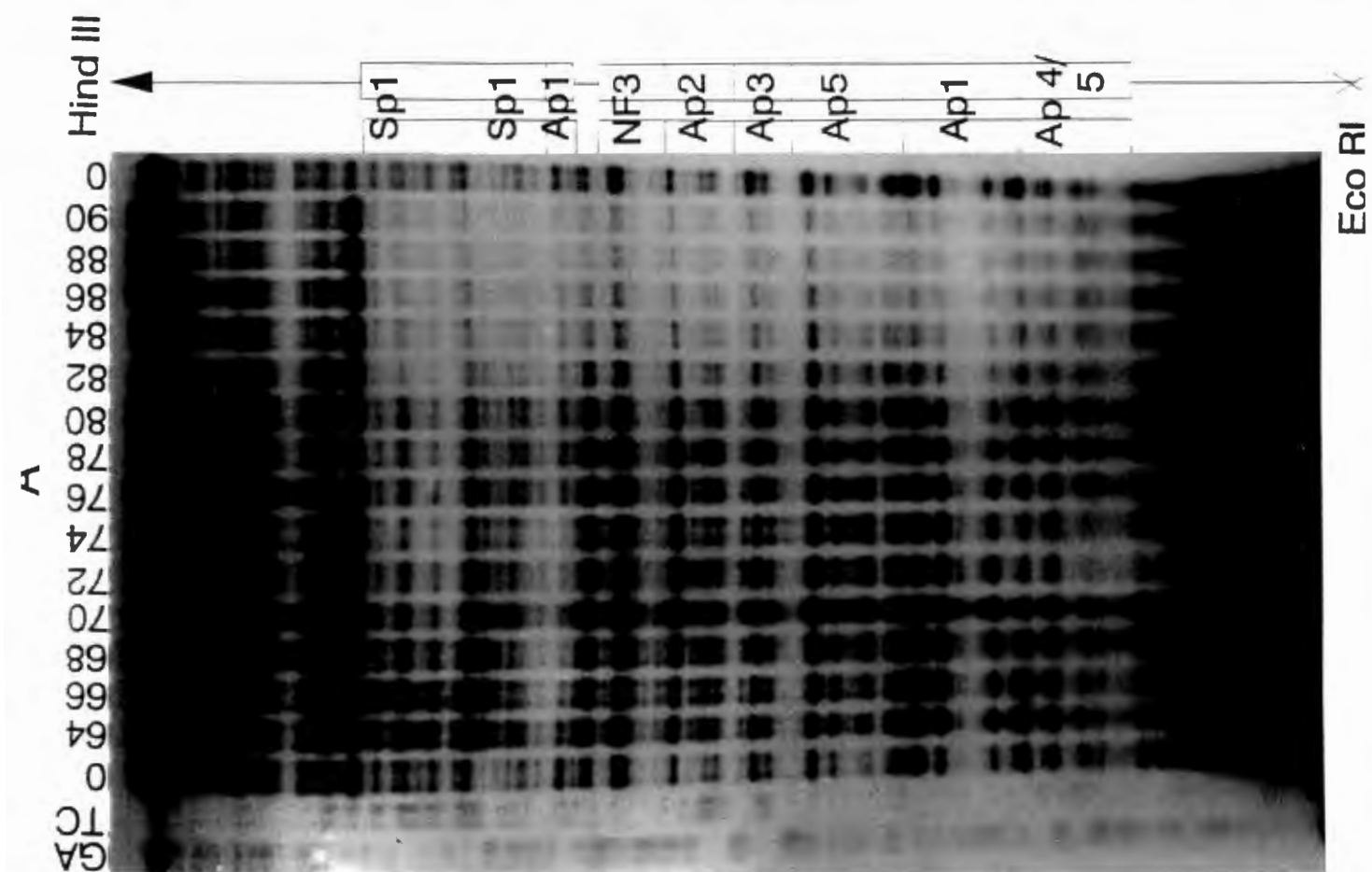
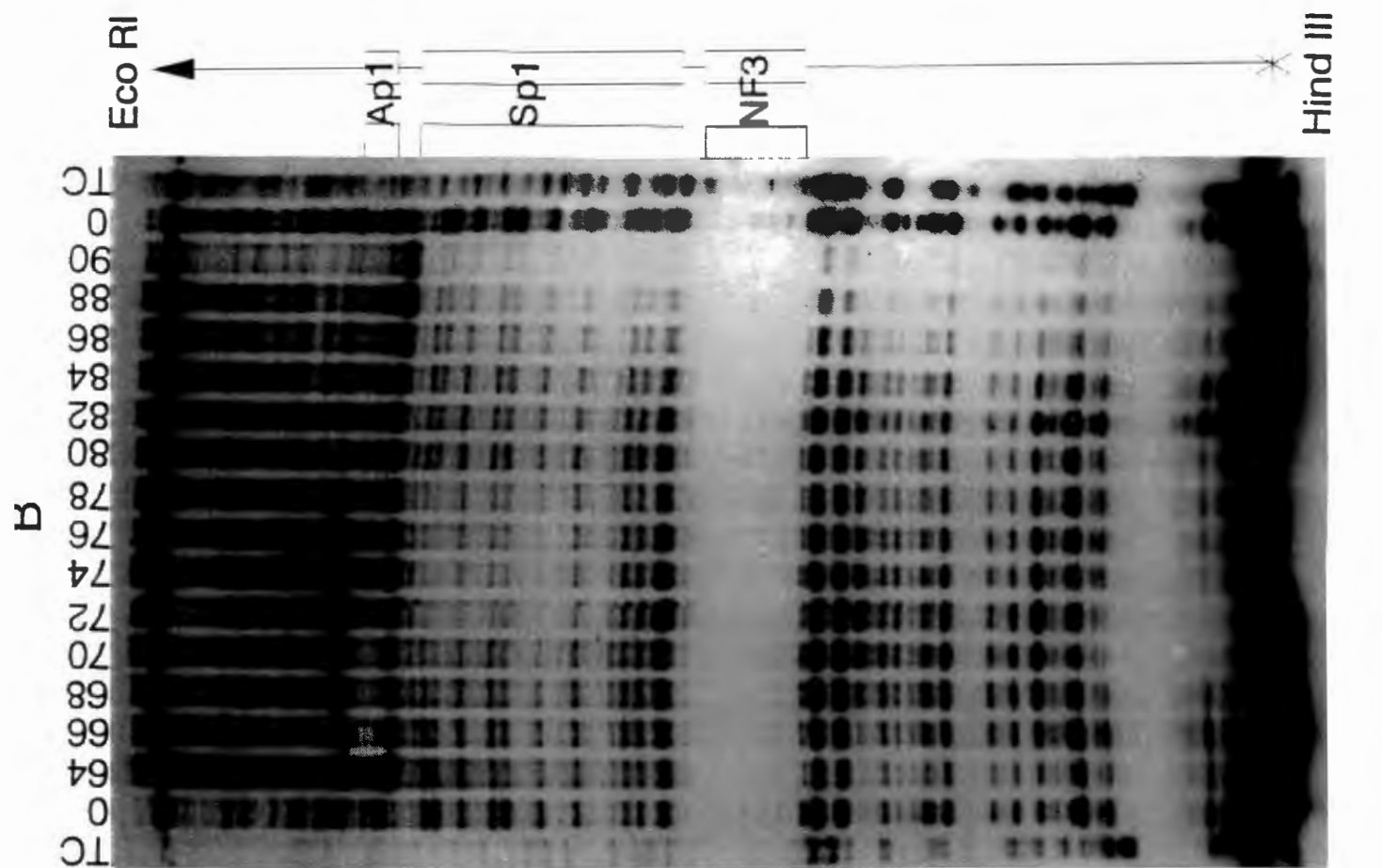
Eco RI

Figuur 6.7 DNase I-afskermingsanalise van SV40-DNA in die teenwoordigheid van BJA-B S-300 piekfraksie vir Sp1.

Die 308 bp SV40 Eco RI - Hind III-fragment is 5'-radioaktief gemerk en in die teenwoordigheid van 5 μ l BJA-B fraksie 74 aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Die nie-spesifieke kompeteerder poli(dI.dC) is in toenemende konsentrasies bygevoeg.

- Baan 1: DNA sonder fraksie
- Baan 2: DNA + 5 μ l fraksie + 0,1 μ g poli(dI.dC)
- Baan 3: DNA + 5 μ l fraksie + 0,5 μ g poli(dI.dC)
- Baan 4: DNA + 5 μ l fraksie + 1 μ g poli(dI.dC)
- Baan 5: DNA + 15 ng Sp1
- Baan 6: DNA + 5 μ l fraksie + 15 ng Sp1 + 0,1 μ g poli(dI.dC)
- Baan 7: DNA + 5 μ l fraksie + 15 ng Sp1 + 0,5 μ g poli(dI.dC)
- Baan 8: DNA + 5 μ l fraksie + 15 ng Sp1 + 1 μ g poli(dI.dC)

Die Sp1-bindingsgebied word langs die gel aangetoon.



Figuur 6.8 DNase I-afskermingsanalise met die SV40 DNA-fragmente in die teenwoordigheid van HeLa S-300 fraksie.

Alternerende fraksies vanaf fraksie 64 tot fraksie 90 is in die teenwoordigheid van die 308 bp Eco RI - Hind III koderende fragment (A) en die 308 bp Hind III - Eco RI nie-koderende fragment (B) van SV40 aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Poli(dI.dC) as nie-spesifieke kompeteerder is in 'n konsentrasie van 0,1 μ g bygevoeg. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Bindingsgebiede vir die verskillende transkripsiefaktore word langs die onderskeie gelle aangetoon.

6.4 SAMEVATTING

In hierdie hoofstuk is die standaardisering van die DNase I-afskermingstegniek en die interaksie tussen DNA en bindingsproteïene wat teenwoordig is in onderskeidelik die BJA-B en HeLa ruwe kernekstrakte en die S-300 fraksies, beskryf. Uit die standaardisering van die DNase I-afskermingstegniek is die waarneming gemaak dat om DNase I-afskermingsanalise suksesvol te kan uitvoer, die eksperimentele metode aan drie baie belangrike kriteria moet voldoen, naamlik:

- * Geen degradering van die DNA-fragment mag na merking plaasvind nie;
- * die DNA-fragment moet volledig deur die DNase I verteer word; en
- * optimale DNase I-konsentrasies moet gebruik word en moet vir elke DNA-fragment afsonderlik bepaal word.

Indien daar nie aan hierdie kriteria voldoen word nie, sal geen betekenisvolle DNase I-afskermingsanalise verkry word nie. Die SV40-vroeë promotor-DNA is baie suksesvol as "standaard" gebruik omdat resultate wat uit DNase I-afskermingsanalise verkry is, ooreenstem met dit wat in die literatuur beskryf is (Mitchell *et al.*, 1987).

Interaksie tussen DNA en bindingsproteïene van ruwe kernekstrakte toon groot gebiede van afskerming waar 'n mengsel van verskillende bindingsproteïene aan die DNA bind. Meer afgebakende afskermingsgebiede is op DNA in die teenwoordigheid van die S-300 fraksies waargeneem. Indien daar van die kollageengeenfragmente as DNA-bron gebruik gemaak word, waar bindingspunte vir die verskillende bindingsproteïene nog onbekend is, kan afskermingsgebiede waargeneem word, maar bindingspunte vir spesifieke proteïene kan nóg met ruwe kernekstrak nóg met die S-300 fraksies geïdentifiseer word.

Die doelwit om te bepaal of binding van transkripsiefaktore aan die kollageengeenfragmente plaasvind, is dus bereik omdat afskerming op die DNA-fragmente in die teenwoordigheid van onderskeidelik die ruwe kernekstrakte en die S-300-fraksies waargeneem is. Die tweede doelwit naamlik om te bepaal waar binding van die proteïene op die DNA plaasvind, kon slegs gedeeltelik beantwoord word, omdat piekfraksies vir spesifieke proteïene nie identifiseerbaar was nie. Fraksionering van ruwe kernekstrakte op 'n S-300-kolom is nie voldoende vir die suiwing van die bindingsproteïene om afskermingsgebiede vir spesifieke bindingsproteïene op die DNA te kan waarneem nie. Om spesifieke bindingspunte vir elke transkripsiefaktor te kan identifiseer, sal van suiwer proteïene tydens DNase I-afskermingsanalise gebruik gemaak moet word. Identifisering van spesifieke bindingspunte vir die onderskeie transkripsiefaktore Sp1, Ap1 en Ap2 op die kollageengeenfragmente word breedvoerig in Hoofstuk 7 beskryf.

HOOFSTUK 7

DIE INTERAKSIE VAN SP1, AP1, EN AP2 MET DIE REGULERINGSGBIEDE VAN DIE MENS PRO- α 1(I)-KOLLAGEENGEEN

7.1 INLEIDING

Ruwe kernekstrakte en S-300-fraksies het in Hoofstuk 6 getoon dat DNA-proteïen-interaksie in die gebied onder bestudering plaasvind. Afskerming wat tydens DNase I-afskermingsanalise waargeneem is, toon egter slegs 'n globale beeld van afskerming op die DNA aan van die verskillende bindingspunte van die verskeidenheid transkripsiefaktore wat in die ruwe kernekstrakte en S-300-fraksies teenwoordig is. Identifisering van die spesifieke bindingspunt van 'n bepaalde transkripsiefaktor vereis dus die gebruik van daardie bepaalde faktor in 'n suiwer vorm tydens eksperimentele analises. 'n Wye verskeidenheid transkripsiefaktore tesame met die verskillende bindingsvolgordes waaraan hulle kan bind, is reeds geïdentifiseer en in die literatuur beskryf, soos saamgevat in die oorsigartikel van Faisst en Meyer (1992). Hoewel heelwat van hierdie faktore reeds geïdentifiseer en geïsoleer is, is slegs enkele van hierdie wye verskeidenheid transkripsiefaktore kommersieel in 'n suiwer vorm beskikbaar. Om tyd en koste te bespaar, is die kommersieel beskikbare transkripsiefaktore van Promega Corporation aangekoop vir hierdie studie.

Drie van die kommersieel beskikbare transkripsiefaktore is vir hierdie studie gekies. Die keuse van Sp1, Ap1 en Ap2 berus daarop dat al drie faktore algemene faktore is wat reeds intensief bestudeer en in die literatuur beskryf is. Hierdie drie faktore is reeds in 'n wye verskeidenheid gene geïdentifiseer en ook heelwat potensiële bindingsvolgordes vir die drie faktore word in die kollageengene aangetref soos wat later in die hoofstuk beskryf word. 'n Verdere bydraende faktor tot die keuse van hierdie drie faktore is dat binding van Sp1, Ap1 en Ap2 aan die SV40-DNA wat as "standaard" in hierdie studie gebruik is, reeds volledig in die literatuur beskryf is (Mitchell *et al.*, 1987). Elk van hierdie drie transkripsiefaktore is in besonderhede in Hoofstuk 2 bespreek.

In hierdie hoofstuk word die interaksie van suiwer Sp1-, Ap1- en Ap2-proteïene met spesifieke DNA-volgordes beskryf met die doel om te bepaal waar die onderskeie bindingsvolgordes vir elk van hierdie proteïene in die reguleringsgebied van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen voorkom. Hierdie ondersoek is aan die hand van die volgende vrae uitgevoer:

- * Is daar Sp1-, Ap1- en Ap2-bindingspunte in die geengebied onder bestudering teenwoordig?
- * Watter van die potensiële bindingspunte is ware bindingspunte?
- * Wat is die bindingsaffiniteit waarmee die proteïene aan die onderskeie bindingsgebiede bind?
- * Vind proteïen-proteïeninteraksie tussen die drie transkripsiefaktore plaas?

7.2 IDENTIFISERING VAN DIE SP1-, AP1- EN AP2-BINDINGSPUNTE IN DIE REGULERINGSGEBIEDE

7.2.1 TEORETIES WAARSKYNLIKE BINDINGSPUNTE

Sp1, Ap1 en Ap2 is van die meer algemene transkripsiefaktore wat reeds geïsoleer is. Die bindingspunte vir hierdie proteïene is in 'n groot aantal gene reeds geïdentifiseer en veral Sp1 en Ap2-bindingsvolgordes varieer in 'n redelike mate van geen tot geen. Konsensusvolgordes is vir die onderskeie proteïene in die literatuur voorgestel as:

Sp1 = ${}^G/T {}^G/A$ GGC ${}^G/T {}^G/A {}^G/A {}^G/T$

Ap1 = TGA ${}^G/C$ T ${}^C/A$ A

Ap2 = CCC ${}^A/C$ N ${}^G/C {}^G/C {}^G/C$

(Faisst en Meyer, 1992)

Konsensusvolgordevoorstellings van ander outeurs is ook in die literatuur beskikbaar en word later weergegee. Bindingsvolgordes aan weerskante van die konsensuskernvolgorde toon die grootste mate van variasie. Uit 'n literatuurstudie oor die bindingsvolgordes van Sp1, Ap1 en Ap2 in die verskillende gene wat reeds bestudeer is, is Tabele 7.1, 7.2 en 7.3 saamgestel.

In Tabel 7.1 word al die verskillende Sp1-bindingsvolgordes wat in die literatuuronderzoek verkry is, asook die verskillende konsensusvolgordes, weergegee. Bestudering van die verskillende Sp1-bindingsvolgordes in Tabel 7.1 toon dat Sp1 aan so 'n groot verskeidenheid G-ryke volgordes kan bind, dat daar bykans geen sprake van 'n konsensusvolgorde is nie. Tabel 7.2 toon die verskillende bindingsvolgordes vir Ap1 wat uit die literatuuronderzoek verkry is. In teenstelling met Sp1 en selfs Ap2-bindingsvolgordes, is die bindingsvolgordes vir Ap1 baie meer gekonserveer en wissel slegs enkele base in die bindingsvolgordes van Ap1 by verskillende gene. Die verskillende bindingsvolgordes wat vir Ap2 uit die literatuuronderzoek verkry is, is in Tabel 7.3 aangetoon. 'n Opvallende kenmerk van Ap2-bindingsvolgordes is dat hulle dikwels groot gebiede afskerm sonder dat spesifieke konsensusvolgordes daarin voorkom (vergelyk Tabel 7.3 nr 9-17).

Eksperimentele data in Hoofstuk 6 het aangetoon dat DNA-proteïeninteraksie in die kollageengeengebied voorkom (Afdeling 6.3.2). Om te bepaal waar Sp1, Ap1 en Ap2 aan die reguleringsgebiede bind, is die totale DNA-gebied onder bestudering vanaf -454 tot +1706 aan rekenaaranalise onderwerp. 'n Vergelykende volgorde-analise tussen al die bindingsvolgordes van Sp1, Ap1 en Ap2 soos weergegee in Tabele 7.1 tot 7.3 en die pro- α 1(I)-kollageen DNA-volgorde is met behulp van die rekenaarprogram MicrogenieTM uitgevoer. Bindingsvolgordes vir Sp1, Ap1 en Ap2 wat ooreenkom met DNA-volgordes in die kollageengeen, is sodoende geïdentifiseer. In Figuur 7.1 word die posisies van die teoreties waarskynlike Sp1-, Ap1- en Ap2-bindingspunte op die mens pro- α 1(I)-kollageengeen vanaf -454 tot +1706 aangetoon. Potensiële Sp1-bindingspunte word bo-aan die volgorde aangetoon, terwyl potensiële Ap2-bindingspunte onder die volgorde aangetoon word. Aangesien meeste transkripsiefaktore op 'n oriëntasie-onafhanklike wyse bind, word die komplementêre

Tabel 7.1 Bindingsvolgordes vir Spl soos verkry uit die literatuur

NR	VOLGORDE	BRON	RELATIEWE AFFINITEIT	VERWYSING
1	5'-GGGGCGGGGC-3' 3'-CCCCGCCCCG-5'	AD E1B, rot GST-P muis polimerase β -geen pro- motor (I) CH-TK intron HSV IE - 3 (V) DHFR (I, III) MT IIa C-Ha-ras I	Hoog	Evans <i>et al.</i> (1988) Yamaguchi <i>et al.</i> (1988) Kadonaga <i>et al.</i> (1986)
2	5'-TGGGCGGGGC-3' 3'-ACCCGCCCCG-5'	HSV IE-3 (III, IV)	Hoog	Ishii <i>et al.</i> (1986)
3	5'-TGGGCGGAGT-3' 3'-ACCCGCCTCA-5'	SV40 (III, V)	Hoog	
4	5'-GGGGCGGAGC-3' 3'-CCCCGCCTCG-5'	DHFR (II, IV)	Hoog	
5	5'-GGGGCGGGGG-3' 3'-CCCCGCCCCC-5'	HSV IE-3 (I) α 1-TUB C1 C-Ha-ras-1	Medium	Evans <i>et al.</i> (1988) Ishii <i>et al.</i> (1986) Kadonaga <i>et al.</i> (1986)
6	5'-GGGGCGGGGT-3' 3'-CCCCGCCCCA-5'	HSV-IE-3 (II)	Medium	
7	5'-TGGGCGGGGT-3' 3'-ACCCGCCCCA-5'	HSV-TK (II)	Medium	
8	5'-TGGGCGGAAC-3' 3'-ACCCGCCTTG-5'	SV40 (II)	Medium	
9	5'-GGGGCGGGAT-3' 3'-CCCCGCCCTA-5'	SV40 (IV)	Medium	
10	5'-GGGGCGGGAC-3' 3'-CCCCGCCCTG-5'	SV40 (VI)	Medium	

11	5'-GGGGCGGAGA-3' 3'-CCCCGCCTCT-5'	SV40 (I)	Laag	
12	5'-GGGGCGGCGC-3' 3'-CCCCGCCGCG-5'	HSV-TK (I)	Laag	
13	5'-GGGGAGTGGC-3' 3'-CCCCTCACCG-5'	ARV-2 LTR		Jones <i>et al.</i> (1986)
14	5'-TGGGCGGGAC-3' 3'-ACCCGCCCTG-5'	ARV-2 LTR		
15	5'-GAGGCGTGGC-3' 3'-CTCCGCACCG-5'	ARV-2 LTR	Hoog	
16	5'-GAGGCGGAGC-3' 3'-CTCCGCCTCG-5'	c-Ha-ras 1		Ishii <i>et al.</i> (1986)
17	5'-CGGGCGGGGC-3' 3'-GCCCGCCCCG-5'	c-Ha-ras 1		
18	5'-GGGTGG-3' 3'-CCCACC-5'	BPV-1		Li <i>et al.</i> (1991)
19	5'-GGGGCCGGG-3' 3'-CCCCGGCCC-5'	Arginiensuksinaatsintetase	Laag	Anderson en Freytag (1991)
20	5'-GGGGCGGGG-3' 3'-CCCCGCCCC-3'	Arginiensuksinaatsintetase	Medium	
21	5'-GGGGCAGGGC-3' 3'-CCCCGTCCCG-5'	Arginiensuksinaatsintetase rot PEPCK	Laag	Evans <i>et al.</i> (1988)
22	5'-GGGGCAGGGGTGGGGGC-3' 3'-CCCCGTCCCCACCCCG-5'	mens kardiak α -aktien		Sartorelli <i>et al.</i> (1990) Valerio <i>et al.</i> (1985)
23	5'-GGGCGGG-3' 3'-CCCGCCC-5'	Adenosiendeaminase		
24	5'-GGGAGG-3' 3'-CCCTCC-5'	mens insulienreseptorgeen mens lae digtheid lipopro- teïen reseptor		Lee <i>et al.</i> (1992) Dawson <i>et al.</i> (1988)

25	5'-GGGCGGGCGGGGCGG-3' 3'-CCCGCCCCGCCCCGCC-5'	mens insulienreseptorgeen mens lae digtheid lipopro- teïen reseptor		
26	5'-GGGCGGC-3' 3'-CCCGCCG-5'	mens insulienreseptorgeen mens lae digtheid lipopro- teïen reseptor		Lemaigre <i>et al.</i> (1990) Evans <i>et al.</i> (1988)
27	5'-TGGGAGGAGC-3' 3'-ACCCTCCTCG-5'	mens groeihormoongeen pro- motor rot IGF-II		Yamaguchi <i>et al.</i> (1988)
28	5'-GGGGCGGGGA-3' 3'-CCCCGCCCCCT-3'			
29	5'-AGGGCGGAGG-3' 3'-TCCCGCCTCC-5'	muis polimerase β-geen promotor (II)		
30	5'-TAAGGGCGTA-3' 3'-ATTCCCGCAT-5'	muis polimerase β-geen promotor (III)		Gloss en Bernard (1990)
31	5'-AATAGGAGGG-3' 3'-TTATCCTCCC-5'	HPV-16		
32	5'-AAGAGGAGGG-3' 3'-TTCTCCTCCC-5'	HPV-6B		
33	5'-AAAGGGAGTA-3' 3'-TTTCCCTCAT-5'	HPV-11		
34	5'-GTAGGGAGTG-3' 3'-CATCCCTCAC-5'	HPV-18		
35	5'-GTAGGGTGTA-3' 3'-CATCCACAT-5'	HPV31		
36	5'-GGGGAGTGGT-3' 3'-CCCCTCACCA-5'	HPV-33		Evans <i>et al.</i> (1988)
37	5'-GGGGTAGGGT-3' 3'-CCCCATCCCA-5'	rot IGF-II		
38	5'-TGGGCGAGGC-3' 3'-ACCCGCTCCG-5'	mens SOD		

39	5'-GAGGCGGAGT-3' 3'-CTCCGCCTCA-5'	mens TPI		
40	5'-GGGGTGGGGC-3' 3'-CCCCACCCCG-5'	hoender TPI		
41	5'-GGGGCGGGCG-3' 3'-CCCCGCCCCG-5'	hoender GAPDH		
42	5'-GGGGCGGGCC-3' 3'-CCCCGCCCCG-5'	mens UPA		
43	5'-GGGGCGAGTG-3' 3'-CCCCGCTCAC-5'	vark UPA		
44	5'-AGGGCGAGCG-3' 3'-TCCCGCTCGC-5'	β 2-TUB C1		
45	5'-GAGGCGGGCA-3' 3'-CTCCGCCCGT-5'	mens β 2-TUB		
46	5'-GAGGCGGTGC-3' 3'-CTCCGCCACG-5'	hoender β 1-TUB		
47	5'-GGGGCGGTGC-3' 3'-CCCCGCCACG-5'	hoender β 2-TUB		
48	5'-GGGGCGGGAG-3' 3'-CCCCGCCCTC-5'	mens FN		
49	5'-GGGGCAGGGGC-3' 3'-CCCCGTCCCCG-5'	rot PEPCK		
50	5'-GGGGCAGGGGC-3' 3'-ACCGTACCCCG-5'	rot TGF- α promotor		Chen et al. (1992)
51	5'-CGGGAGGCGC-3' 3'-GCCCTCCGCG-5'	rot TGF- α promotor		
52	5'-GCGGAGGGAC-3' 3'-CGCCTCCCTG-5'	rot TGF- α promotor		

53	5'-CGGGCGGAGG-3' 3'-GCCCCGCTCC-5'	rot TGF- α promotor		
54	5'-GGGGCCGGCC-3' 3'-CCCCGGCCGG-5'	rot TGF- α promotor		
55	5'-TGCGCGGGGG-3' 3'-ACGCGCCCCC-5'	rot TGF- α promotor		
56	5'-GCGGCGGCGC-3' 3'-CGCCGCCGCG-5'	rot TGF- α promotor		
57	5'-GGCGCGCGGC-3' 3'-CCGCGCGCCG-5'	rot TGF- α promotor		
58	5'-GGCGAGTGGC-3' 3'-CCGCTCACCG-5'	rot TGF- α promotor		
59	5'-TGGGCGTTCA-3' 3'-ACCCGCAAGT-5'	HBV nukleokapsied promotor		Zhang et al. (1993)
60	5'-TGGGAGGAGT-3' 3'-ACCCTCCTCA-5'	HBV nukleokapsied promotor		
61	5'-GGGGAGGAGA-3' 3'-CCCCTCCTCT-5'	HBV nukleokapsied promotor		
62	5'-GGGCGG-3'	konsensus		Kadonaga et al. (1986)
63	GG GGGG 5'-TAGGCTAAT-3'	konsensus		Faisst en Meyer (1992)

Tabel 7.2 Bindingsvolgordes vir Apl soos verkry uit die literatuur

NR	VOLGORDE	BRON	RELATIEWE AFFINITEIT	VERWYSING
1	5'-TGACTAA-3' 3'-ACTGATT-5'	SV40 (II)	Hoog	Coleman <i>et al.</i> (1992)
2	5'-TGACACA-3' 3'-ACTGTGT-5'	SV40 (III) muis heem oksigenase-1	Laag Medium	Lee <i>et al.</i> (1987a) Alam en Zhining (1992)
3	5'-TGAGCTA-3' 3'-ACTCGAT-5'	SV40 (I)		
4	5'-TGACTCA-3' 3'-ACTGAGT-5'	Mens MT-II-a kollagenase muis heem oksigenase-1 mens α -galaktosidase A	Hoog	Lee <i>et al.</i> (1987a) Alam en Zhining (1992) Bishop <i>et al.</i> (1988)
5	5'-TAAGTCA-3' 3'-ATTCAGT-5'	MER 5-geen		Yamamoto <i>et al.</i> (1989)
6	5'-CTGACTCG-3' 3'-GACTGAGC-5'	Egr-geen		Tsai-Morris <i>et al.</i> (1988)
7	5'-CTGACTGG-3' 3'-GACTGACC-5'	Egr-geen		
8	C C 5'-GTGACTAA-3'	konsensusvolgorde		Lee <i>et al.</i> (1987b)
9	G C 5'-TGACTAA-3'	konsensusvolgorde		Faisst en Meyer (1992)

Tabel 7.3 Bindingsvolgordes vir Ap2 soos verkry uit die literatuur

NR	VOLGORDE	BRON	RELATIEWE AFFINI- TEIT	VERWYSING
1	5'-CCCCAGGC-3' 3'-GGGGTCCG-5'	Geïsoleer uit HeLa-selle SV40		Williams <i>et al.</i> (1988) Coleman <i>et al.</i> (1992)
2	5-'GCCNNNGGC-3'	konsensus		Williams en Tjian (1991)
3	A GGG 5'-CCCCNCCC-3'	konsensus		Faisst en Meyer (1992)
4	5'-CCCCCCTCCC-3' 3'-GGGGGGAGGG-5'	muis POMC		Bishop <i>et al.</i> (1990)
5	5'-TCCCCAG-3' 3'-AGGGGTC-5'	SV40 (I)	hoog	Mitchell <i>et al.</i> (1987)
6	5'-CCCA-3' 3'-GGGT-5'	SV40 (II)	laag	Mitchell <i>et al.</i> (1987)
7	5'-AGGC-3' 3'-TCCG-5'	SV40 (III)	laag	Mitchell <i>et al.</i> (1987)
8	5'-CCGCAGGC-3' 3'-GGCGTCCG-5'	mens groeihormoon		Courtois <i>et al.</i> (1990)
9	5'-GAACTGACCGCCCGCGCCCCGT-3' 3'-CTTGACTGGCGGGCGCGGGGCA-3'	mens MT-IIa	hoog	Imagawa <i>et al.</i> (1987)

10	5'-GGGTGTTTCGCCTGGAGCCGCA-3' 3'-CCCACAAAGCGGACCTCGGCGT-5'	mens MT IIa	medium	Imagawa <i>et al.</i> (1987)
11	5'-ACTTGCGCCTCGGGGACGCCTC-3' 3'-TGAACGCGGAGCCCCCTGCGGAG-5'	mens MT IIa	laag	Imagawa <i>et al.</i> (1987)
12	5'-ATGGCCTGCGGCCAGAGGGCACC-3' 3'-TACCGGACGCCGGTCTCCCGTGG-5'	mens groeihormoon	hoog	Imagawa <i>et al.</i> (1987)
13	5'-GACAAGCCAGGGGGCATGATCCC-3' 3'-CTGTTCCGGTCCCCCGTACTAGGG-5'	mens groeihormoon	medium	Imagawa <i>et al.</i> (1987)
14	5'-AAAGGGCCGGTGGGCGGGAGATT-3' 3'-TTTCCCGGCCACCCGCCCTCTAA-5'	hc-myc	medium	Imagawa <i>et al.</i> (1987)
15	5'-CAGCACAGCTCGGGGGTCCTCAG-3' 3'-GTCGTGTCGAGCCCCCAGGAGTC-5'	hc-myc	medium	Imagawa <i>et al.</i> (1987)
16	5'-ATATAGGTTTGGGGCTCCCCAAGGGACTGC-3' 3'-TATATCCAAACCCCGAGGGGTTCCTGACG-5'	BPV	laag	Imagawa <i>et al.</i> (1987)
17	5'-GATGGGGAATCCCCAGCCCTGGGCTTCCCCACCCCTGACCT-3' 3'-CTACCCCTTAGGGGTCGGGACCCGAAGGGGTGGGGACTGGA-5'	H-2K ^b	laag	Imagawa <i>et al.</i> (1987)
18	5'-CCCCAGGCAG-3' 3'-GGGGTCCGTC-5'	MER 5-geen		Yamamoto <i>et al.</i> (1989)
19	5'-CCCCCCTCCC-3' 3'-GGGGGGAGGG-5'	POMC-geen		Bishop <i>et al.</i> (1990)

DNA-string ook aangetoon net soos vir die bindingsvolgordes in Tabele 7.1 tot 7.3. Slegs een potensiële Ap1-bindingspunt is uit die rekenaaranalise verkry en word bo die volgorde as (---) aangetoon. Die snitpunte vir die restriksie-ensieme wat gebruik is om die kollageengebied in fragmente te verdeel (Figuur 4.1), word ook in Figuur 7.1 aangetoon. Die inisiasiepunt vir transkripsie sowel as die TATA- en CCAAT-homologieë word in die volgorde aangedui. Hierdie toon die begin en einde van die eksone aan. Soos waargeneem kan word uit Figuur 7.1, is daar 34 Sp1, een Ap1 en veertig Ap2 teoretiese bindingspunte in die DNA-volgorde geïdentifiseer wat ooreenkom met die bindingsvolgordes wat in Tabele 7.1 tot 7.3 beskryf is. Sp1, Ap1 en Ap2 kan dus potensieel aan hierdie verskillende volgordes in die kollageengebied bind. Hierdie rekenaaranalise sluit egter nie die moontlikheid uit dat ander bindingsgebiede vir hierdie drie bindingsproteïene teenwoordig kan wees, uniek vir die kollageengebied nie.

Hoewel binding van Sp1, Ap1 en Ap2 aan die SV40-vroeë promotorgebied volledig in die literatuur beskryf is (Mitchell *et al.*, 1987), is die DNA-volgorde aan dieselfde rekenaaranalise as vir die kollageengebied, onderwerp. Die resultaat van die analise word in Figuur 7.2 gegee. Sp1, Ap1 en Ap2 is op dieselfde wyse as in Figuur 7.1 aangetoon. Ten spyte van die vele variasies in bindingsvolgordes vir Sp1, Ap1 en Ap2 (Tabelle 7.1 tot 7.3) is slegs die bindingspunte vir SV40 soos in die literatuur weergegee, geïdentifiseer. Slegs by Sp1-bindingspunte is die bindingsvolgorde vir Sp1 in die adenosindeaminasegebied (Tabel 7.1 nr 23) bykomend aangetref. Hierdie bindingsvolgorde word egter in die Sp1-bindingsvolgorde van SV40 (IV) en SV40 (VI) (Tabel 7.1 nr 9,10) ingesluit.

Die teenwoordigheid van bindingsvolgordes wat van die konsensusvolgordes vir Sp1, Ap1 en Ap2 afwyk, dui daarop dat 'n rekenaaranalise van konsensusvolgordes op die DNA-volgorde nie voldoende is vir die opsporing van Sp1, Ap1 en Ap2-bindingsgebiede nie. Om bindingspunte vir die transkripsiefaktore te kan identifiseer, is dit dus noodsaaklik om die spesifieke DNA-proteïeninteraksie eksperimenteel te bestudeer.

-454 TCTTGCCAGG^E ATATCAGAGG GTGACTGGGG CACAGCCAGG AGGACCCCT²⁴ CCCCAACACC CCCAACCCCTT CCACCTTTGGG -375
AGAACGGTCC TATAGTCTCC CACTGACCCC GTGTCGGTCC TCCTGGGGGA³ GGGGTGTGG GGGTTGGGAA GGTGGAAACCC

-374 AAGTCTCCCC¹⁸ ACCCAGCTCC CCAGTTCCCC AGTTCCACTT CTTCTAGATT GGAGGTCCCA GGAAGAGAGC AGAGGGGCAC -295
TTCAGAGGGG³ TGGGTCGAGG⁵ GGTCAAGGGG⁵ TCAAGGTGAA GAAGATCTAA CCTCCAGGGT CCTTCTCTCG TCTCCCCGTG

-294 CCCTACCCAC TGGTTAGCCC ACGCCATTCT GAGGACCCAG^P CTGCACCCT ACCACAGCAC CTCTGGCCCA GGCTGGGCTG -215
GGGATGGGTG ACCAATCGGG³ TCGGTAAGA CTCCTGGGTC GACGTGGGA TGGTGTCTGT GAGACCGGGT³ CCGACCCGAC

-214 GGGGGCTGGG²⁴ GAGGAGAGC TCGAAGAGG GGAGATGTGG¹⁸ GGTGGACTCC CTTCCCTCCT²⁴ CCTCCCCCTC TCCATTCCAA -135
CCCCGAGCC⁵ CTCCGTCTCG ACGCTTCTCC CCTCTACACC CCACCTGAGG GAAGGGGAGG GGAGGGGGAG AGGTAAGGTT

-134 CTCCTCAAAT¹⁹ GGGGGCCGGG CCAGGCAGCT CTGATTGGCT GGGGCACGGG⁶² CGGCCGGCTC CCCCTCTCCG AGGGGCAGGG -55
GAGGGTTTAA CCCCCGCCCC GGTCCGTCTGA GACTAAACGA CCCCCTGCCC GCCGGCCGAG GGGGAGAGGC TCCCCGTCCC

-54 TTCCTCCCTG²⁴ CTCTCCATCA GGACAGTATA⁺ AAAAGGGGCC GGGCCAGTCG TCGGAGCAGA CGGGAGTTTC TCCTCGGGGT 26
AAGGAGGGAC GAGAGGTAGT CCTGTCTAT TTTCCCCGGG CCGGCTCAGC AGCCTCGTCT GCCCTCAAAG AGGAGCCCCA

27 CGGAGCAGGA GGCACGCGGA GTGTGAGGCC ACGCATGAGC GGACGCTAAC²⁴ CCCCTCCCCA GCCACAAAGA GTCTACATGT 106
GCCTCGTCCT CCGTGCGCCT CACACTCCGG TGCCTACTCG CCTGCGATTG GGGGAGGGGT⁵ CGGTGTTTCT CAGATGTACA

107 CTAGGGTCTA^X GACATGTTCA GCTTTGTGGA CCTCCGGCTC CTGCTCCTCT TAGCGGCCAC⁶² CGCCCTCCTG ACGCACGGCC 186
GATCCCAGAT CTGTACAAGT CGAAACACCT GGAGGCCGAG GACGAGGAGA ATCGCCGGTG GCGGGAGGAC TCGTGCCGG

187 AAGAGGAAGG CCAAGTCGAG GGCCAAGACG AAGACAGTAA GTCCCAAAC TTTGGGAGTG CAAGGATACT CTATATCGCG 266
TTCTCCTTCC GGTTCAGCTC CCGGTTCTGC TTCTGT[]]CATT CAGGGTTTGA AAACCCTCAC GTTCCTATGA GATATAGCGC

267 CCTTGCGCTT GGTCCCGGGG GCCGCGGCTT AAAACGAGAC GTGGATGATC CGGAGACTCG GGAATGGAAG GGAGATGATG 346
GGAACGCGAA CCAGGGCCCC CGGC[]]GCGGAA TTTTGCTCTG CACCTACTAG GCCTCTGAGC CCTTACCTTC CCTCTACTAC

347 AGGGCTCTTC CTCGGCGCCC TGAGACAGGA GGGAGCTCAC CCTGGGGCGA GGTGGGGTT^S GAACGCGCCC²⁴ CGGGAGCGGG 426
TCCCCAGAAG GAGCCGCGG ACTCTGTCCT CCCTCGAGT[]]G[]]GACCCGCT CCAACCCCAA CTTGCGCGGG GCCCTCGCCC

427 ¹⁸
 AGGTGAGGGT GGAGCGCGGC GTGAGTTGGT GCAACACACA ATCCCGAGCG CGCAACCGGG GAAGTGGGGA TCTTGGGTGC 506
 TCCACTCCCA CCTCGCGCCG CACTCAACCA CGTTCTCTCT TAGGGCTCGC GCGTTGGCCC CTTACCCCCT AGAACCCACG

507 AGAGTGAGGA AAGCACGTCG AAGATGGGAT GGGGGCGCCG AGCGGGGCAT TTGAAFCCCA AGATGTAGAA GCAATCAGGA 586
 TCTCACTCCT TTCGTGCAGC TTCTACCTTA CCCCCGCGGC TCGCCCCGTA AACTTCGGGT TCTACATCTT CGTTAGTCCT

587 AGGCCGTGGG ATGATTCAATA AGGAAAGATT GCCCTCTCTG CGGGCTAGAG TGTTGCTGGG GCCGTGGGGG TGCTGGGCAG 666
 TCCGGCACCC TACTAAGTAT TCCTTTCTAA CGGGAGAGAC GCCCGATCTC ACAACGACCC CGGCACCCCC ACGACCCGTC

667 CCGCGGAGGG GGTGCGGAGC GTGGGCGGGT GGAGGATGAG AAACCTTTGGC GCGGACTCGG CCGGGCGGGG TCCTTGCGCC 746
 GGCGCCTCCC CCACGCCTCG CACCCGCCCA CCTCCTACTC TTTGAAACCG CGCCTGAGCC GCCCCGCCCC AGGAACGCGG

747 CCCTGCTGAC CGATGCTGAG CACTGCGTCT CCCGGTCCAA CGCTTACTGG GGCAGGAGCC GGAGCGGGAA GACCCGGGTT 826
 GGGACGACTG GCTACGACTC GTGACGCAGA GGGCCAGGTT GCGAATGACC CCGTCCTCGG CCTCGCCCTT CTGGGCCCAA

827 ATTGCTGGGT GCGGACCCCC ACCTGCTAGA TCTGGAAAGT AAAGCCAGGG ATGGGGCAGC CCAAGCCTCT TAAAGAGGTA 906
 TAACGACCCA CGCCTGGGGG TGGACGATCT AGACCTTTCA TTTCCGTCCC TACCCCGTCG GGTTCGGAGA ATTTCTCCAT

907 GTCGGGCCGG TGAGGTCGGC CCGCCCCCGG CCCCATGCT TAGCGTTGCC CGACACCTAG TGGCCGTCTG GGGAGCCGCT 986
 CAGCCCGGCC ACTCCAGCCG GGGCGGGGCC GGGTAACGA ATCGCAACGG GCTGTGGATC ACCGGCAGAC CCCTCGGCGA

987 AGCGCGGTGG GAGTGGTTAG CTAACCTCTG GACTATTTGC GGACTTTTTG GTTCTTTGGC TAAAAGTGAC CTGGAGGCAT 1066
 TCGCGCCACC CTCACCAATC GATTGAAGAC CTGATAAAGC CCTGAAAAAC CAAGAAACCG ATTTTCACTG GACCTCCGTA

1067 TGGCTGGCTT TGGGGACTGG GGATGGCCCC AGAGCGGCTT TTAAGTTGCT TAGGTGCTGG AGGTTACCCT GTCTCCTAAT 1146
 ACCGACCGAA ACCCCTGACC CTACCGGGC TCTCGCCGAA AATTCAACAG ATCCACGACC TCCAATCCCA CAGAGGATTA

1147 TTAGGTACAT TTCAAGTCTT GGGGGGGCCT CCCTTCCAAT CAGCCGCTCC CATTCTCCTA GCCCGCCCC CGCCACCCCA 1226
 AATCCATGTA AAGTTCAGAA CCCCCCGGA GGAAGGTTA GTCGCGGAGG GTAAGAGGAT CCGGGCGGGG GCGGTGGGGT

1227 CCTGCCCAGG GAATGGGGGC GGGATGAGGG CTGGACCTCC CTTCTCTCCT CCTCGCCCT CCTCCTGTCT CTACCACGCA 1306
 GGACGGGTCC CTTACCCCCG CCCTACTCCC GACCTGGAGG GAAGAGAGGA GGGAGCGGGA GGAGGACAGA GATGGTGCGT


```

      E           K           2
TGAATTCGAG CTCGGTACCT TCTGAGGCGG AAAGAACCAG CTGTGGAATG TGTGTCAGTT 60
ACTTAAGCTC GACCCATGGA AGACTCCGCC TTTCTTGGTC GACACCTTAC ACACAGTCAA

AGGGTGTGGA AAGTCCCCAG GCTECCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA 120
TCCCACACCT TTCAGGGGTC CGAGGGGTCG TCCGTCTTCA TACGTTTCGT ACGTAGAGTT
      5           5
      1           10,23      3           9,23      3
TTAGTCAGCA ACCAGGATCC CGCCCCTAAC TCCGCCCATC CCGCCCCTAA CTCCGCCCAG 180
AATCAGTCGT TGGTCCTAGG GCGGGGATTG AGGCGGGTAG GCGGGGATT GAGGCGGGTC
      6           6
      8           11
TTCCGCCCAT TCTCCGCCCC ATGGTCGACT AATTTTTTTT ATTTATGCAG AGGCCGAGGC 240
AAGGCGGGTA AGAGGCGGGG TACCAGCTGA TTAAAAAAA TAAATACGTC TCCGGCTCCG
      6           6
      3
CGCCTCGGCC TCTGAGCTAT TCCAGAAGTA GTGAAGAGGC TTTTGTGGAG GCCTAGGCTT 300
GCGGAGCCGG AGACTCGATA AGGTCTTCAT CACTTCTCCG AAAAAACCTC CGGATCCGAA
      H
TTGCAAAAAGCTT
AACGTTTTTCGAA

```

Figuur 7.2: DNA-volgorde van die 300 bp Kpn I - Hind III-fragment van die SV40-vroeë promotorgeen

Bindingspunte vir Sp1, Ap1 en Ap2 is uit die literatuur (Mitchell *et al.*, 1987) en deur middel van rekenaaranalise geïdentifiseer.

Sp1 = bo onderstreep (→)

Ap1 = bo onderstreep (.....)

Ap2 = onder onderstreep (→)

Nommers by onderstreping stem ooreen met die nommers in Tabela 7.1 - 7.3.

Afkortings vir restriksie-ensieme wat aangetoon is, is: E = Eco RI; K = Kpn I, H = Hind III.

7.2.2 WERKLIKE SP1-, AP1- EN AP2-BINDINGSPUNTE

Om die onderskeie DNA-proteïeninteraksies te karakteriseer en om te bepaal watter van die potensiële bindingspunte werklike Sp1-, Ap1- en Ap2-bindingspunte is, is van die DNase I-afskermingstegniek (Afdeling 3.4) gebruik gemaak. Tydens hierdie DNase I-afskermingsanalises is daar deurgaans van suiwer Sp1, Ap1 en Ap2-proteïene (Promega Corporation) gebruik gemaak.

Die SV40-fragment (Afdeling 4.2) wat as "standaard" gebruik is, sowel as die sewe fragmente (Figuur 4.1) waarin die mens pro- α 1(I)-kollageengeengebied verdeel is, is elk aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Beide die koderende en die teenoorgestelde DNA-stringe is geanaliseer. Die fragmente is 5'-radioaktief gemerk met behulp van γ - ^{32}P -dATP soos in Afdeling 3.3.2.1. beskryf, waarna DNase I-afskermingsanalise soos in Afdeling 3.4 beskryf, uitgevoer is. Die DNase I-konsentrasies wat tydens hierdie eksperimente gebruik is, is dieselfde as wat in Tabel 6.1 weergegee is.

7.2.2.1 SV40-VROEË PROMOTORGEBIED

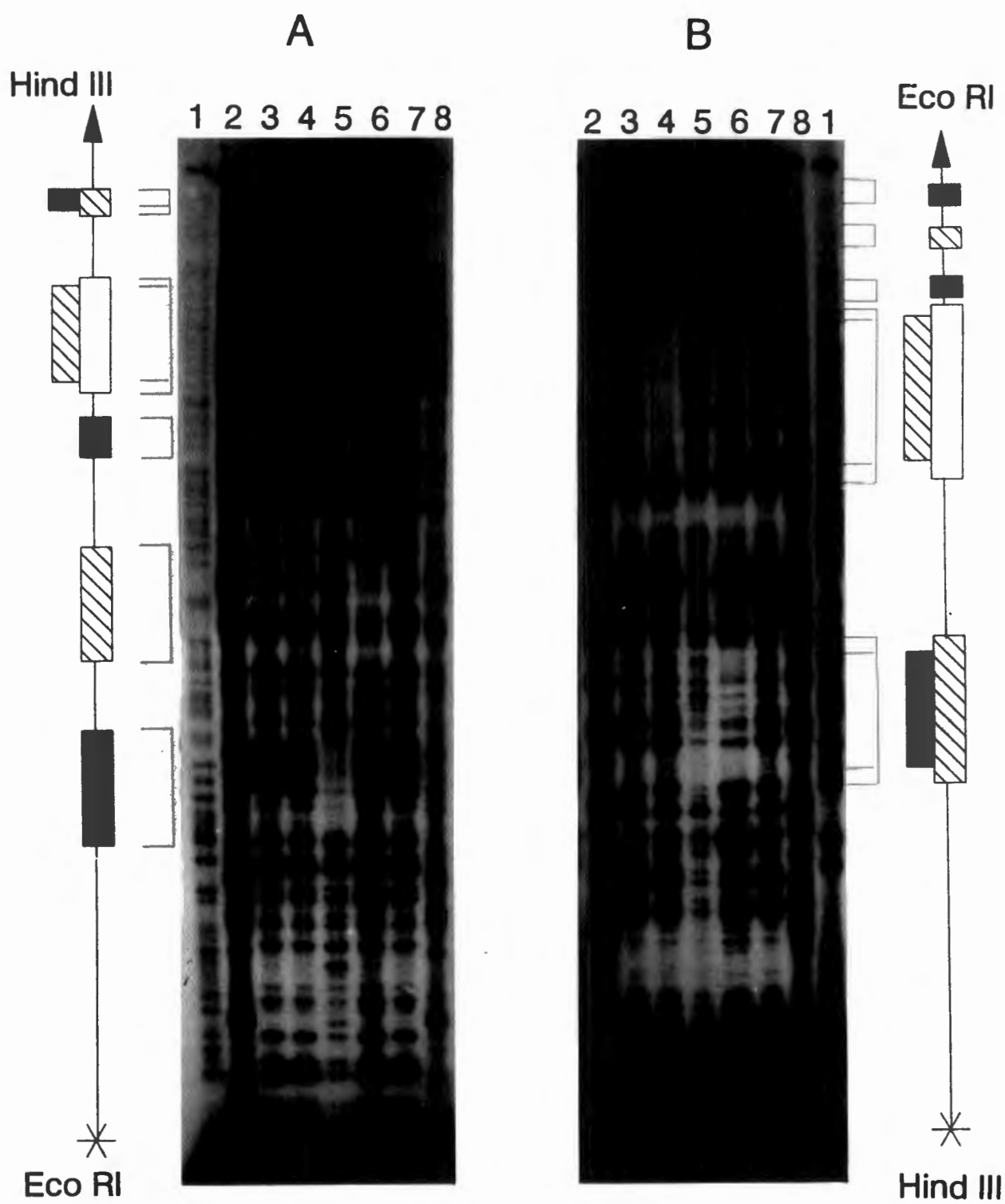
Alvorens enige eksperimente met die onderskeie kollageenfragmente uitgevoer is, is met behulp van die SV40 "standaard" DNA bepaal of die DNase I-afskermingstegniek geskik is vir die identifisering van spesifieke bindingspunte, of die aangekoopte proteïene aktief is en of die proteïenkonsentrasies soos voorgeskryf deur die vervaardigers, korrek is. Die voorgeskrewe proteïenkonsentrasies is 1 fpu¹ Sp1 en Ap1 en 1,5 fpu Ap2. Vir hierdie doeleindes is die 308 bp Eco RI - Hind III koderende string van SV40 aan die Eco RI-punt en die 308 bp teenoorgestelde string aan die Hind III-punt 5'-radioaktief gemerk en aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp.

¹ 1 fpu = Die hoeveelheid proteïen wat noodsaaklik is om 'n volledige DNase I-afskermingspatroon op SV40-DNA te verkry.

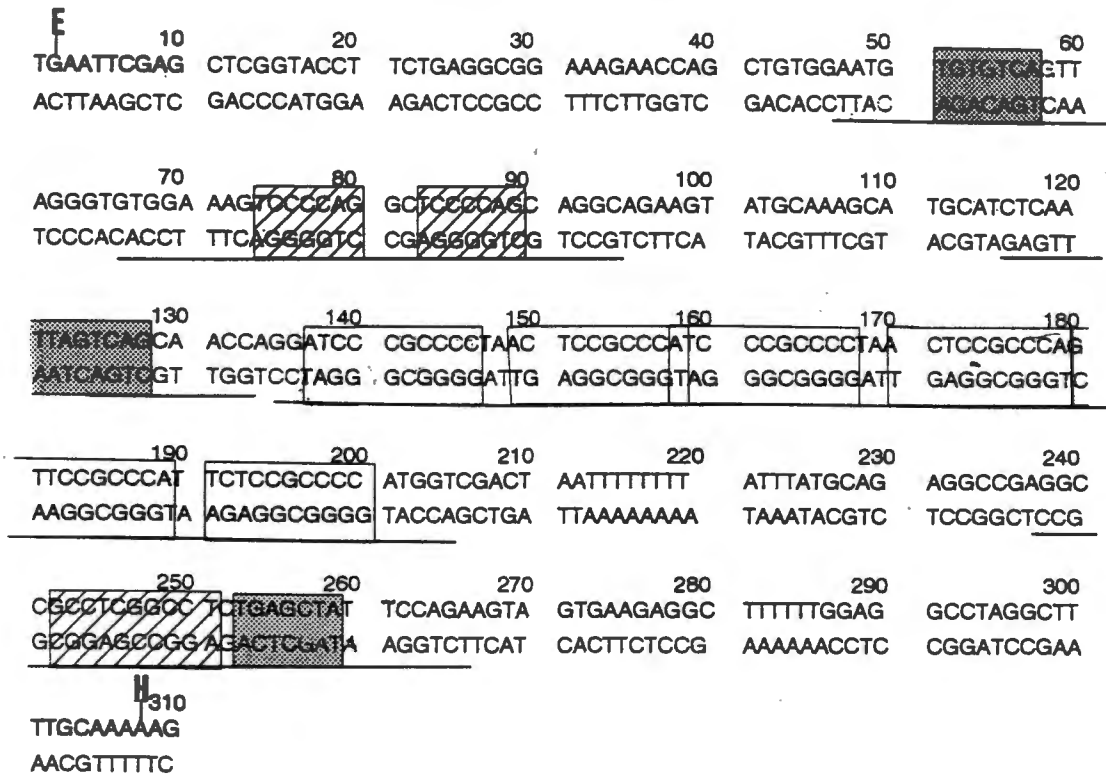
Met die oog daarop dat binding van die proteïene op die DNA-volgorde gelokaliseer moet word, is Maxam en Gilbert-volgordebepaling (Afdeling 3.5) met die DNA uitgevoer. Resultate van die DNase I-afskermingsanalise word in Figuur 7.3 weergegee. Paneel A toon die DNase I-afskermingsanalise van die koderende string, terwyl paneel B dié van die teenoorgestelde string toon. In beide gevalle bevat baan 4 DNA met 1 μ l Sp1 (15 ng/ μ l), baan 5 DNA met 1 μ l Ap1 (1 μ g/ μ l) en baan 6 DNA met 2 μ l Ap2 (~20 ng/ μ l). Baan 3 en baan 7 is die kontrolebane waar DNA sonder proteïene geskei is. Hierdie kontrolebaan is noodsaaklik sodat die DNase I-verteringspatroon in hierdie baan met dié in die bane met DNA en proteïene vergelyk kan word.

Die verskille in die verteringspatroon in die onderskeie bane teenoor dié van die kontrolebane word waargeneem deurdat van die waargenome bande in die bane met DNA plus proteïene óf ligter word óf verdwyn teenoor dieselfde bande in die kontrolebaan. Proteïenbindingsgebiede kan dus geïdentifiseer word. Binding van proteïene aan die DNA verhoed vertering deur DNase I van die DNA op daardie bepaalde punt, met die gevolglike verandering in die DNase I-bandpatroon. Terselfdertyd kan hierdie afskermingsgebied gelokaliseer word deur vergelyking van die DNA-volgordes (paneel C) met die van die volgordes uit die Maxam en Gilbert-volgordebepaling (Figuur 7.3, bane 1, 2 en 8).

Op die koderende string (paneel A) en die teenoorgestelde string (paneel B) is afskerming deur Sp1 waargeneem in 'n gebied wat strek oor al ses Sp1-bindingspunte wat volgens die literatuur daar voorkom. Ook die drie Ap1 en drie Ap2-afskermingsgebiede strek oor die DNA-volgordes waar volgens die literatuur die Ap1- en Ap2-bindingsvolgordes voorkom. In paneel C is die bindingspunte vir Sp1, Ap1 en Ap2 volgens die literatuur aangetoon. Afskermingsgebiede deur die proteïene op die SV40-DNA soos verkry uit die eksperimentele data in Figuur 7.3 paneel A en B, word deur onderstreping van die DNA-volgorde aangetoon. Uit hierdie resultate is dit dus duidelik dat afskerming wat tydens die DNase I-afskermingsanalise met SV40-DNA verkry



C



Figuur 7.3 DNase I-afskermingsanalise met die SV40-vroeë promotor

Die 308 bp Hind III - Eco RI SV40-fragment is 5'-radioaktief gemerk en in DNase I-afskerminganalise tesame met suiwer Sp1, Ap1 en Ap2 gebruik. Presiese gebiede van afskerming is bepaal met behulp van Maxam en Gilbert-volgordebepaling van dieselfde fragment. Posisies van afskerming vir die onderskeie proteïene (Sp1 = □; Ap1 = ■; Ap2 = ▢) is langs die gels aangetoon.

- A:** Koderende volgorde
 Baan 1 en 8: TC-volgorde volgens Maxam en Gilbert-volgordebepaling
 Baan 2: GA-volgorde volgens Maxam en Gilbert
 Baan 3 en 7: Geen-proteïenkontrolle
 Baan 4: DNA 1 µl Sp1 (15 ng/µl)
 Baan 5: DNA 1 µl Ap1 (1 µg/µl)
 Baan 6: DNA 2 µl Ap2 (~20 ng/µl)
- B:** Nie-koderende volgorde. Bane is soos in A.
- C:** DNA-volgorde van die 308 bp Hind III - Eco RI SV40-fragment. Onderstreping toon die afskermingsgebiede aan soos verkry uit paneel A en B. Omramings toon die bindingsvolgordes aan soos verkry uit die literatuur en Figuur 7.2.

Sp1 = □ ; Ap1 = ■ ; Ap2 = ▢

is, ooreenkom met die bindingsgebiede vir Sp1, Ap1 en Ap2 soos deur Mitchell *et al.* (1987) beskryf is.

Die DNase I-afskermingstegniek is dus 'n geskikte metode om te gebruik vir die identifisering van proteïenbindingsgebiede. Ook is aangetoon dat die aangekoopte proteïen aktief is en dat voorgeskrewe proteïenkonsentrasies voldoende is om afskerming op die DNA waar te neem. DNase I-afskermingsanalise is voorts op dieselfde wyse op die onderskeie kollageenfragmente uitgevoer.

7.2.2.2 DIE KOLLAGEENFRAGMENTE

In Figuur 7.4 word die DNase I-afskermingsanalise van Sp1, Ap1 en Ap2 op die Eco RV - Pvu II-kollageenfragment (-445 tot -275) gegee. Die 217 bp Eco RI - Sal I-fragment is 5'-radioaktief aan die Eco RI-punt, gemerk terwyl die teenoorgestelde string, die 200 bp Sal I - Bam HI-fragment aan die Sal I-punt gemerk is soos in Afdeling 4.6 beskryf. Die volgorde van die bane op die gel is soos vir SV40, naamlik Maxam en Gilbert-volgordebepaling (baan 1 en 2); kontrole (baan 3 en 7); DNA met 1 μ l Sp1 (baan 4); DNA met 1 μ l Ap1 (baan 5) en DNA met 2 μ l Ap2 (baan 6).

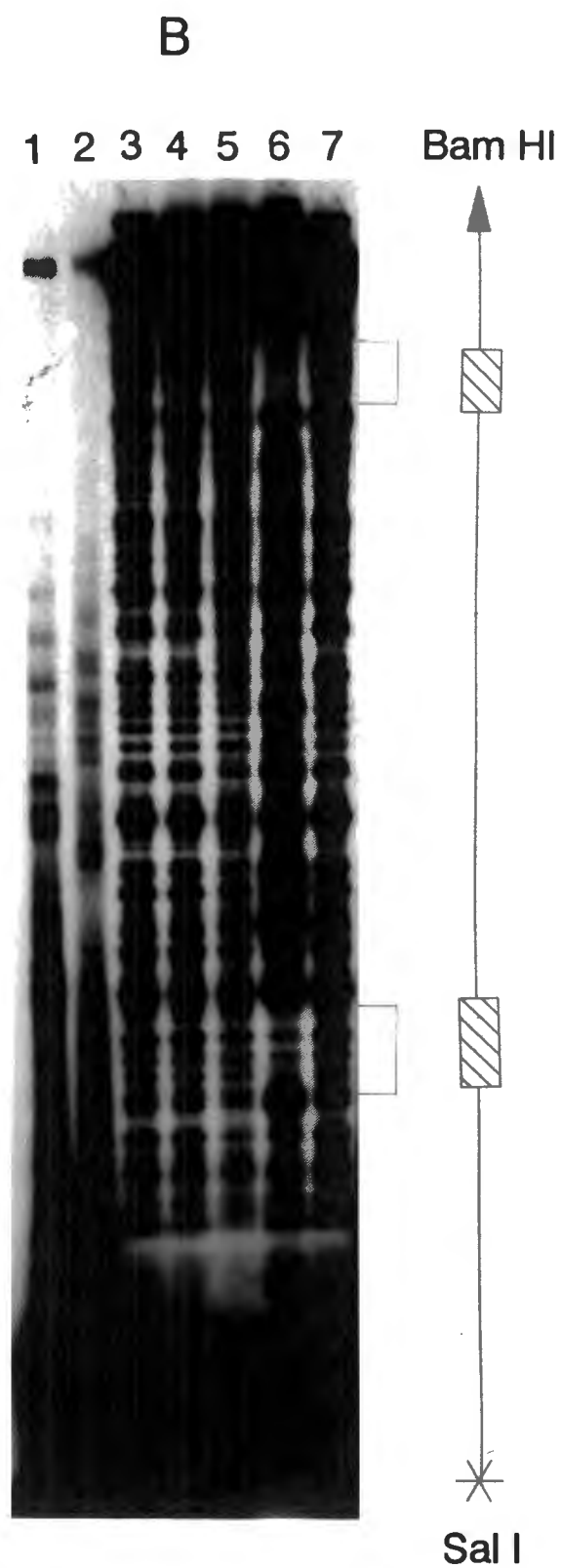
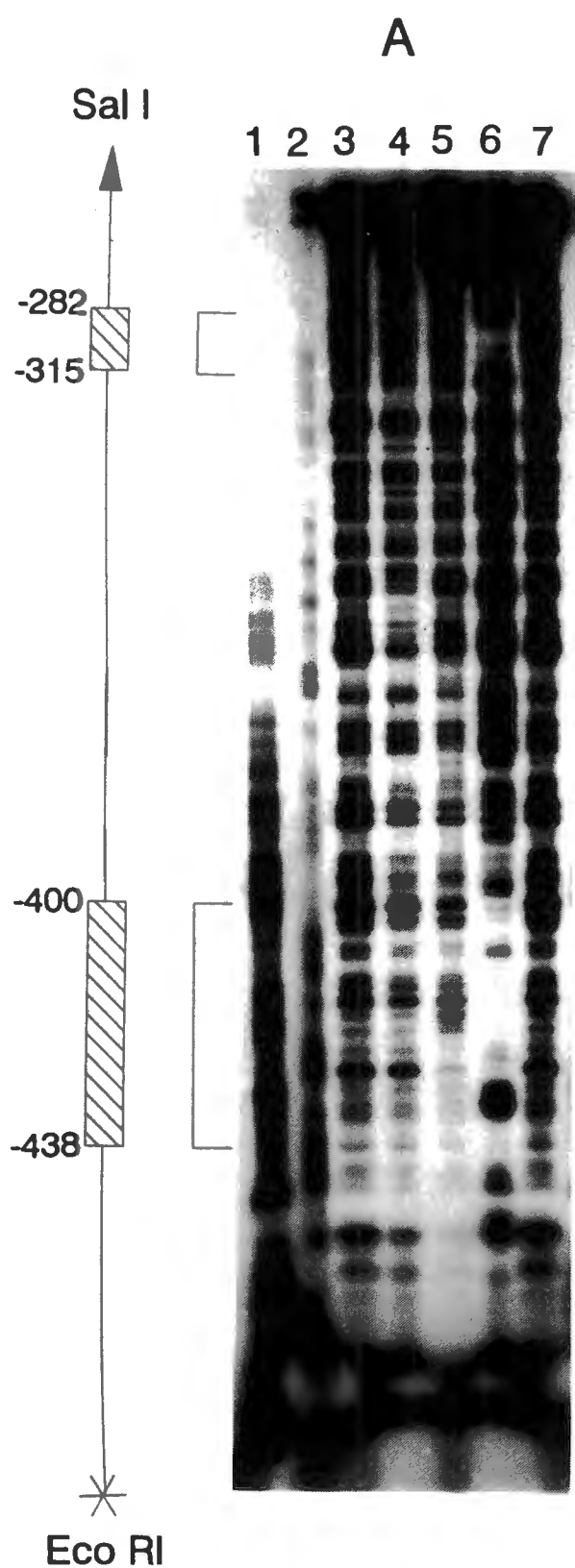
Twee potensiële Sp1-bindingspunte is verwag, omdat tipiese Sp1-bindingsvolgordes soos waargeneem by die mens insulienreseptorgeen 5'-GGGAGG-3' en by die beespapillomavirus 5'-GGTTGG-3' (Tabel 7.1 nr 24 en nr 18) in die Eco RV - Pvu II-fragment voorkom. Geen Sp1-afskerming is egter in baan 4 in die koderende of teenoorgestelde string waargeneem nie. Hoewel die twee potensiële Sp1-bindingsvolgordes slegs met een nukleotied van die Sp1-konsensuskernvolgorde 5'-GGGCGG-3' verskil, speel die aangrensende volgordes blykbaar ook 'n rol by die binding van die proteïen (Briggs *et al.*, 1986). In die geval van die volgordes rondom die potensiële bindingspunte vir Sp1 in die Eco RV - Pvu II-fragment, dra dit dus by tot Sp1-binding nie.

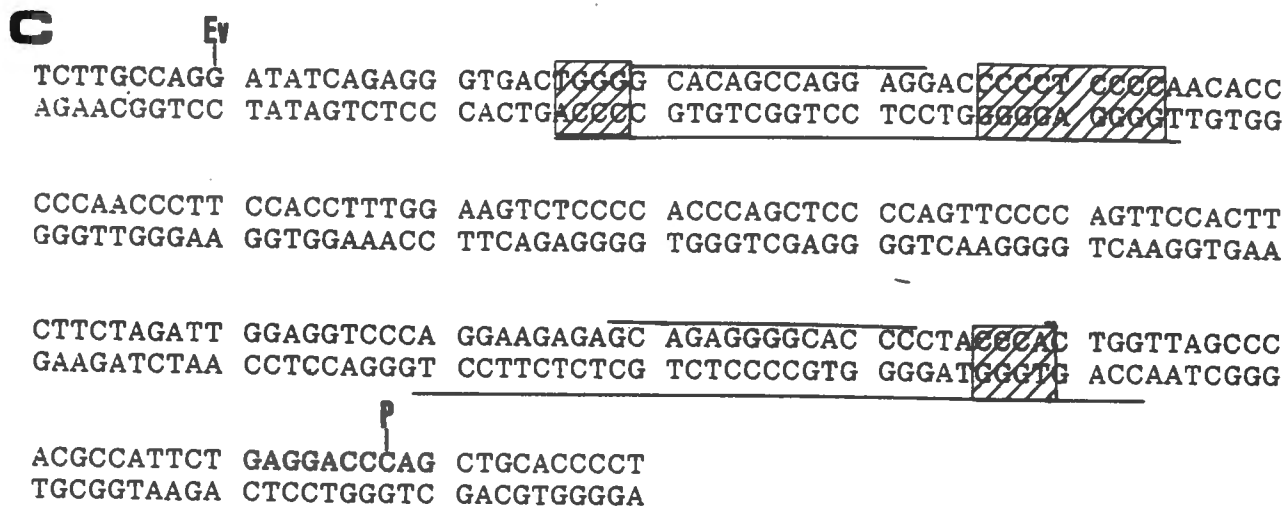
Geen potensiële Ap1-bindingspunte is op die DNA-volgorde van die fragment waargeneem nie en geen afskerming is in baan 5 verkry nie. Ses potensiële Ap2-bindingspunte is op die DNA-volgorde geïdentifiseer. Twee afskermingsgebiede vir Ap2 is in baan 6 op beide stringe waargeneem. Afskermingsgebied 1 op die koderende string (paneel A) strek vanaf -438 tot -400. In die gebiede wat afgeskerm word, is daar 'n Ap2-konsensusvolgorde 5'-CCCCTCCC-3' teenwoordig (Tabel 7.3 nr 3). Onderzoek na Ap2-binding in die SV40-vroeë promotorgeen het getoon dat Ap2 ook aan gedeeltes van Ap2-bindingspunte, naamlik 5'-CCCA-3' en 5'-AGGC-3' bind (Mitchell *et al.*, 1987). In afskermingsgebied 1 is so 'n volgorde, naamlik 5'-TGGG-3', teenwoordig soos aangedui in die DNA-volgorde in Figuur 7.4, paneel C. Binding van Ap2 aan hierdie verkorte Ap2-bindingspunt kan die groter gebiede van afskerming as net die konsensusvolgordegebied verklaar. Die volgorde tussen die verkorte Ap2-bindingspunt en die konsensus bindingspunt kom gedeeltelik ooreen met die Ap2-bindingsgebied wat teenwoordig is in die mens groeihormoon (Tabel 7.3 nr 13). Die ooreenkoms tussen hierdie volgordes is soos volg:

mens groeihormoon:	5'-GACAAGCCAGGGGGCATGATCCC-3'
<u>Eco RV</u> - <u>Pvu II</u> -fragment:	5'-GCACAGCCAGGAGG-3'

en word met 'n lyn bo die DNA-volgorde in paneel C aangetoon. Soos reeds in die inleiding genoem, is Ap2 daarvoor bekend dat dit groot gebiede op DNA-volgordes afskerm (Imagawa *et al.*, 1987). Die verkorte Ap2-bindingspunt en die gedeelte wat ooreenkom met die mens groeihormoon word derhalwe as een Ap2-bindingspunt beskou.

Afskermingsgebied 2 toon afskerming oor die DNA-volgordes wat strek vanaf -315 tot -282. Geen potensiële Ap2-bindingspunte is op hierdie DNA-volgorde geïdentifiseer nie. Bestudering van die afgeskermde gebied toon weer eens 'n Ap2-verkorte bindingspunt van 5'-CCCA-3'. Verder toon die afgeskermde DNA-volgorde ook ooreenkomste met die hoë affiniteits-Ap2-





Figuur 7.4 DNase I-afskermingsanalyse met die Eco RV - Pvu II-kollageenfragment

Die 217 bp Eco RI - Sal I en 200 bp Sal I - Bam HI-fragment wat die Eco RV - Pvu II gebied bevat is 5'-radioaktief gemerk en in DNase I-afskerming-analise tesame met suiwer Sp1, Ap1 en Ap2 gebruik. Die DNA is op 'n 6% denaturerende poli-akriëlamiedgel tesame met Maxam en Gilbert-volgordebe-palings geskei. Posisies is langs die gels aangetoon.

- A:** Koderende string
- Baan 1: GA-volgorde volgens Maxam en Gilbert-volgordebe-paling
 - Baan 2: TC-volgorde volgens Maxam en Gilbert-volgordebe-paling
 - Baan 3 en 7: Geen-proteïenkontrole
 - Baan 4: DNA + 1 μ l Sp1 (15 ng/ μ l)
 - Baan 5: DNA + 1 μ l Ap1 (1 μ g/ μ l)
 - Baan 6: DNA + 2 μ l Ap2 (~ 20 ng/ μ l)
- B:** Teenoorgestelde DNA-string. Bane is soos in paneel A.
- C:** DNA-volgorde van die 308 bp Eco RI - Pvu II kollageenfragment. Afskermingsgebiede is onderstreep. Omramings () toon Ap2-bindingspunte aan.

bindingpunt van die mens groeihormoon (Tabel 7.3 nr 12). Die ooreenkoms tussen hierdie volgordes is soos volg:

mens groeihormoon	5'-ATGGCCTGCGGCCAGAGGG CACC-3'
<u>Eco RV</u> - <u>Pvu II</u> -fragment	5'-.....G CAGAGGGGCACC-3'

Om dieselfde rede as in die geval van afskermingsgebied 1, word die Ap2-verkorte bindingspunt en die bindingspunt wat verwant is aan die mens groeihormoon, as een Ap2-bindingspunt beskou.

Samevattend kan dus gestel word dat die Eco RV - Pvu II-fragment oor geen Sp1- of Ap1-bindingspunte beskik nie, maar wel oor drie Ap2-bindingspunte.

Interaksie van die Cla I - Xba I-kollageenfragment (Figuur 4.1) met Sp1, Ap1 en Ap2 is bestudeer en die resultate van die DNase I-afskermingsanalise word in Figuur 7.5 weergegee. Die 395 bp koderende Sal I - Bam HI DNA-string en die teenoorgestelde 413 bp Eco RI - Sal I DNA-string is uit plasmied CX geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk (Afdeling 4.5). Die DNA is weer eens in dieselfde volgorde as in Figuur 7.4 tesame met Maxam en Gilbert-volgordebepaling op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Op die koderende sowel as teenoorgestelde DNA-stringe (paneel A en paneel B) is geen afskerming op die DNA in die teenwoordigheid van 1 µl Sp1 (15 ng/µl) waargeneem nie. Uit die rekenaaranalise is wel ses potensieële Sp1-bindingspunte geïdentifiseer (Figuur 7.1). Een van hierdie potensieële Sp1-bindingspunte is selfs 'n perfekte konsensusvolgorde van 5'-GGGCGG-3'. Daar is egter gevalle bekend soos by die HSV onmiddellike vroeë promotor waar Sp1 nie aan 'n perfekte konsensusvolgorde bind nie (Briggs *et al.*, 1986). Die volgordes aangrensend tot die konsensusvolgorde speel waarskynlik soos wat reeds bespreek is in Figuur 7.4, weer eens 'n bydraende rol tot die binding of nie-binding van die proteïen. Ander Sp1-bindingsvolgordes wat in die Cla I - Xba I-fragment voorkom waaraan Sp1 potensieel kon gebind het, is dié wat voorkom in die gene van die mens insulienreseptor, arginiensuksinaatsintetase en BPV-1.

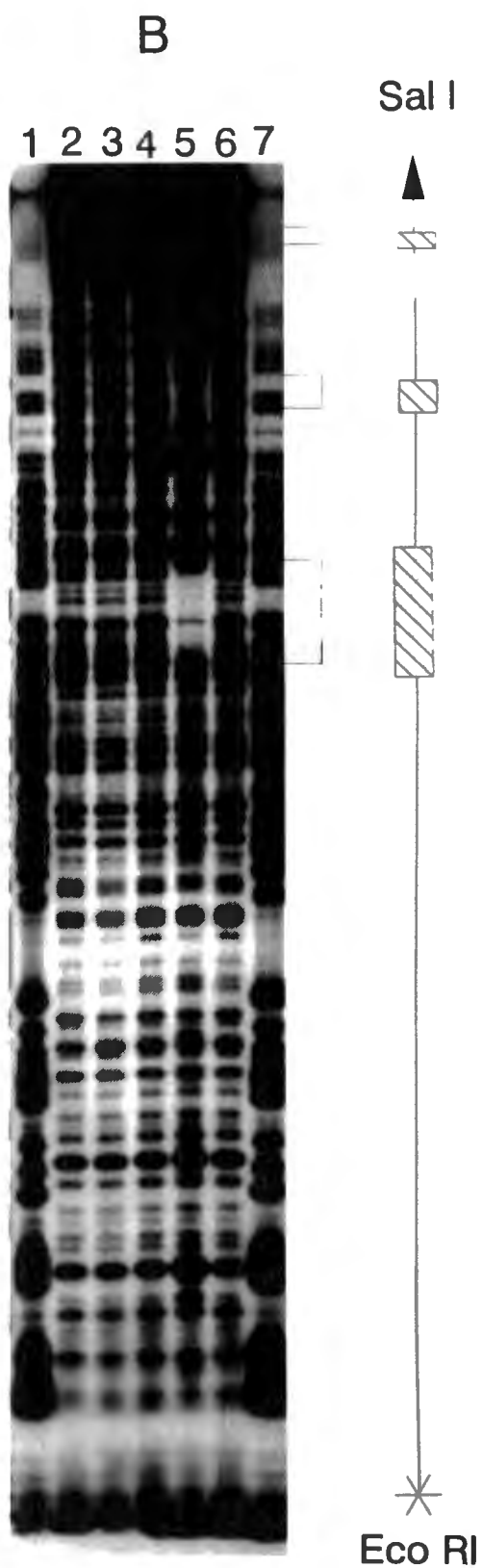
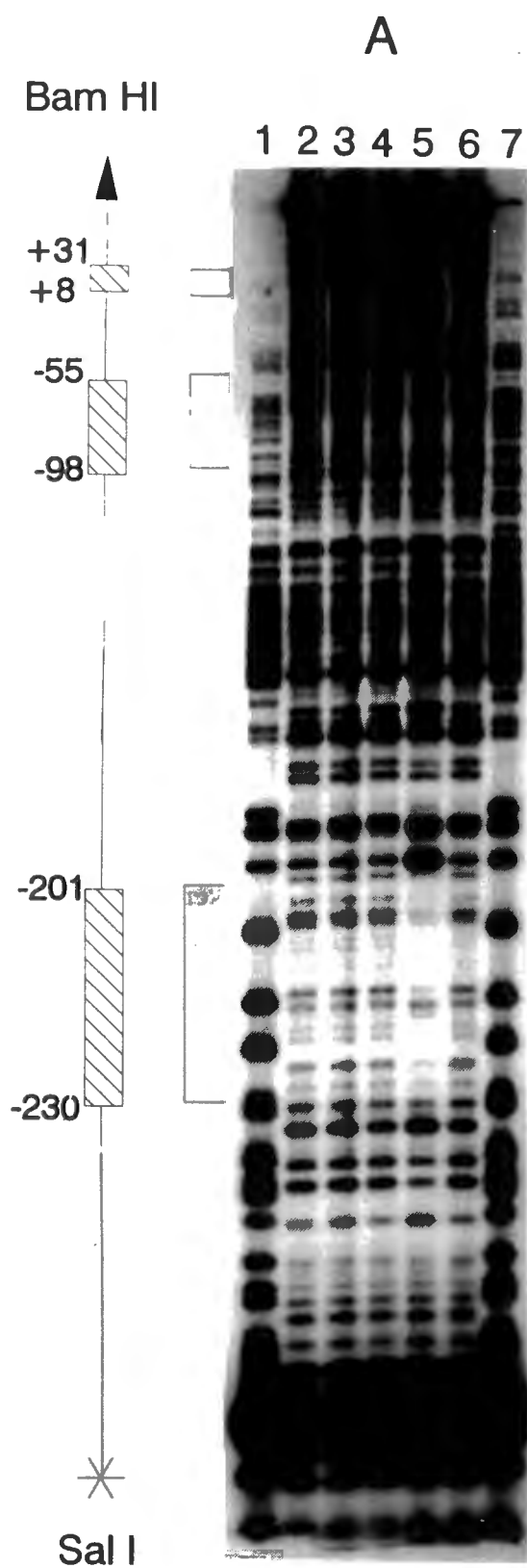
Soos in die geval van die Eco RV - Pvu II-fragment is geen potensiële Ap1-bindingspunte deur rekenaaranalise geïdentifiseer nie. Beide DNA-stringe toon dan ook geen afskermingsgebiede op die DNA in die teenwoordigheid van 1 μ l Ap1 (1 μ g/ μ l) nie (baan 4). Daarteenoor is agt potensiële Ap2-bindingspunte op die Cla I - Xba I-fragment geïdentifiseer. Figuur 7.5, baan 5, toon drie afskermingsgebiede op die DNA van beide stringe in die teenwoordigheid van 2 μ l Ap2 (~ 20 ng/ μ l). Afskermingsgebied 1 strek vanaf -230 tot -201. In hierdie afskermingsgebied is drie potensiële Ap2-bindingspunte geïdentifiseer, waarvan twee met die konsensusvolgorde en een met die SV40 (I)-bindingsvolgorde (Tabel 7.3 nr 3 en 5) ooreenkom. Die volgordes waaraan die Ap2 bind, word in paneel C aangetoon.

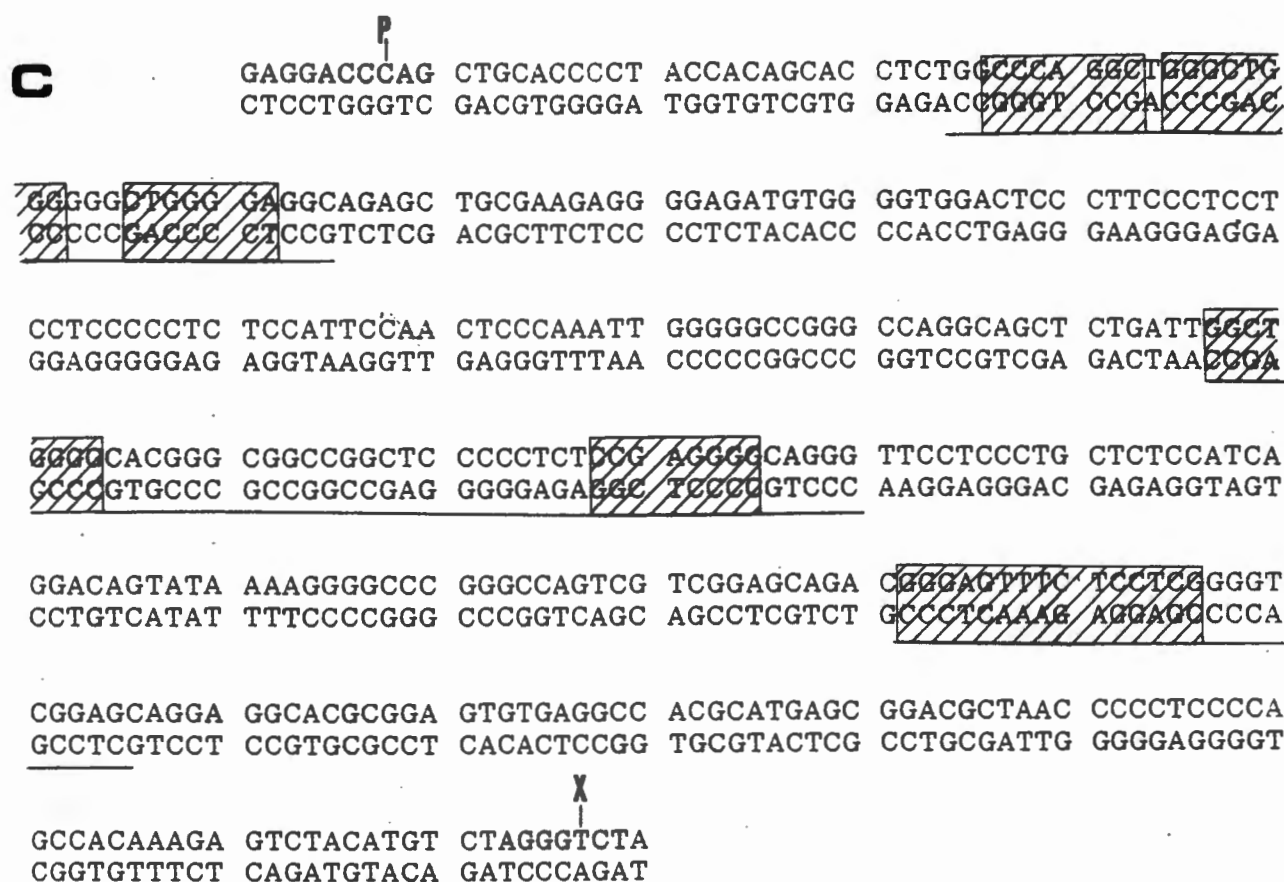
Afskermingsgebied 2 strek oor die DNA-volgordes vanaf -98 tot -55. Hierdie gebied is tussen die CCAAT- en TATA-homologieë geleë soos in paneel C aangetoon. Twee Ap2-bindingspunte ooreenkomstig die konsensusvolgorde, word in hierdie gebied aangetref soos ook deur die rekenaaranalise uitgewys is. Die derde afskermingsgebied geleë net na die inisiasiepunt vir transkripsie, strek vanaf +8 tot +31. Geen potensiële Ap2-bindingspunte is hier met die rekenaaranalise geïdentifiseer nie. Bestudering van hierdie afskermingsgebied toon egter 'n mate van ooreenkoms met die medium affiniteit Ap2-bindingspunt vir die mens metallotionien IIa-geen (Tabel 7.3 nr 10). Ooreenkomste tussen die volgordes is soos volg:

MT IIa-geen	5'-GGGTGTTTCGCCTGGAGCCGCA -3'
<u>Cla I</u> - <u>Xba I</u> -fragment	5'-GGGAGTTTCTCCTCGGGTTCGGAG-3'

Deur die vermoë van Ap2 om aan breë bindingsgebiede te bind in ag te neem, soos ook beskryf is vir die Ap2-bindingsgebiede in Figuur 7.4, word die hele afskermingsgebied 3 as Ap2-bindingspunt beskou.

Fragment Cla I - Xba I wat die promotorgebied van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen insluit wat gebruik is in die funksionele analyses, beskik dan oor





Figuur 7.5 DNase I-afskermingsanalise met die Cla I - Xba I-kollageenfragment

Die 395 bp Sal I - Bam HI en 413 bp Eco RI - Sal I-fragmente wat die Cla I - Xba I gebied bevat, is 5'-radioaktief gemerk en aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Suiwer Sp1, Ap1 en Ap2-proteïene is gebruik. Die DNA is op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel tesame met Maxam en Gilbert-volgordebepalings geskei. Posisies van afskerming word langs die gels aangetoon.

- A: Koderende string
 Baan 1 en 7: TC-volgorde volgens Maxam en Gilbert-volgordebepaling
 Baan 2 en 6: Geen-proteïenkontrole
 Baan 3: DNA + 1 µl Sp1 (15 ng/µl)
 Baan 4: DNA + 1 µl Ap1 (1 µg/µl)
 Baan 5: DNA + 2 µl Ap2 (~20 ng/µl)
- B: Teenoorgestelde DNA-string
 Bane soos vir A
- C: DNA volgorde van Cla I - Xba I-kollageenfragment. Afskermingsgebiede is onderstreep. Omramings toon Ap2 (◻)-bindingspunte aan.

geen Sp1- of Ap1-bindingspunte nie. Hierdie gebied is egter wel ryk aan Ap2-bindingspunte en nie minder nie as ses Ap2-bindingspunte is in hierdie fragment geïdentifiseer.

Figuur 7.6 toon die DNase I-afskermingsanalise van kollageenfragment Xba I - Sac I (Figuur 4.1) wat strek vanaf +113 tot +380 met suiwer Sp1-, Ap1- en Ap2-proteïene. Die 321 bp Sal I - Bam HI en 339 bp Eco RI - Sal I-fragmente wat die kollageenfragment insluit is uit plasmied XS geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk (Afdeling 4.4). Die DNA is in die volgorde soos beskryf in Figuur 7.6 tesame met Maxam en Gilbert-volgordebepalings op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Analise van die resultate toon dat geen afskerming op die DNA in die teenwoordigheid van 1 μ l Sp1 (30 ng/ μ l) waargeneem is nie. Slegs een potensiële Sp1-bindingspunt ooreenkomstig die konsensusvolgorde is deur rekenaaranalise in hierdie fragment geïdentifiseer. Die naasliggende DNA-volgorde tot die konsensusvolgorde is in hierdie geval weer eens nie geskik om Sp1-binding toe te laat nie. Suiwer Sp1 wat in hierdie eksperiment gebruik is, het 'n hoër proteïenkonsentrasie per fpu as wat in die vorige eksperimente gebruik is. Die proteïenkonsentrasie wat 'n duidelike Sp1-afskerming op SV40-DNA tot gevolg het, word as 1 fpu beskou. Nie alle proteïene is aktief tydens isolasie nie en daarom kan die proteïenkonsentrasie per fpu van lot tot lot (Engels:batch) wissel (persoonlike kommunikasie Promega Corporation).

Geen potensiële Ap1-bindingspunte is op hierdie kollageenfragment geïdentifiseer nie. Soos waargeneem kan word in baan 4 van Figuur 7.6 is sowel by die koderende (paneel A) as teenoorgestelde (paneel B) DNA-stringe, geen afskerming waargeneem nie. Hoewel twee potensiële Ap2-bindingspunte op die Xba I - Sac I-fragment geïdentifiseer is en twee afskermingsgebiede met Ap2 waargeneem is, kom slegs een van die potensiële Ap2-bindingspunte in 'n afgeskermd gebied voor.

Afskermingsgebied 1 wat vanaf +151 tot +176 strek, bevat volgens die rekenaaranalise geen potensiele Ap2-bindingspunte nie. Bestudering van die afgeskermde gebied toon egter ooreenkomste met die medium affiniteit-Ap2-gebied vir die hc-myc onkogeën (Tabel 7.3 nr 14).

Die ooreenkomste tussen die volgordes is soos volg:

```

hc-myc-geen          5'-AATCTC CCGCCACCGGCCCTTT -3'
                      |||  ||  |||||  |||
Xba I - Sac I- fragment 5'-CCTCTTAGCGGCCACCG CCCTCCTGA-3'

```

Afskermingsgebied 1 word dan as een Ap2-bindingsgebied beskou. Die tweede afskermingsgebied strek vanaf +275 tot +296 en bevat 'n Ap2 bindingsgebied ooreenkomstig die konsensusvolgorde soos aangetoon in Tabel 7.3 nr 3. Die Ap2-bindingspunte word in die DNA-volgorde in paneel C aangetoon. Samevattend kan dus gestel word dat kollageenfragment Xba I - Sac I geen Sp1 of Ap1-bindingspunte het nie, maar wel twee Ap2-bindingspunte.

DNase I-afskermingsanalise van die Sma I - Sma I-kollageenfragment met suiwer Sp1, Ap1 en Ap2 word in Figuur 7.7. gegee. Die 426 bp Xba I - Sac I en 428 bp Eco RI - Xba I-fragmente is uit plasmied pSS geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk (Afdeling 4.3.2). Die DNA is tesame met Maxam en Gilbert-volgordebepalings op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Analise van die gelle toon dat die koderende string (paneel A) een afskermingsgebied vir Sp1 in baan 2 bevat, terwyl die teenoorgestelde DNA-string (paneel B) twee afskermingsgebiede het. Die tweede afskermingsgebied op die koderende DNA-string is verskuil in die boonste gedeelte van die gel.

Potensieel beskik die Sma I - Sma I-fragment oor ses Sp1-bindingspunte. Afskermingsgebied 1 strek vanaf +686 tot +702. 'n Sp1-bindingsgebied ooreenkomstig die konsensusvolgorde (Tabel 7.1 nr 62) is in hierdie gebied teenwoordig soos aangedui in die DNA-volgorde in paneel C.

A

B

Bam HI

Sal I

1 2 3 4 5 6 7

1 2 3 4 5 6 7

+296

+275

+176

+151



Sal I



Eco RI

C

X
|

CTAGGGTCTA	GACATGTTCA	GCTTTGTGGA	CCTCCGGCTC
GATCCCAGAT	CTGTACAAGT	CGAAACACCT	GGAGGCCGAG

CTGCTCCTCT	<u>TAGCGGCGAC</u>	CGCCCTCCTG	ACGCACGGCC	AAGAGGAAGG	CCAAGTCGAG
GACGAGGAGA	<u>ATCGCCGGTG</u>	GCBBBAGGAC	TGCGTGCCGG	TTCTCCTTCC	GGTTCAGCTC

GGCCAAGACG	AAGACAGTAA	GTCCCAAAC	TTTGGGAGTG	CAAGGATACT	CTATATCGCG
CCGGTTCTGC	TTCTGTCATT	CAGGGTTTGA	AAACCCTCAC	GTTCTCTATGA	GATATAGCGC

CCTTGCGCTT	<u>GGTCCCGGGG</u>	GCAGCGGCTT	AAAACGAGAC	GTGGATGATC	CGGAGACTCG
GGAACGCGAA	<u>CCAGGGCCCC</u>	CGCGCCGAA	TTTTGCTCTG	CACCTACTAG	GCCTCTGAGC

GGAATGGAAG	GGAGATGATG	AGGGCTCTTC	CTCGGCGCCC	TGAGACAGGA	GGGAGCTCAC
CCTTACCTTC	CCTCTACTAC	TCCCGAGAAG	GAGCCGCGGG	ACTCTGTCCT	CCCTCGAGTG

Sa
|

CCTGGGGCGA	GGTTGGGGTT	GAACGCGCCC
GGACCCCGCT	CCAACCCCAA	CTTGCGCGGG

Figuur 7.6 DNase I-afskermingsanalise met die Xba I - Sac I-kollageenfragment.

Die 321 bp Sal I - Bam HI en 339 bp Eco RI - Sal I-fragmente wat die Xba I - Sac I-kollageenfragment insluit, is 5'-radioaktief gemerk en aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Suiwer Sp1, Ap1 en Ap2 is tydens DNase I-afskermingsanalise gebruik. Die DNA is op 'n 6% poli-akriel-amiegel geskei. Posisies van afskerming word langs die gels aangetoon.

- A: Koderende string
 Baan 1 en 7: TC-volgordes soos verkry na Maxam en Gilbert-volgordebepaling
 Baan 2 en 6: Geen-proteïenkontrolle
 Baan 3: DNA + 1 µl Sp1 (30 ng/µl)
 Baan 4: DNA + 1 µl Ap1 (1 µg/µl)
 Baan 5: DNA + 2 µl Ap2 (20 ng/µl)
- B: Teenoorgestelde DNA-string.
 Bane soos vir A
- C: DNA-volgorde van die Xba I - Sac I-kollageenfragment. Afskermingsgebiede is onderstreep. Omramings toon Ap2-bindingpunte (Ⓜ) aan.

Die tweede Sp1-afskermingsgebied is geleë vanaf +724 tot +742. In hierdie gebied is twee potensiële Sp1-bindingspunte, wat ook 'n konsensusvolgorde omvat teenwoordig, naamlik die vir die HSV-IE-3(II)-geen en die mens arginiensuksinaatsintetasegeen (Tabel 7.1 nr 6 en 20). Hierdie twee potensiële volgordes stem slegs op een nukleotied na nie ooreen nie, naamlik:

HSV-IE-3(II)	5'-GGGGCGGGGT-3'
arginiensuksinaatsintetase	5'-GGGGCGGGG-3'

Die Sp1-bindingsgebied in die arginiensuksinaatsintetasegeen word dus ook in die Sp1 HSV-IE-3(I)-bindingsgebied omvat. Die Sp1-bindingsgebied in afskermingsgebied 2 kom ooreen met die Sp1-bindingspunt in HSV-IE-3(II) soos aangedui op die DNA-volgorde in paneel C.

Een potensiële Ap1-bindingsgebied is deur rekenaaranalise in die Sma I - Sma I-fragment geïdentifiseer. Analise van baan 3 Figuur 7.7 met die DNA plus 1 μ l Ap1 (1 μ g/ μ l) toon een afskermingsgebied wat strek vanaf +596 tot +616. Die potensiële Ap1-bindingsgebied is in die afgeskermde gebied teenwoordig en kom ooreen met die Ap1-konsensusvolgorde (Tabel 7.2 nr 6). Hierdie Ap1-bindingspunt is op die DNA-volgorde in paneel C aangetoon.

Nege potensiële bindingspunte vir Ap2 is op die DNA-volgorde geïdentifiseer (Figuur 7.1). Uit die resultate in baan 4 Figuur 7.7 kan waargeneem word dat op beide stringe een afskermingsgebied vir Ap2 verkry is. Hierdie afskermingsgebied is geleë vanaf +573 tot +657. Twee Ap2-bindingsgebiede ooreenkomstig die konsensusvolgordes (Tabel 7.3 nr 2 en 3) is in hierdie gebied teenwoordig soos aangedui op die DNA-volgorde in paneel C. Fragment Sma I - Sma I beskik dus oor twee Sp1-, een Ap1- en twee Ap2-bindingsgebiede.

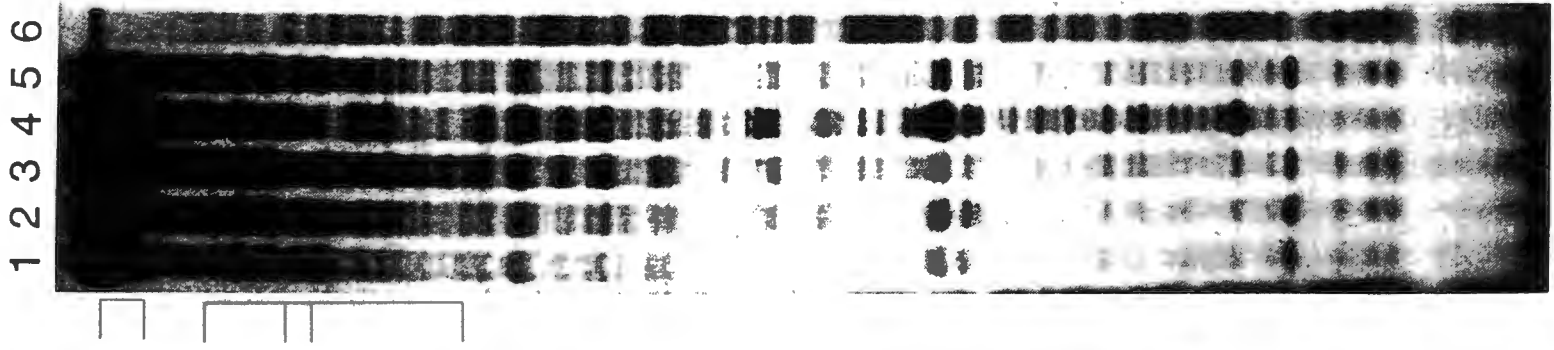
In Figuur 7.8 is die interaksie tussen die Sma I - Rsa I-fragment en Sp1, Ap1 en Ap2 proteïene aangetoon. Die kollageenfragment strek oor die gebied +812 tot +1151. Die 345 bp Xba I - Sac I en 355 bp Eco RI - Xba I-fragmente wat die kollageengebied insluit, is uit plasmied RS geïsoleer en 5'-radioaktiefgemark (Afdeling 4.3.2) waarna dit aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp is. Die koderende sowel as teenoorgestelde DNA-stringe (paneel A en paneel B) toon twee Sp1-afskermingsgebiede in baan 4. Drie potensiële Sp1-bindingsgebiede wat ook 'n konsensusvolgorde omvat en oor bykans 20 bp strek, is in die eerste afskermingsgebied teenwoordig (Figuur 7.1). Hierdie drie Sp1-bindingspunte is dié vir die adenosindeaminasegeen 5'-GGGCGGG-3'; die vir die medium affiniteitsbindingsgebied vir arginiensuksinaatsintetase 5'-GGGGCGGGG-3' en vir die lae affiniteitsbindingsgebied vir arginiensuksinaatsintetase 5'-GGGGCCGGG-3' (Tabel 7.1 nr 23, 20, 19). Die Sp1-bindingspunt vir die adenosindeaminasegeen word egter in die medium Sp1-affiniteitsbindingsgebied omsluit. Afskermingsgebied 1 vir Sp1 in die Sma I - Rsa I-fragment beskik dus oor twee oorvleuelende Sp1 bindingsgebiede wat ooreenkom met die medium en lae affiniteit Sp1-bindingsgebiede vir die arginiensuksinaatsintetasegeen. Geen potensiële Sp1-bindingspunte is in afskermingsgebied 2 wat strek vanaf +984 tot +1010 geïdentifiseer nie. Bestudering van hierdie volgorde toon dat die GC-ryke volgorde 5'-GCGCGGTGGG-3' waarskynlik vir die afskerming verantwoordelik is. Die eerste gedeelte van hierdie gebied verskil slegs in een nukleotied met die Sp1 konsensusvolgorde 5'-GGGCGG-3', terwyl die laaste gedeelte van die voorgestelde gebied verwant is aan die Sp1-bindingsgebied in BPV-1, naamlik 5'-GGGTGG-3'.

Geen potensiële Ap1-bindingsgebiede is deur rekenaaranalise in die Sma I - Rsa I-fragment geïdentifiseer nie. Daar is ook geen afskermingsgebiede vir Ap1 in baan 5 van Figuur 7.8 aangetoon nie.

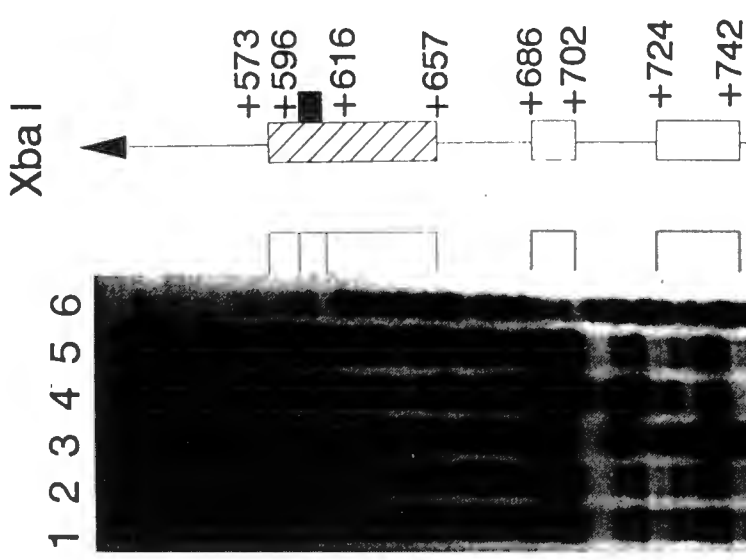
Bestudering van die DNA-Ap2 interaksie (baan 6) toon twee gebiede van afskerming. Hierdie afskermingsgebiede strek vanaf +922 tot +943 en

A

Sac I

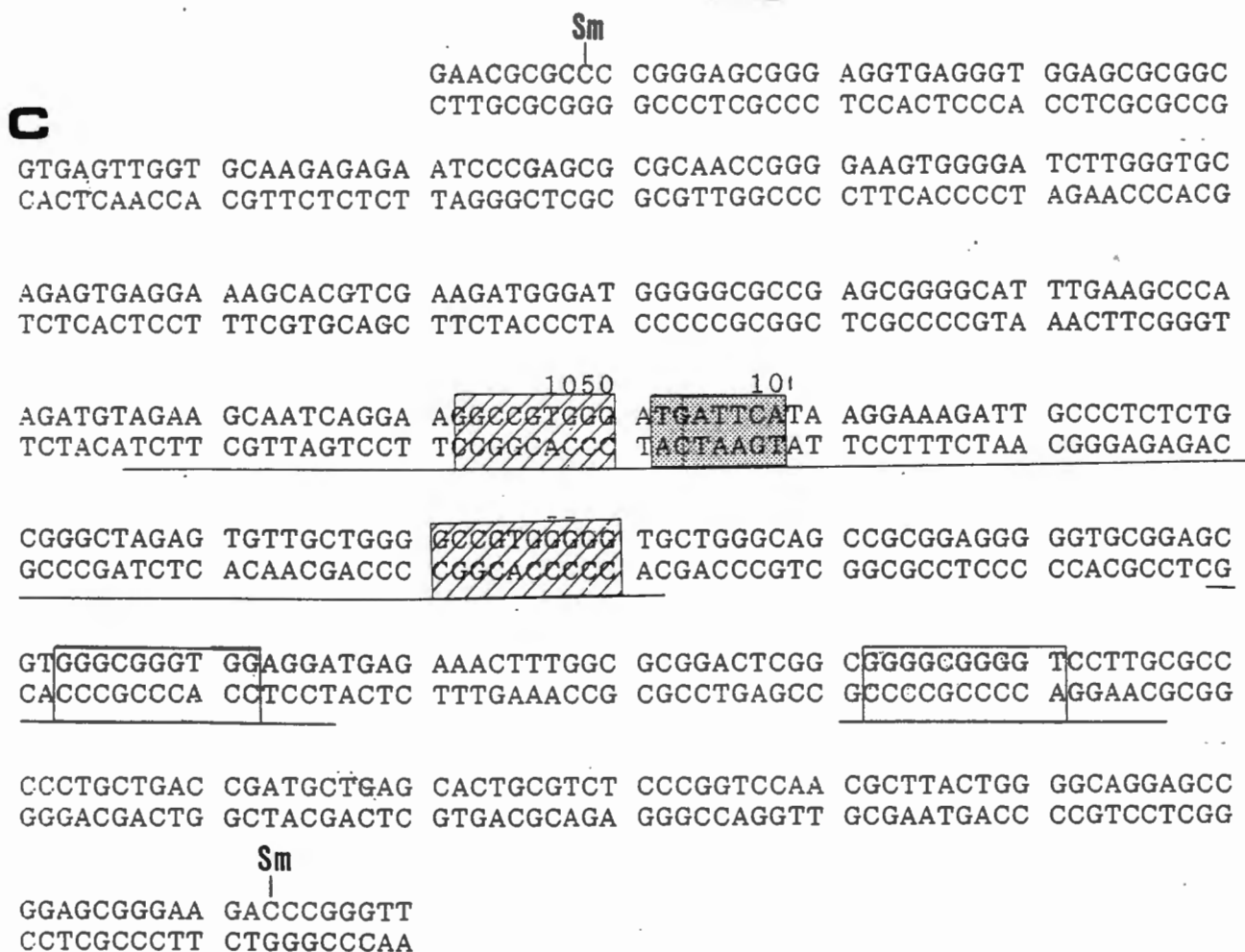


B



Xba I

Eco RI



Figuur 7.7 DNase I-afskermingsanalise met die Sma I - Sma I-kollageenfragment

Die 426 bp Xba I - Sac I en 428 bp Eco RI - Xba I-fragmente wat die Sma I - Sma I-gebied insluit, is geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk. Die DNA is met suiwer Sp1, Ap1 en Ap2-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp en op 'n 6% poli-akrielamiedgel geskei. Posisies van afskerming word langs die gels aangetoon, terwyl die posisies op die volgorde langs die nie-koderende string aangetoon word.

- A:** Koderende string
 Baan 1 en 5: Geen-proteïenkontrole
 Baan 2: DNA + 1 μ l Sp1 (30 ng/ μ l)
 Baan 3: DNA + 1 μ l Ap1 (1 μ g/ μ l)
 Baan 4: DNA + 2 μ l Ap2 (~20 ng/ μ l)
 Baan 6: GA-volgordes soos verkry na Maxam en Gilbert-volgordebepaling
- B:** Teenoorgestelde DNA-string.
 Bane soos vir A.
- C:** DNA-volgorde van Sma I-fragment. Afskermingsgebiede is onderstreep. Omramings toon Sp1 (□), Ap1 (■) en Ap2 (▨)-bindingspunte aan.

+1054 tot +1113. Twee Ap2-bindingspunte ooreenkomstig die konsensusvolgorde (Tabel 7.3 nr 3) is in hierdie gebied teenwoordig en is bo-op die twee Sp1-bindingspunte geleë soos aangetoon op die DNA-volgorde in paneel C. In afskermingsgebied 2 is 'n Ap2-bindingsgebied soos vir SV40 (I) (Tabel 7.3 nr 5) teenwoordig. Twee Ap2 gedeeltelike bindingsgebiede 5'-AGGC-3' en 5'-TGGG-3' is ook in die afgeskermd gebied teenwoordig. Hierdie hele afgeskermd gebied word dan as een Ap2-bindingsgebied aanvaar.

Samevattend kan dus gestel word dat die Sma I - Rsa I-kollageenfragment oor drie Sp1-bindingsgebiede, geen Ap1-bindingsgebiede en drie Ap2-bindingsgebiede, beskik.

Die 323 bp Eco RI - Xba I en 320 bp Xba I - Sac I-fragmente is uit plasmied HR295 geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk soos in Afdeling 4.3.2 beskryf. Hierdie fragmente bevat die Rsa I - Hind III-kollageenfragment geleë vanaf +1151 tot +1447. DNase I-afskermingsanalise met die twee fragmente en suiwer Sp1, Ap1 en Ap2 is in Figuur 7.9 weergegee. Potensieel is twaalf Sp1-bindingsgebiede in hierdie kollageenfragment teenwoordig. In die koderende string (paneel A) is drie Sp1-afskermingsgebiede waargeneem. In die teenoorgestelde DNA-string (paneel B) is afskermingsgebied 2 egter in drie kleiner gebiede gefragmenteer sodat vyf verskillende Sp1-afskermingsgebiede waarneembaar is. Afskermingsgebied 1 geleë vanaf +1203 tot +1226 bevat drie verskillende Sp1-bindingspunte wat ook 'n konsensusvolgorde omvat. Die drie potensiële Sp1-bindingspunte kom ooreen met Sp1-bindingsgebiede vir die adensiendeaminasegeen 5'-GGGCGGG-3'; die medium Sp1-affiniteitsgebied vir arginiensuksinaatsintetasegeen 5'-GGGGCGGGG-3' en die vir BPV-1 geen 5'-GGGTGG-3' (Tabel 7.1 nr 23, 20, 18). Sp1-bindingsgebiede vir adensiendeaminase word egter in dié van die arginiensuksinaatsintetasegeen omsluit sodat daar twee Sp1-bindingspunte in afskermingsgebied 1 geïdentifiseer word. Een Sp1-bindingspunt ooreenkomstig die arginiensuksinaatsintetasegeen en een ooreenkomstig die van BPV-1 geen.

Hierdie twee Sp1-bindingsgebiede is naasliggend soos aangedui op die DNA-volgorde in paneel C van Figuur 7.9.

Die tweede Sp1-afskermingsgebied wat meer gefragmenteerd in die teenoorgestelde DNA-string vertoon, is geleë vanaf +1234 tot +1322. 'n Sp1-bindingspunt ooreenkomstig die medium Sp1-affiniteitsbindingspunt vir SV40 (IV) (Tabel 7.1 nr 9) en wat die konsensusvolgorde vir Sp1 insluit, is in hierdie gebied geleë. Die res van die afgeskermde gebied sluit onder meer die pirimidienryke volgordes in. Twee herhalende volgordes van 5'-CCTCCC-3' is in die afgeskermde gebied geleë, terwyl 'n derde gebied met 'n volgorde van 5'-CCCTCC-3' ook geïdentifiseer is. Hierdie volgordes kom ooreen met die Sp1-bindingsgebied vir die mens insulienreseptor en laedigheidslipoproteïenreseptorgene 5'-CCTCCC-3' (Tabel 7.1 nr 24). 'n Verdere Sp1-bindingspunt is in afskermingsgebied 2 geleë. Hierdie afskermingsgebied kom ooreen met die Sp1-bindingsgebied vir ARV-2 LTR (Tabel 7.1 nr 13).

In die derde afskermingsgebied vir Sp1 wat strek oor die gebied vanaf +1349 tot +1370 is twee potensiële Sp1-bindingspunte teenwoordig wat ook die Sp1-konsensusvolgorde insluit. Hierdie twee Sp1-bindingspunte kom ooreen met die van adenosindeaminasegeen 5'-GGGCGGG-3' en die mens insulienreseptor en ook laedigheidslipoproteïenreseptorgene 5'-GGGAGG-3' (Tabel 7.1 nr 23, 24). Hierdie twee Sp1-bindingsgebiede word egter slegs as een Sp1-bindingsgebied beskou, aangesien die meeste Sp1-bindingsgebiede 'n dekanukleotiedvolgorde is en oorvleueling van die twee bindingspunte tot elf nukleotiede lei. Die Sp1-bindingsgebied bestaan dus uit die volgorde 5'-GGGAGGGCGGG-3' soos aangetoon in paneel C van Figuur 7.9.

Geen potensiële Ap1-bindingspunte is in die Rsa I - Hind III-fragment geïdentifiseer nie. Daar is ook geen afskerming in baan 4 waargeneem nie. Sewe potensiële Ap2-bindingsgebiede is tydens rekenaaranalise in die fragment waargeneem. Vier afskermingsgebiede vir Ap2 is op die koderende string (paneel A) waargeneem, terwyl slegs die vierde afskermingsgebied op die

A

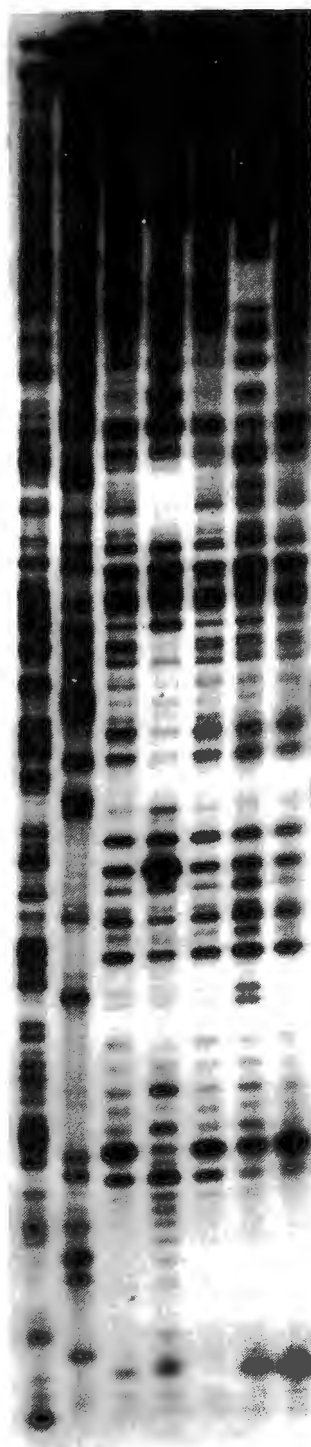
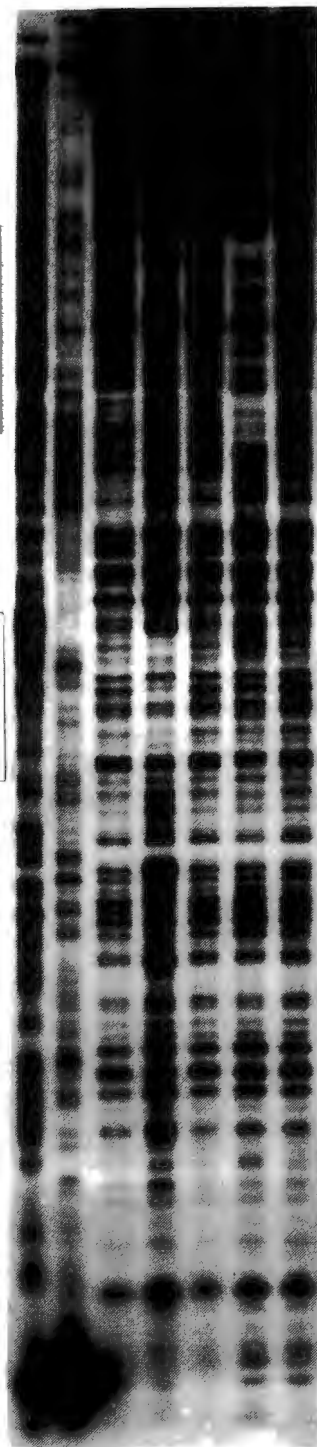
B

Sac I

1 2 3 4 5 6 7

1 2 3 6 5 4 7

Xba I



+922

+1010

+1054

+1113



Eco RI



Xba I

C

Sm
 GACCCGGGTT ATTGCTGGGT GCGGACCCCC ACCTGCTAGA TCTGGAAAGT
 CTGGGCCCAA TAACGACCCA CGCCTGGGGG TGGACGATCT AGACCTTTCA

AAAGCCAGGG ATGGGGCAGC CCAAGCCTCT TAAAGAGGTA GTCGGGCCGG TGAGGTCGGC
 TTTCGGTCCC TACCCCGTCG GGTTCGGAGA ATTTCTCCAT CAGCCCGGCC ACTCCAGCG

CCCCCCCCC CCCCCATTGCT TAGCGTTGCC CGACACCTAG TGGCCGTCTG GGGAGCCGCT
 CCCCCCCCCC GGGGTAACGA ATCGCAACGG GCTGTGGATC ACCGGCAGAC CCCTCGGCGA

AGCGCGGTGG GAGTGGTTAG CTAATTCTG GACTATTTGC GGACTTTTTG GTTCTTTGGC
 TCGCGCCACC CTCACCAATC GATTGAAGAC CTGATAAACG CCTGAAAAAC CAAGAAACCG

TAAAAGTGAC CTGGAGGCAT TGGCTGGCTT TGGGACTGG GGATGGCCCG AGAGCGGCTT
 ATTTTCACTG GACCTCCGTA ACCGACCGAA ACCCTGACC CCTACCGGGC TCTCGCCGAA

TTAAGTTGTC TAGGTGCTGG AGGTTAGGGT GTCTCCTAAT TTAGGTACAT
 AATTCAACAG ATCCACGACC TCCAATCCCA CAGAGGATTA AATCCATGTA

R

Figuur 7.8 DNase I-afskermingsanalise met die Sma I - Rsa I-kollageenfragment.

Die 345 bp Xba I - Sac I en 355 bp Eco RI - Xba I-fragmente wat die Sma I - Rsa I-gebied insluit is geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk. Die DNA is in die teenwoordigheid van suiwer Sp1, Ap1 en Ap2-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp en op 'n 6% poli-akriëlamiedgel geskei. Posisies van afskerming is langs die gele aangetoon.

- A: Koderende string
 Baan 1 en Baan 2: Onderskeidelik GA en TC volgordes soos verkry met behulp van die Maxam en Gilbert volgordebepalingsmetode
 Baan 3 en Baan 7: Geen-proteïene kontrole
 Baan 4: DNA + 1 μ l Sp1 (30 ng/ μ l)
 Baan 5: DNA + 1 μ l Ap1 (1 ug/ μ l)
 Baan 6: DNA + 2 μ l Ap2 (~20 ng/ μ l)
- B: Teenoorgestelde DNA-string
 Bane soos vir A.
- C: DNA-volgorde van die Sma I - Rsa I-fragment.
 Afskermingsgebiede is onderstreep. Omramings toon Sp1(□) en Ap2(⊞) bindingsgebiede aan.

teenoorgestelde string (paneel A) afskerming vertoon. Hierdie enkele afskermingsgebied op die teenoorgestelde string is telkens waargeneem, selfs na drie herhalings van die eksperiment. Afskermingsgebied 4 wat op beide stringe sigbaar is, strek oor die gebied vanaf +1397 tot +1422. Die Ap2-bindingsgebied wat voorkom, kom ooreen met die van die Ap2-konsensusvolgorde en is op die DNA-volgorde in paneel C aangetoon. Die drie afskermingsgebiede wat slegs op die koderende string afgeskerm word, strek oor die gebiede +1163 tot +1179; +1234 tot +1252 en +1349 tot +1378. In die eerste twee afskermingsgebiede kom slegs die gedeeltelike Ap2-bindingsgebiede voor. In afskermingsgebied 1 kom die twee bindingspunte 5'-TGGG-3' en 5'-GCCT-3' voor, terwyl in bindingsgebied 2 slegs 5'-TGGG-3' voorkom. Afskermingsgebied 3 het twee oorvleuelende Ap2-bindingsgebiede wat ooreenkom met die Ap2-konsensusvolgorde. Die twee Ap2-bindingspunte is bo-op die Sp1-bindingsgebied geleë, soos aangetoon in paneel C van Figuur 7.9. Die feit dat die eerste twee afskermingsgebiede nie afskerming op die teenoorgestelde DNA-string ondergaan het nie, kan moontlik wees as gevolg van die verkorte Ap2-bindingspunte wat hier voorkom. Die rede waarom die twee Ap2-bindingspunte in afskermingsgebied 3 nie op die teenoorgestelde string afskerm nie, is egter onbekend.

Samevattend kan dus gesê word dat die Rsa I - Hind III-kollageenfragment agt Sp1-bindingsgebiede bevat, geen Ap1-bindingsgebiede nie en vyf Ap2-bindingsgebiede, waarvan binding slegs by een aan beide stringe plaasgevind het.

Die DNase I-afskermingsanalise met die Hind III - Rsa I-kollageenfragment en suiwer Sp1, Ap1 en Ap2-proteïene word in Figuur 7.10 weergegee. Fragment Hind III - Rsa I is geleë vanaf +1447 tot +1697. Die 273 bp Xba I - Sac I en 279 bp Eco RI - Xba I-fragmente wat die Hind III - Rsa I-gebied insluit, is uit plasmied pHR3' geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk (Afdeling 4.7). Die DNA is in die teenwoordigheid van Maxam en Gilbert-volgordebepalings op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei.

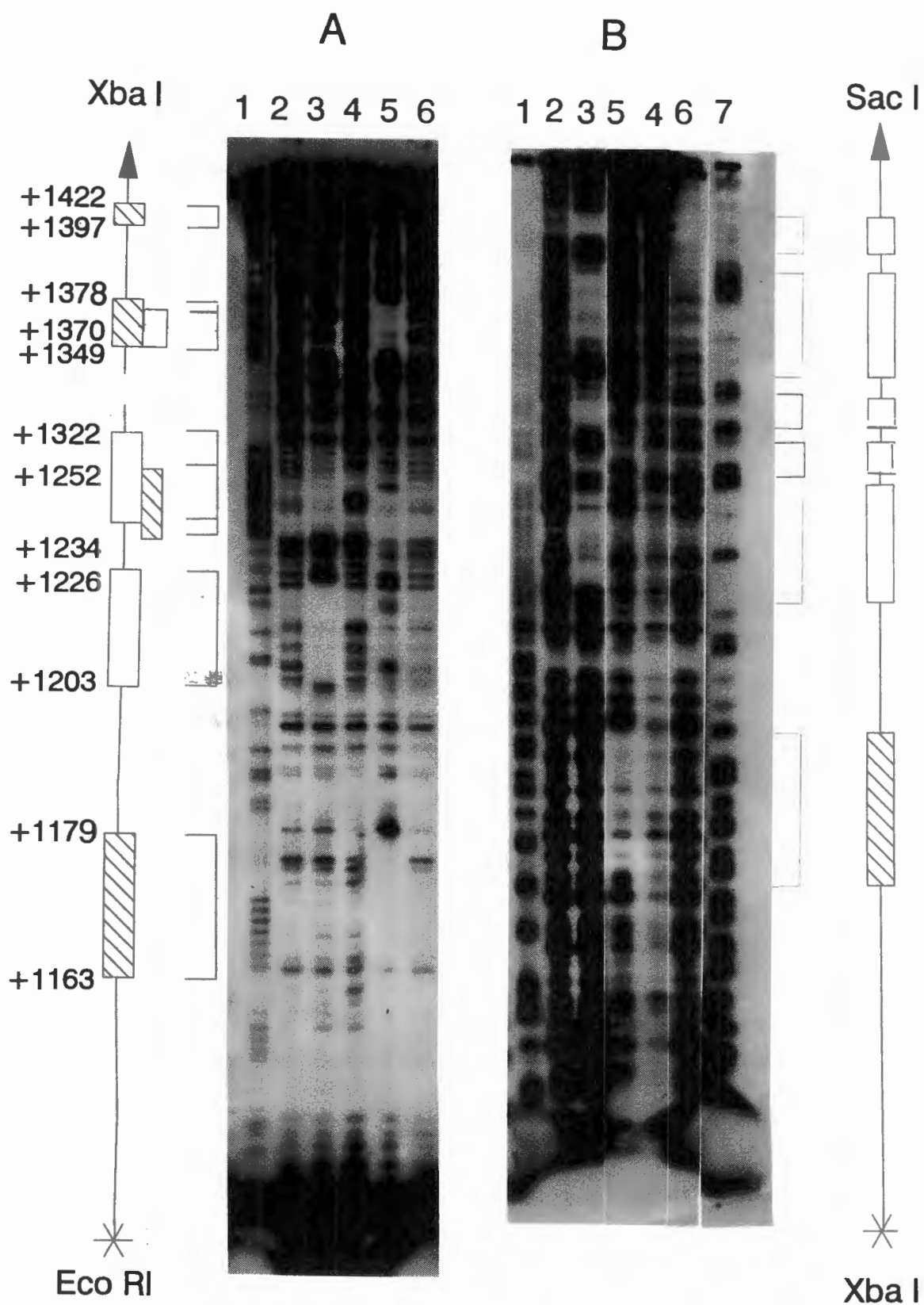
Die koderende DNA-string word in paneel A en die teenoorgestelde DNA-string in paneel B gegee.

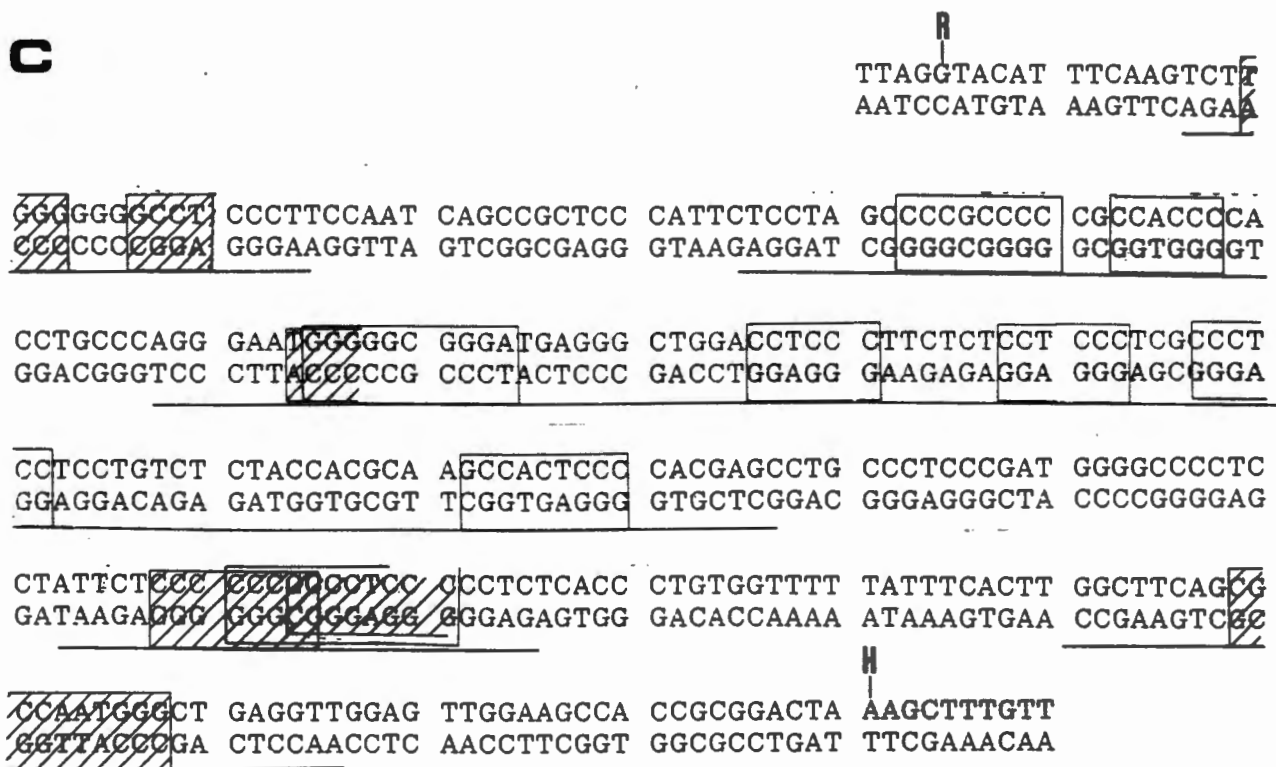
Drie potensiële Sp1-bindingspunte is deur rekenaaranalise (Figuur 7.1) in die volgorde geïdentifiseer. Analise van die interaksie tussen die DNA en die Sp1-proteïen (baan 4) toon twee afskermingsgebiede op beide DNA-stringe aan. In die eerste afskermingsgebied wat strek vanaf +1568 tot +1593 is twee Sp1-bindingsgebiede geïdentifiseer. Hierdie twee Sp1-bindingsgebiede kom ooreen met die Sp1-bindingsgebiede van die mens insulienreseptor en ook laedigheidslipoproteïenreseptorgene 5'-GGGAGG-3' en met die van die adensiendeaminasegeen wat die konsensusvolgorde insluit 5'-GGGCGGG-3' (Tabel 7.1 nr 24, 23). Geen potensiële Sp1-bindingsgebiede is in afskermingsgebied 2 wat strek vanaf +1654 tot 1679 geïdentifiseer nie. Daar is egter 'n sewe nukleotiedooreenkoms tussen die afgeskermd gebied en die volgorde van die Sp1-bindingsgebied vir HBV-nukleokapsiedpromotor (Tabel 7.1 nr 59). Die ooreenkoms tussen die twee volgordes is soos volg:

HBV-nukleokapsied:	5'- TGGGCGTTCA -3'
<u>Hind III</u> - <u>Rsa I</u> -fragment:	5'-GAGGGGCGTTGTC-3'

Die geïdentifiseerde Sp1-bindingsgebiede is op die DNA-volgorde in paneel C Figuur 7.10 aangetoon.

Geen potensiële Ap1-bindingsgebied is op die DNA-volgorde geïdentifiseer nie. Analise van baan 5 toon ook geen afskerming van die DNA nie. Vier potensiële Ap2-bindingsgebiede ooreenkomstig die konsensusvolgorde vir Ap2 (Tabel 7.3 nr 3) is op die Hind III - Rsa I DNA-volgorde deur rekenaaranalise waargeneem. Slegs een afskermingsgebied is vir Ap2 in baan 6 verkry. Hierdie afskermingsgebied is geleë vanaf +1609 tot +1625. Die Ap2-bindingspunt geleë in hierdie afgeskermd gebied kom ooreen met die Ap2-konsensusvolgorde soos weergegee op die DNA-volgorde in paneel C van Figuur 7.10.

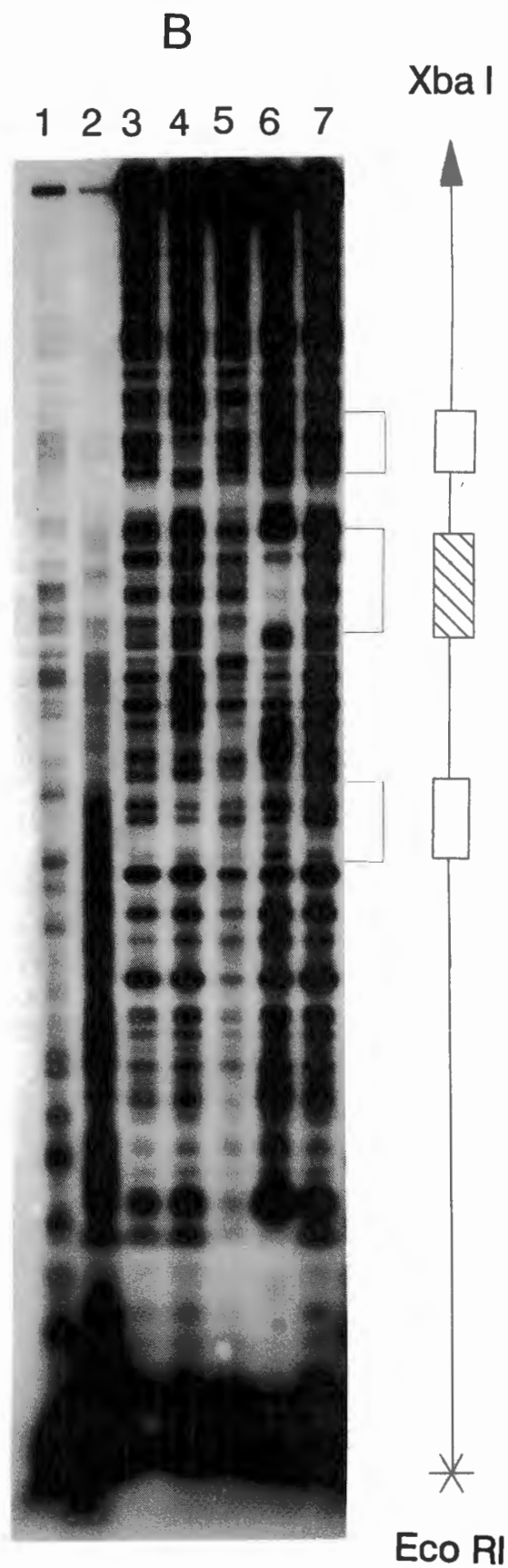
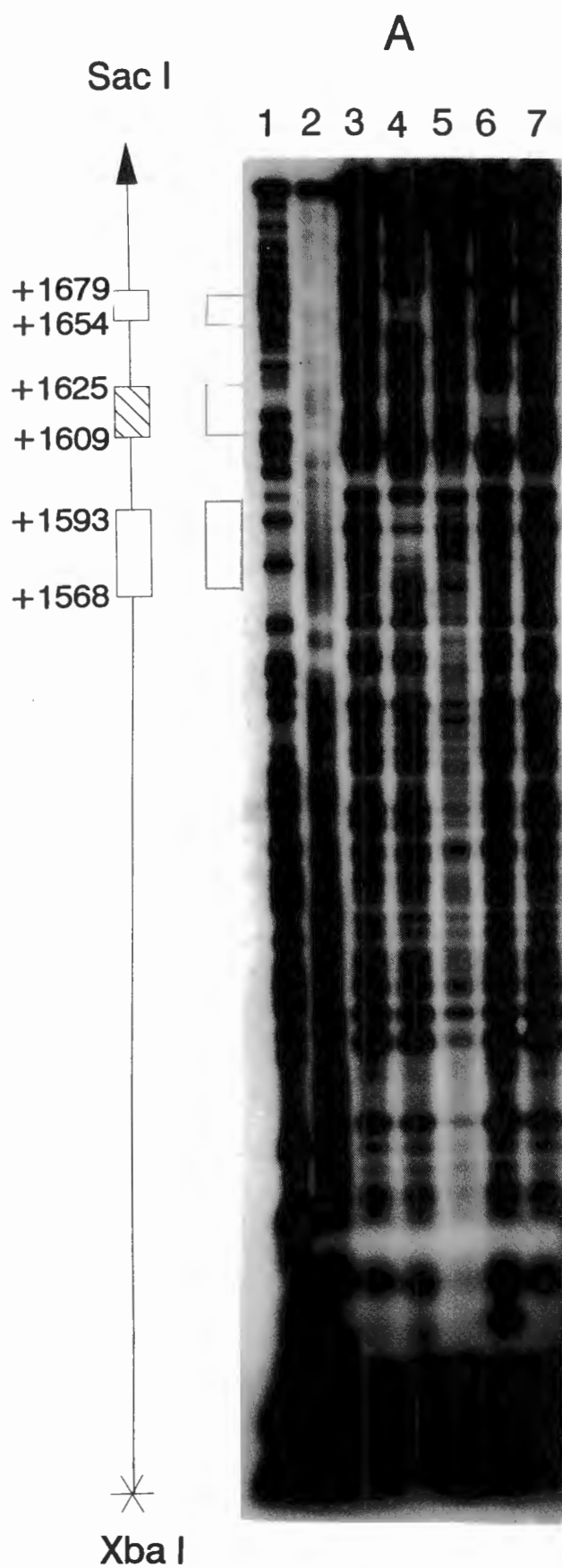




Figuur 7.9 DNase I-afskermingsanalise van die Rsa I - Hind III-kollageenfragment

Die 323 bp Eco RI - Xba I en 320 bp Xba I - Sac I-fragmente wat die Rsa I - Hind III-gebied insluit, is geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk. Die DNA is met suiwer Sp1, Ap1 en Ap2-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp en op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Posisies van afskerming word langs die gels aangetoon.

- A:** Koderende string
- Baan 1: TC-volgorde volgens Maxam en Gilbert-volgordebe-
paling
- Baan 2 en 6: Geen-proteïenkontrolle
- Baan 3: DNA + 1 μ l Sp1 (30 ng/ μ l)
- Baan 4: DNA + 1 μ l Ap1 (1 μ g/ μ l)
- Baan 5: DNA + 2 μ l Ap2 (20 ng/ μ l)
- B:** Teenoorgestelde DNA-string
- Bane soos vir A
- C:** DNA-volgorde van Rsa I - Hind III kollageenfragment vanaf +1151 tot +1447. Afskermingsgebiede is onderstreep. Omramings toon Sp1 ($\square$) en Ap2 ($\otimes$) bindingspunte aan.



C

H
AAGCTTTGTT TAAATTCCTG
TTCGAAACAA ATTTAAGGAC

AGAACTGGAA AGAGTTACAG CCTCCCTGGC CAGGCGCCTC GGCNGGTCAC CCGCGCTGAT
TCTTGACCTT TCTCAATGTC GGAGGGACCG GTCCGCGGAG CCGNCCAGTG GGCGCGACTA

GAGGAGCAGG CGAGCTTTTA AGGATTTGAG GAAAGAAGAA CGGGGGGAGG GCGGGGAAGT
CTCCTCGTCC GCTCGAAAAT TCCTAAACTC CTTTCTTCTT GCCCCTCTCC CCGCCCTTCA

GAAAAATCCA AGTGCCTCTT AGACCCGGGG GAAAGGTGGT TAAGCTGGGG GTTGCAGTCA
CTTTTtaggt TCACGGAGAA TCTGGGGGGG GTTTCCACCA ATTGACCCCC CAACGTCAGT

CTACTGACAA CGCCCTCTT CCGCCTGTCC CAGTCCCACC AATCACCTGC GTACAGAACG
GATGACTGTT GCGGGGAGAA GGCGGACAGG GTCAGGGTGG TTAGTGGACG CATGTCTTGC

Figuur 7.10 DNase I-afskermingsanalise met die Hind III - Rsa I-kollageenfragment

Die 273 bp Xba I - Sac I en 279 bp Eco RI - Xba I-fragmente wat die Hind III - Rsa I-fragment insluit, is geïsoleer en 5'radioaktief gemerk. Die DNA is met suiwer Sp1, Ap1 en Ap2-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp en op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Posisies van afskerming word langs die gels aangetoon.

- A: Koderende DNA-string
Baan 1: GA-volgorde volgens Maxam en Gilbert-volgordebepaling.
Baan 2 en 6: Geen-proteïenkontrole
Baan 3: DNA + 1 μ l Sp1 (30 ng/ μ l)
Baan 4: DNA + 1 μ l Ap1 (1 μ g/ μ l)
Baan 5: DNA + 2 μ l Ap2 (20 ng/ μ l)
- B: Teenoorgestelde DNA-string
Bane soos vir A.
- C: DNA-volgorde van die Hind III - Rsa I-kollageenfragment vanaf +1447 tot +1697. Afskermingsgebiede is onderstreep. Omramings toon Sp1 ($\square$) en Ap2 ($\boxplus$)-bindingspunte aan.

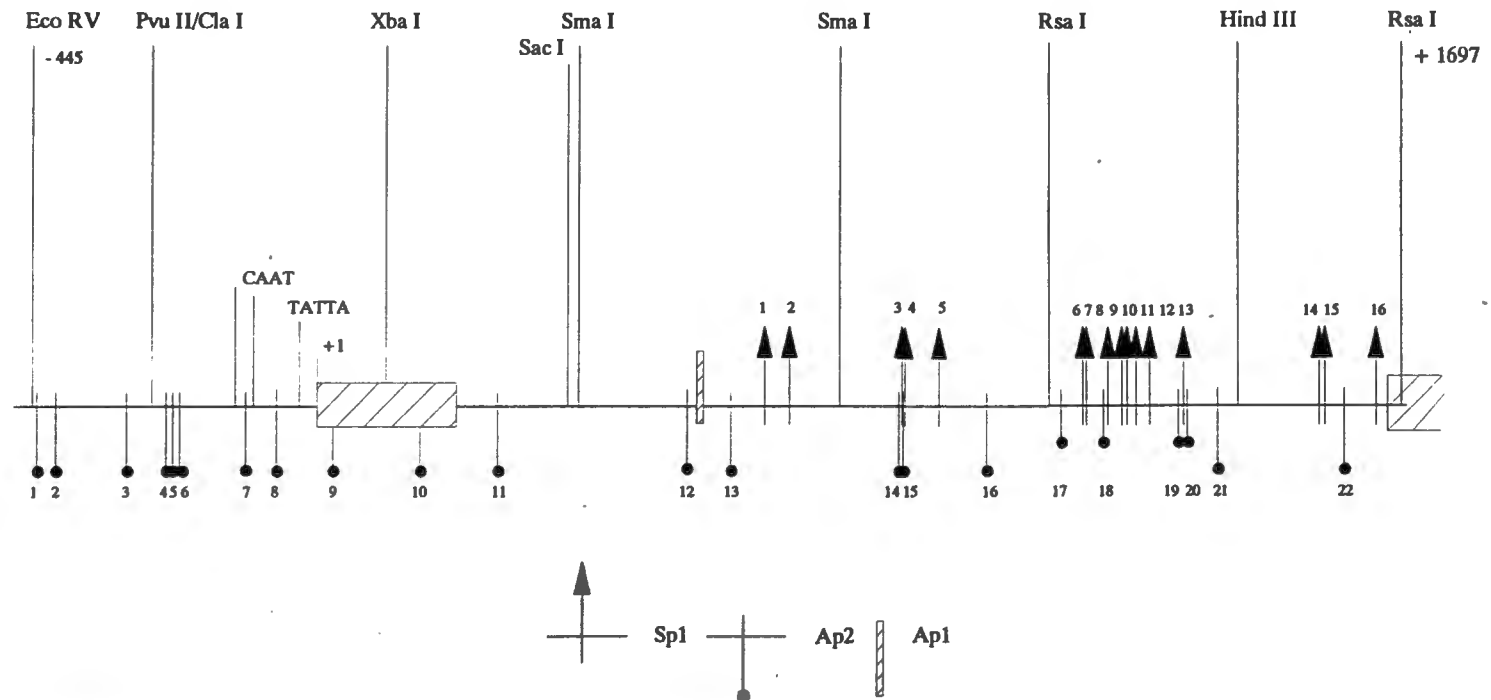
Samevattend kan dus gestel word dat die Hind III - Rsa I-kollageenfragment oor drie Sp1-bindingsgebiede, geen Ap1-bindingsgebiede nie en slegs een Ap2-bindingsgebied beskik.

7.2.2.3

SAMEVATTING

'n Geheelbeeld van die verskillende Sp1, Ap1 en Ap2-bindingsgebiede wat in die kollageenfragment, wat strek vanaf die Eco RV-punt (-445) tot die Rsa I-punt (+1697) geïdentifiseer is, word in Figuur 7.11 weergegee. Hierdie figuur is dus 'n samevatting van die resultate van Figure 7.4 tot 7.10. Die TATA- en CCAAT-homologieë, die inisiasiepunt vir transkripsie en die eksons (ZZZ), word ook in die figuur aangetoon. Die verskillende bindingsvolgordes waaraan die Sp1, Ap1 en Ap2 bind, word in Tabel 7.4 saamgevat. Die nommers in die tabel kom ooreen met die nommers in Figuur 7.11. Volgens hierdie resultate kom daar oor die hele kollageengebied wat bestudeer is, sestion Sp1-bindingsgebiede, een Ap1-bindingsgebied en twee-en-twintig Ap2-bindingsgebiede voor. Nie al die teoreties geïdentifiseerde bindingsgebiede wat deur rekenaaranalise uitgewys is, is dus deur die proteïene Sp1, Ap1 en Ap2 uitgeken en gebind nie. Hierdie resultaat wys dus daarop dat identifisering van bindingsvolgordes deur rekenaaranalise nie genoegsaam is om ware proteïenbindingsgebiede te identifiseer nie. Heelwat nuwe bindingspunte wat uniek is aan die kollageengeen en nie as transkripsiebindingsgebied deur die rekenaaranalise uitgewys is nie, is ook geïdentifiseer, veral in die geval van Ap2-proteïene.

Pro- α 1(I)-kollageengeen



Figuur 7.11 Kartering van die geïdentificeerde Sp1, Ap1 en Ap2-bindingsgebiede op die mens pro- α 1(I)-kollageengeen.

TABEL 7.4 SP1, AP1 EN AP2-BINDINGSPUNTE OP DIE KOLLAGEENFRAGMENT VANAF -445 TOT +1697

Spl-bindingsgebiede			
1.	5'-TGGGCGGGTG-3' 3'-ACCCGCCAC-5'	9.	5'-GGGAGG-3' 3'-CCCTCC-5'
2.	5'-GGGGCGGGGT-3' 3'-CCCGCCCCA-5'	10.	5'-GGGAGG-3' 3'-CCCTCC-5'
3.	5'-GGGGCGGGG-3' 3'-CCCGCCCC-5'	11.	5'-GGAGGG-3' 3'-CCTCCC-5'
4.	5'-GGGGCCGGG-3' 3'-CCCGGCCC-5'	12.	5'-GGGGAGTGGC-3' 3'-CCCCTACCG-5'
5.	5'-GCGCGGTGGG-3' 3'-CGCGCCACCC-5'	13.	5'-GGGAGGGCGGG-3' 3'-CCCTCCCGCCC-5'
6.	5'-GGGGCGGGGC-3' 3'-CCCGCCCCG-5'	14.	5'-GGGAGG-3' 3'-CCCTCC-5'
7.	5'-GGGTGG-3' 3'-CCCACC-5'	15.	5'-GGGCGGG-3' 3'-CCGCCC-5'
8.	5'-GGGGCGGGAT-3' 3'-CCCGCCCTA-5'	16.	5'-GAGGGGCGTT-3' 3'-CTCCCCGCAA-5'
Ap2-bindingsgebiede			
1.	5'-TGGGGCACAGCCAGGAGG-3' 3'-ACCCCGTGTGGTCTCTCC-5'	12.	5'-GCCGTGGG-3' 3'-CGGCACCC-5'
2.	5'-CCCCTCCC-3' 3'-GGGGAGGG-5'	13.	5'-TGGGGCCGTGGGGG-3' 3'-ACCCCGGCACCCCC-5'
3.	5'-GCAGAGGGGCACCCCTACCCA-3' 3'-CGTCTCCCCGTGGGGATGGGT-5'	14.	5'-CCGCCCCC-3' 3'-GGCGGGG-5'
4.	5'-GGCCCAGGC-3' 3'-CCGGGTCCG-5'	15.	5'-CCCGGCC-3' 3'-GGGGCCGG-5'
5.	5'-GGGCTGGGGG-3' 3'-CCCGACCCC-5'	16.	5'-AGGCATTGGCTGGCTTTGGGGACTGGGGA-3' 3'-TCCGTAACCGACCGAAACCCCTGACCCCT-5'
6.	5'-CTGGGGA-3' 3'-GACCCCT-5'	17.	5'-TGGGGGGGCCT-3' 3'-ACCCCCCGGA-5'
7.	5'-GGCTGGGGC-3' 3'-CCGACCCCG-5'	18.	5'-TGGG-3' 3'-ACCC-5'
8.	5'-CCGAGGGGC-3' 3'-GGCTCCCCG-5'	19.	5'-CCCCCGC-3' 3'-GGGGGGCG-5'
9.	5'-GGGAGTTTCTCCTCGGGGTCGGAG-3' 3'-CCCTCAAAGAGGAGCCCCAGCCTC-5'	20.	5'-GCCCTCCC-3' 3'-CGGGAGGG-5'
10.	5'-CCTCTTAGCGGCCACGCCCTCCTGA-3' 3'-GGAGAATCGCCGGTGGCGGGAGGACT-5'	21.	5'-GCCAATGGG-3' 3'-CGGTTACCC-5'
11.	5'-CCCGGGGGCC-3' 3'-GGGCCCCCGG-5'	22.	5'-CCCGGGGG-3' 3'-GGGCCCCC-5'
Ap1-bindingsgebiede			
1.	5'-TGATTCA-3' 3'-ACTAAGT-5'		

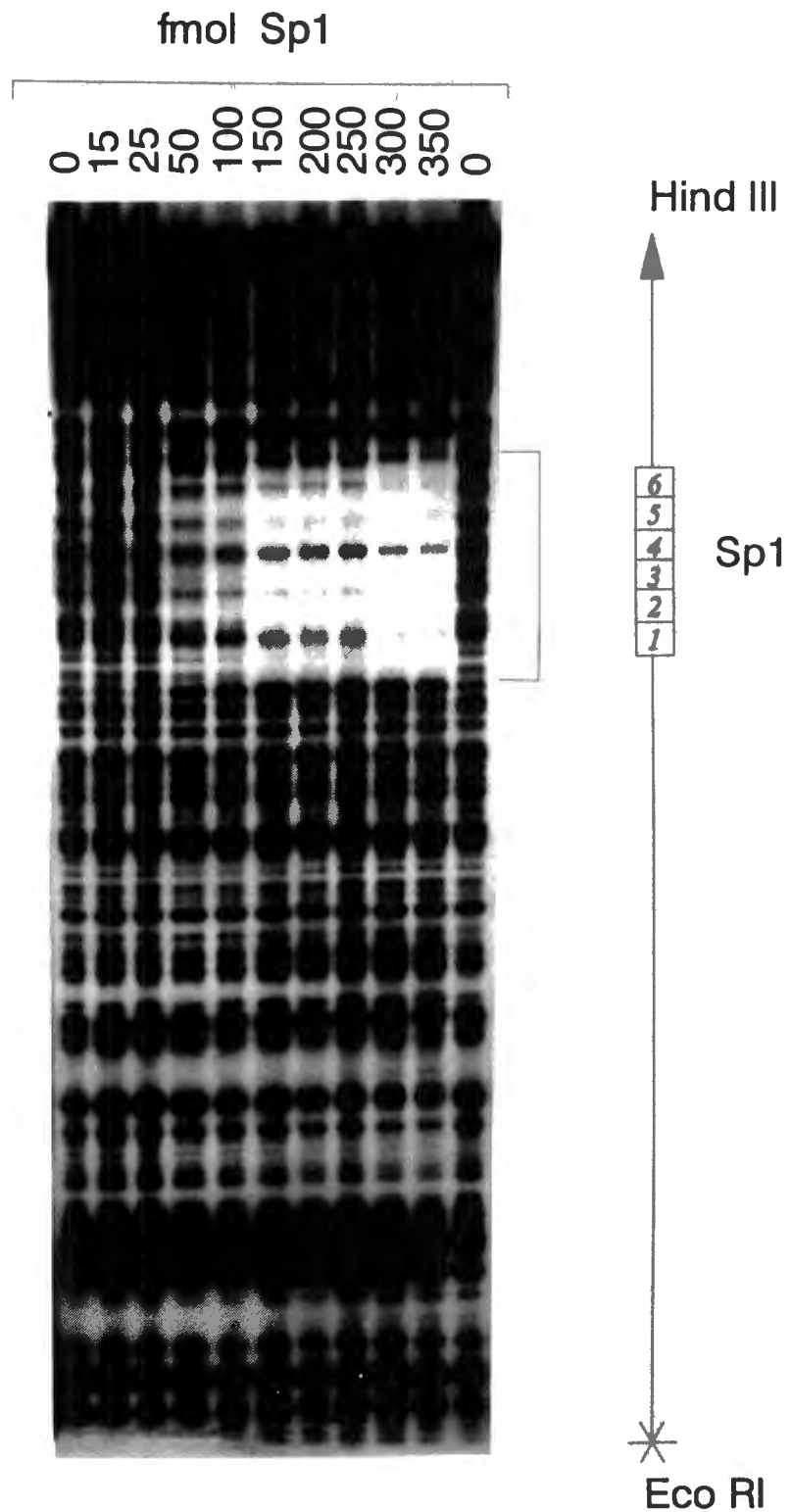
7.3 BINDINGSAFFINITEIT VAN DIE SP1, AP1 EN AP2-PROTEÏENE VIR DIE KOLLAGEEN-DNA

Proteïene bind aan elk van die geïdentifiseerde sestien Sp1, een Ap1 en twee en twintig Ap2-bindingsgebiede met verskillende bindingsaffiniteite. Om te bepaal in welke mate die bindingsaffiniteite van die proteïene aan die verskillende bindingsgebiede wissel, is van DNase I-afskermingsanalise op 'n kwantitatiewe wyse gebruik gemaak. Vir hierdie doel is dieselfde DNA-fragmente as wat in Afdeling 7.2.2.2. gebruik is, tesame met 'n konsentrasiereeks van die suiwer proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp.

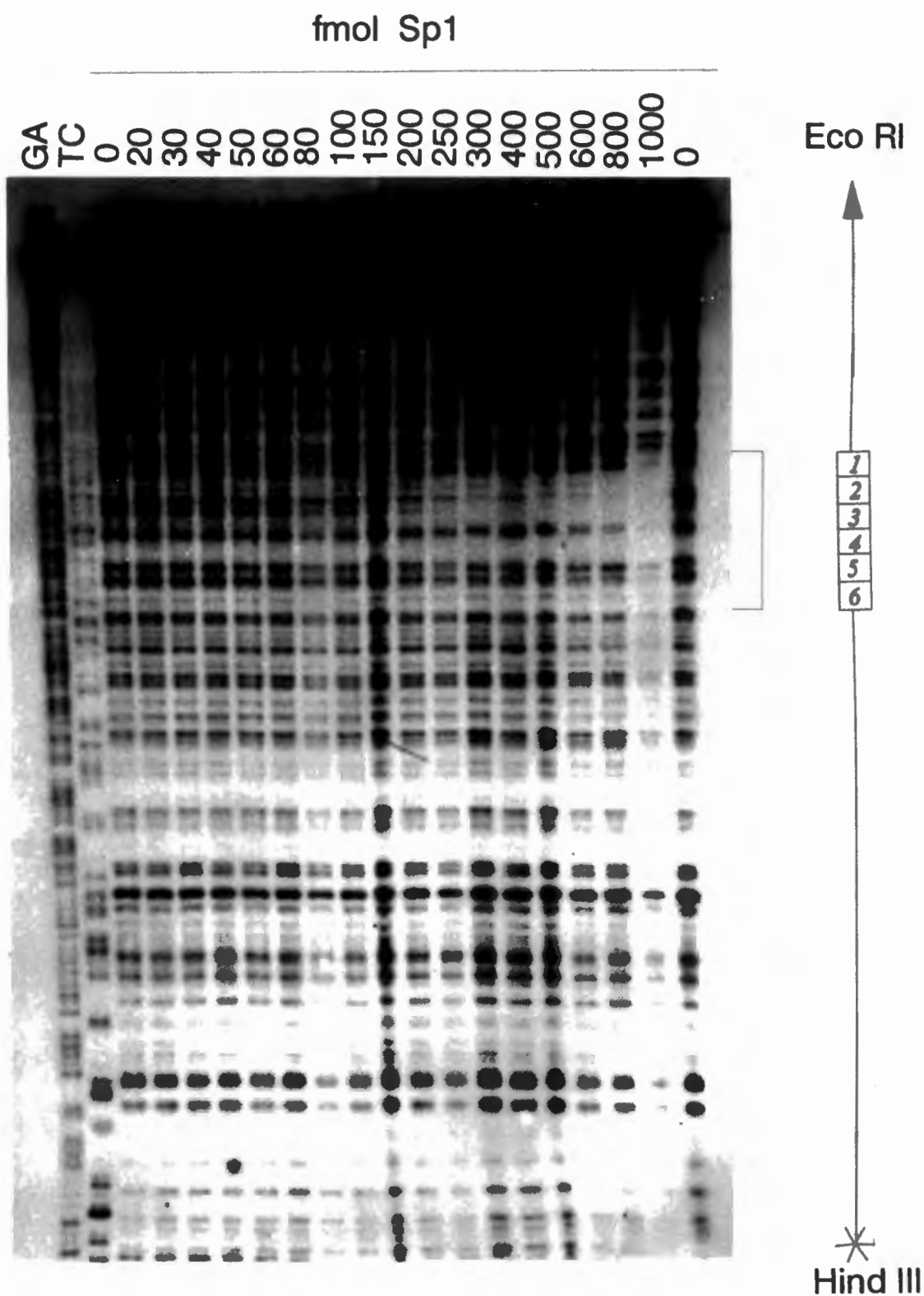
7.3.1 BINDINGSAFFINITEITE VAN SP1

'n Aanvanklike Sp1-konsentrasiereeks is tydens DNase I-afskermingsanalise in Figure 7.12 en 7.13 gebruik sodat 'n geskikte konsentrasiereeks vir kwantitatiewe analise bepaal kan word. Vir hierdie doel is weer van die "standaard" SV40-DNA gebruik gemaak. In Figuur 7.12 word die DNase I-afskermingsanalise van die 308 bp Eco RI - Hind III koderende DNA-string gegee. Die Sp1-konsentrasie is tussen 0 en 350 fmol proteïen gewissel soos aangetoon in die figuur, waar 300 fmol gelykstaande is aan 1 μ l Sp1 (30 ng/ μ l). Die DNA is tesame met Maxam en Gilbert-volgordebepalings op 'n 8% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Afskerming deur Sp1 is vanaf 50 fmol Sp1 waargeneem en meer volledig vanaf 150 fmol. Afskerming in die teenwoordigheid van 300 fmol stem ooreen met die afskerming wat in Figuur 7.3. waargeneem is.

'n Tweede Sp1-konsentrasiereeks is gebruik met die 308 bp Hind III - Eco RI teenoorgestelde DNA-string van SV40. In hierdie konsentrasiereeks is van 'n meer uitgebreide Sp1-konsentrasiereeks tussen 0 en 100 fmol proteïen gebruik gemaak soos aangetoon in Figuur 7.13. Ligte afskerming op die DNA is in die teenwoordigheid van 200 en 250 fmol Sp1 waargeneem, terwyl 'n meer volledige afskermingsgebied vanaf 300 fmol Sp1 waarneembaar is. Die Sp1-konsentrasie hoër as 300 fmol toon geen verandering in die afgeskermde gebied nie. Die afgeskermde Sp1-gebied stem ooreen met dié wat in Figuur 7.3. verkry is.



Figuur 7.12 DNase I-afskermingsanalyse op die SV40 teenoorgestelde string met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie. Die ses verskillende Sp1-bindingsgebiede in die DNA word langs die gel aangetoon.



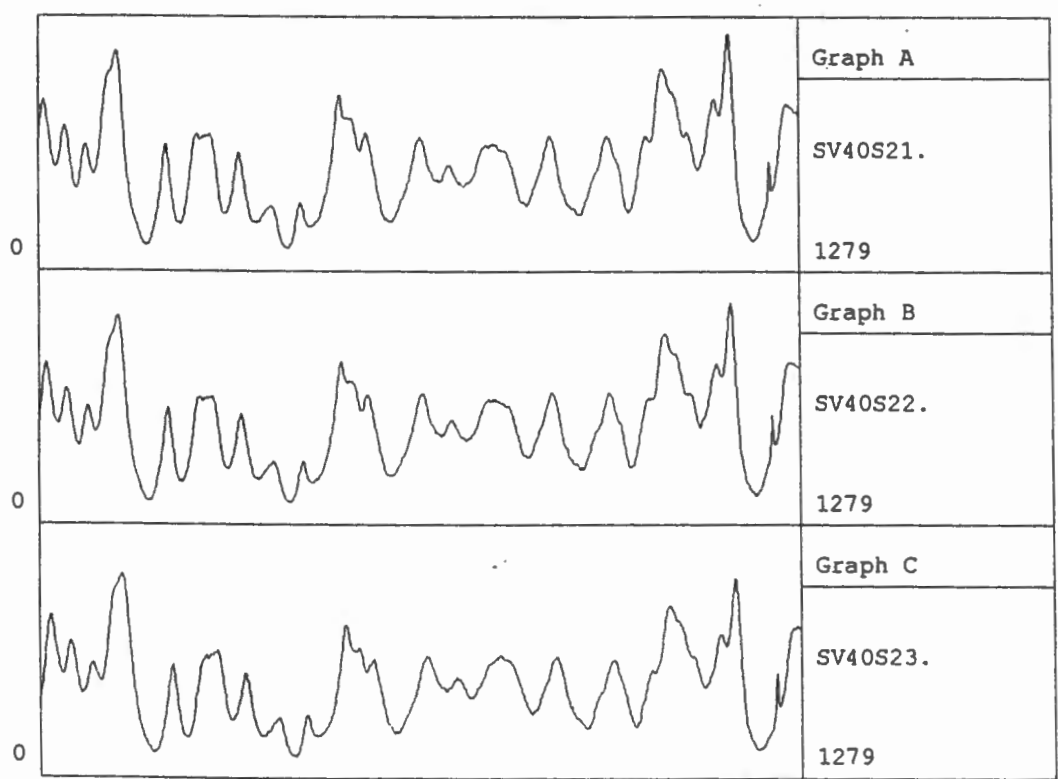
Figuur 7.13 DNase I-afskermingsanalyse op SV40-DNA met toenemende konsentrasie Sp1-proteïen. Die ses verskillende Sp1-bindingsgebiede in die DNA word langs die gel aangetoon.

Kwantifisering van die ses naasliggende Sp1-bindingsgebiede is op twee verskillende wyses uitgevoer, naamlik deur middel van vloeistofsintillasiestelling en deur middel van densitometrie. Bindingskrommes vir elke individuele bindingsgebied kan sodoende bepaal word, waaruit die totale energie van binding bereken kan word. Die vloeistofsintillasieproses behels die volgende: die ontwikkelde X-straalfilm is op die gedroogde gel geposisioneer sodat 'n aanduiding waar die verskillende bane op die gedroogde poli-akrielamiedgel geleë is, verkry kan word. Deur gebruik te maak van die Maxam en Gilbert-volgordebane op die outoradiogram, is die ses Sp1-bindingsgebiede op die gedroogde gel gemerk. 'n Kontrolegebied wat oor dieselfde aantal basepare beskik en waar geen afskerming van die DNA voorkom nie, is ook op die gedroogde gel gemerk. Die verskillende gemerkte blokkies in elke baan is uitgesny waarna by elke gedroogde gelstukkie 3 ml TPP [0,7% (m/v) PPO en 5 mg% (m/v) POPOP in 2,5 l toluen] gevoeg is. Hierna is elke monster aan vloeistofsintillasiespektrometrie vir twee siklusse van 20 minute elk onderwerp. Die agtergrond van elke baan is ook op dieselfde wyse bereken. Die vloeistofsintillasiestellings is verder verwerk deur die vervaltempo van die radioaktiefgemerkte DNA-fragmente sowel as die agtergrondtellings in ag te neem.

In die tweede kwantifiseringsproses is van densitometrie gebruik gemaak. 'n Ligte sowel as donker blootstelling van die ontwikkelde X-straalfilm is aan densitometrie onderwerp wat op 'n Biorad GS300 Transmittance/Reflectance skandeerdensitometer met 'n spleetgrootte van 250 μm uitgevoer is. Hierdie densitometer is verder ook aan 'n rekenaar gekoppel. Groot gedeeltes van die outoradiogram wat die bindingsgebiede sowel as 'n kontrolegebied insluit, is geskandeer. Elke baan op die gel is vir statistiese doeleindes in drie verskillende gebiede geskandeer. Densitometriesse data wat verkry is, is geberg en verder op die rekenaar wat aan die densitometer gekoppel is, verwerk. 'n Spesiaal aangekoopte rekenaarprogram, GS365W Electrophoresis Data System (Hoefer Scientific Instruments) wat met Microsoft^(R) Windows 3.0 funksioneer, is vir die doel gebruik. Deur gebruik te maak van 'n spesiale funksie op hierdie rekenaarprogram is die drie verskillende skanderings van elke baan tot een geïntegreer. 'n Voorbeeld van drie skanderings van een baan word in Figuur 7.14 weergegee.

Na aanpassing van die basislyn is die pieke betrokke by die bindingsgebied sowel as 'n kontrolegebied genommer. Hierna is die waarde van elke piek deur middel van Gaussian-integrasie met behulp van die rekenaarprogram bereken.

Die waardes wat na die vloeistofsintillasiespektrometrie en na die densitometrie verkry is, is verder verwerk sodat die mikroskopiese ewewigsassosiasiekonstante bereken kan word. Hierdie verwerkings is uitgevoer presies soos beskryf is in Ausubel *et al.* (1989) en Brenowitz *et al.* (1986).



Figuur 7.14 Drie skanderings van 'n enkele baan voor integrasie na densitometrie.

Die OD-verhoudings soos wat dit na densitometrie verkry is sowel as die waardes wat na vloeistofsintillasiespektrometrie verkry is, word omgerekend na fraksionele beskerming (f) deur die vergelyking

$$f = 1 - \left[\frac{Dn_{site}/Dn_{std}}{Dr_{site}/Dr_{std}} \right]$$

waar n enige baan is waarin afskerming voorkom en r die verwysingsbaan, dit wil sê die geen-proteïenkontrolle. Deur die data van f teen die logaritme van die proteïenkonsentrasie te plot, word die bindingskromme verkry. 'n Voorbeeld van die ses bindingskrommes van die Sp1-bindingsgebiede van SV40 na berekening van f word in Figuur 7.15 weergegee. Die waargenome f -waardes strek gewoonlik nie van 0 tot 1 nie. Een van die bydraende redes hiervoor is dat breuke wat reeds in die DNA-string voor DNase I-vertering voorkom, nie in berekening gebring is nie. Die kromme wat verkry word, word dan as 'n oorgangskromme beskou wat proporsioneel eweredig is tot die bindingskromme en waarvan beide eindpunte van die kromme dan as veranderlike parameters voorgestel word. Vir 'n enkele bindingsgebied of vir 'n nie-koöperatiewe bindingsgebied word van die Langmuir-isoterm gebruik gemaak. Die Langmuir-isoterm is:

$$Y = \frac{k[P]}{1 + k[P]}$$

Deur van hierdie isoterm gebruik te maak, kan f dan bepaal word deur die vergelyking:

$$f = mx \left[\frac{k[P]}{1 + k[P]} \right] + b$$

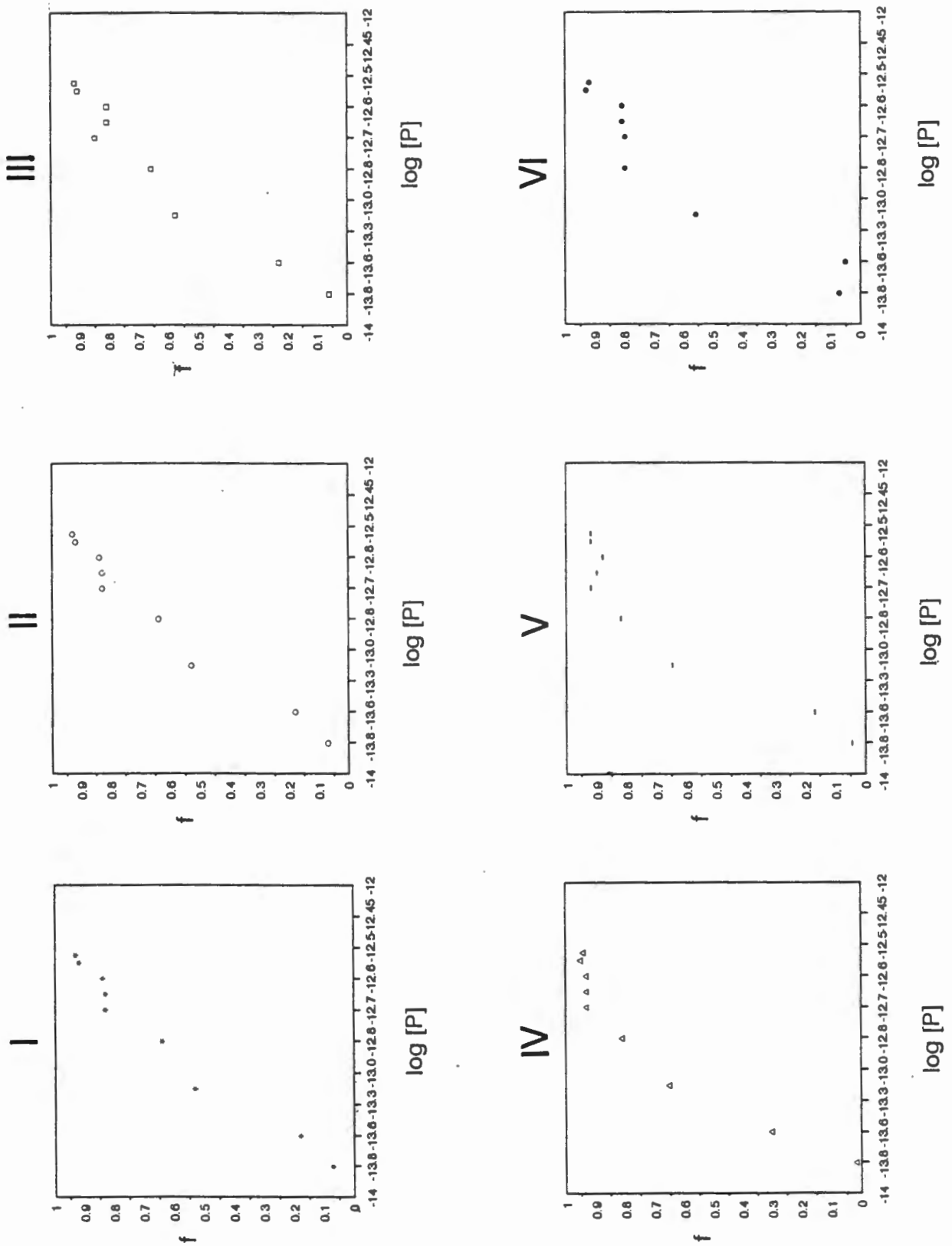
$$\text{waar } m = \frac{1}{u-l}$$

$$\text{en } b = \frac{l}{l-u}$$

[P]	=	proteïenkonsentrasie
u	=	boonste vlak van bindingskromme
l	=	onderste vlak van bindingskromme
k	=	mikroskopiese ewewigsassosiasiekonstante

Die waardes van k , l en u word dan bepaal uit gelyktydige numeriese berekeninge deur van Marquard se nie-lineêre regressie-analise gebruik te maak (Johnson en Frasier, 1985). Hierdie metode is uitgevoer met behulp van die statistiese SAS-rekenaarprogrampakket se NLIN-prosedure op die PU vir CHO IBM 4381 VM/HPO hoofraamrekenaar (SAS Institute Inc., 1985).

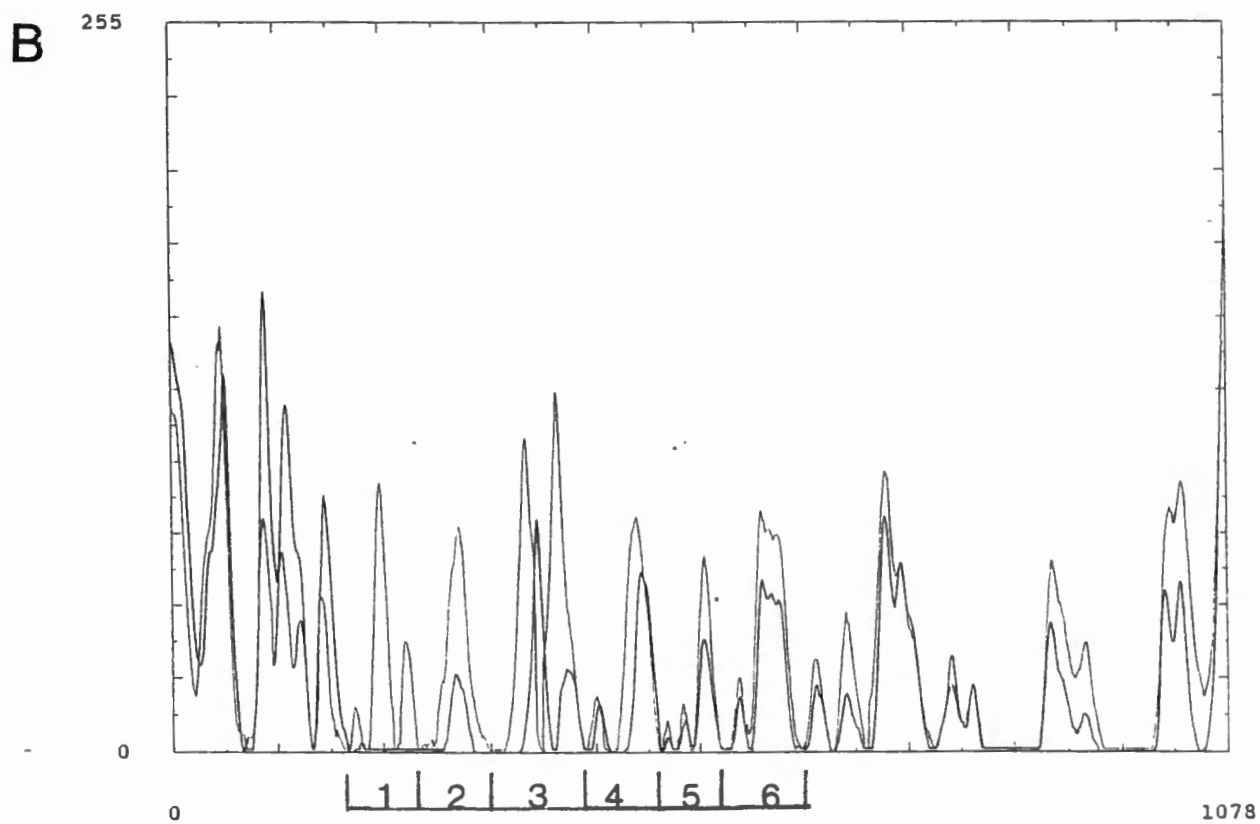
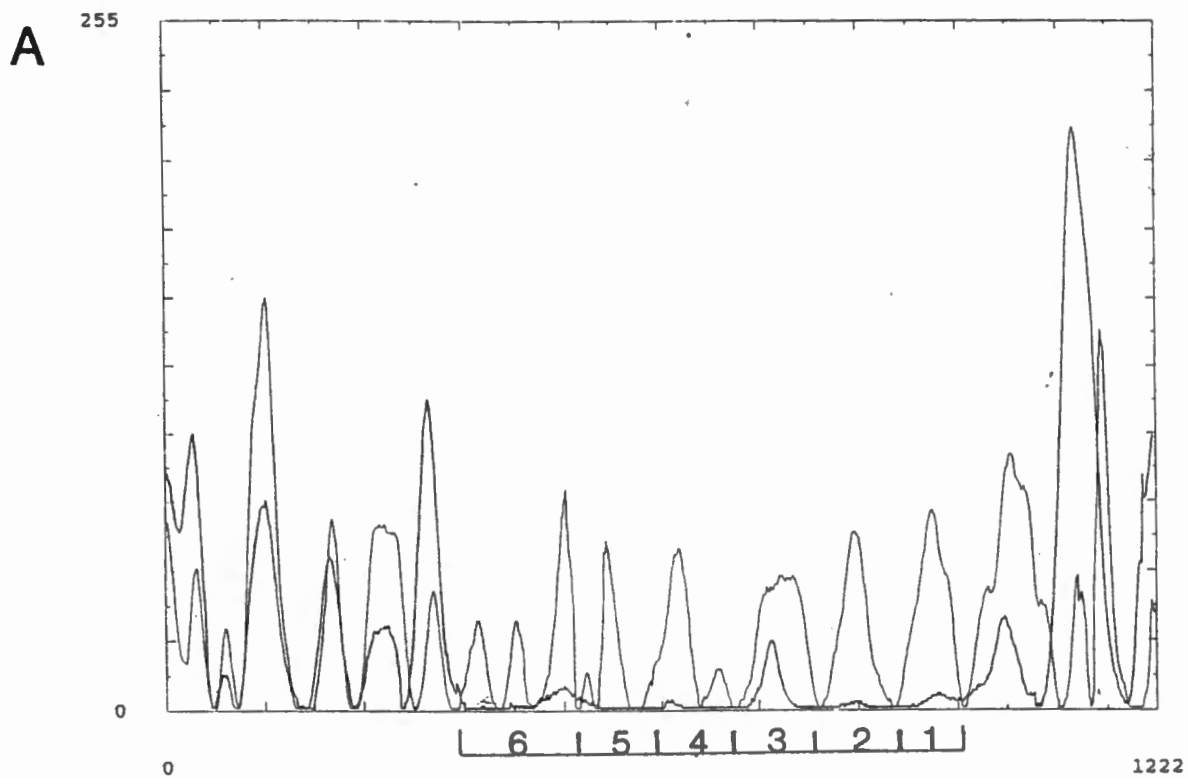
In Figuur 7.16 word die densitometriesse skanderingsprofile soos verkry vanaf die outoradiogramme van die DNase I-afskermingsanalises in Figure 7.12 en 7.13 aangetoon. Paneel A van Figuur 7.16 toon die Sp1-bindingsprofiel op die koderende string van die SV40-DNA (Figuur 7.13) aan, terwyl paneel B van Figuur 7.16 dié van die teenoorgestelde SV40-DNA-string aantoon. In beide gevalle is die twee profile, die profiel van die baan met die hoogste konsentrasie Sp1 bo-op die profiel van die geen-proteïenbaan ("0"-baan) geprojekteer.



Figuur 7.15 Bindingskrommes van Sp1 aan die ses Sp1-bindingsgebiede in pSV40 na berekening van die fraksionele beskerming (f) uit die verkree OD-waardes. Die bindingskrommes is verkry deur f teen die log van die proteïenkonsentrasie, gebruik tydens DNase I-afskermingsanalise, te plot.

Die afname in die pieke en selfs verdwyning van die pieke soos aangedui onder die figure is duidelik uit die projeksies waarneembaar. Hierdie afname of verdwyning van pieke dui op die bindingsgebiede van die Sp1-proteïene. In paneel C van Figuur 7.16 word die berekende K-waardes van die bindingsgebiede in beide rigtings soos bepaal na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie gegee. K_d-waardes is verkry deur die 1/k-waarde te bereken (Letovsky en Dynan, 1989). Die intrinsieke vrye energie van elke individuele bindingsgebied is bereken deur die standaardvergeliking $\Delta G = -nRT \ln k$, waar $n = 1$; $R = 8,31441 \text{ JK}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$; $T = 0^\circ\text{C} = 273,15 \text{ K}$ en k die berekende k-waardes is. Aangesien ΔG -waardes in kcal/mol uitgedruk word, is $1 \text{ cal} = 4,184 \text{ J}$ in berekening gebring. Die temperatuur word as 0°C beskou, aangesien die DNA-proteïeninteraksie tydens DNase I-afskermingsanalises op ys plaasvind.

Die waardes verkry vir SV40 in beide rigtings stem nie baie goed met mekaar ooreen nie. Dit kan daaraan te wyte wees dat die Sp1-konsentrasiereeks by veral die teenoorgestelde string nie breed genoeg was nie en dat die u- en l-waardes te veel geëkstrapoleer moes word. 'n Verdere bydraende faktor tot die lae korrelasie tussen die twee metodes kan daaraan te wyte wees dat tydens die vloeistofsintillasieproses die gelstukkies nie korrek gesny is nie. As daar egter gekyk word na die K_d-waardes en ook ΔG -waardes van die SV40-koderende DNA-string na densitometrie, is dit opvallend dat die K_d-waardes vir bindingsgebiede 1 en 6 laer is as vir die ander bindingsgebiede. Dit kom ooreen met die gegewens uit die literatuur van Jones *et al.* (1986) waar bindingsgebiede 1 en 6 as lae en medium-lae affiniteitsbindingsgebiede aangetoon word. Geen opmerklike verskil tussen medium en hoë affiniteitsbindingsgebiede soos deur Jones *et al.* (1986) aangegee is, kon in hierdie studie vir die ander vier bindingsgebiede waargeneem word nie. Die vrye energiewaardes van al ses Sp1-bindingspunte by die SV40-DNA soos verkry na densitometrie toon geen beduidende verskil nie, wat daarop dui dat die verskillende Sp1-proteïene dieselfde hoeveelheid energie tydens binding gebruik. Die ΔG -waarde van die Sp1-bindingsgebiede daarteenoor, toon by die teenoorgestelde string egter heelwat variasie. Een van die redes vir hierdie verskille kan daaraan te wyte wees dat die konsentrasiereeks nie



SV40 koderende string						
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie			
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	
1. 6,74 x 10 ¹²	1,48 x 10 ⁻¹³	-16,03	7,86 x 10 ¹²	1,28 x 10 ⁻¹³	-16,11	
2. 1,18 x 10 ¹³	8,47 x 10 ⁻¹⁴	-16,33	5,00 x 10 ¹²	2,00 x 10 ⁻¹³	-15,87	
3. 1,40 x 10 ¹³	7,14 x 10 ⁻¹⁴	-16,43	2,79 x 10 ¹³	3,58 x 10 ⁻¹⁴	-16,78	
4. 1,72 x 10 ¹³	5,81 x 10 ⁻¹⁴	-16,54	1,31 x 10 ¹³	7,63 x 10 ⁻¹³	-16,39	
5. 1,56 x 10 ¹³	6,41 x 10 ⁻¹⁴	-16,49	8,33 x 10 ¹²	1,20 x 10 ⁻¹³	-16,14	
6. 9,45 x 10 ¹²	1,06 x 10 ⁻¹³	-16,21	-7,7 x 10 ¹⁰	-1,28 x 10 ⁻¹¹	-	

SV40 teenoorgestelde DNA-string						
1. 2,81 x 10 ¹²	3,55 x 10 ⁻¹³	-15,55	7,64 x 10 ¹¹	1,30 x 10 ⁻¹²	-14,85	
2. 2,51 x 10 ¹¹	3,9 x 10 ⁻¹²	-14,24	6,14 x 10 ¹¹	1,62 x 10 ⁻¹²	-14,73	
3. 9,6 x 10 ¹²	1,04 x 10 ⁻¹³	-16,22	1,11 x 10 ¹²	9,00 x 10 ⁻¹³	-15,05	
4. 3,2 x 10 ¹²	3,12 x 10 ⁻¹³	-15,63	1,47 x 10 ¹²	6,80 x 10 ⁻¹³	-15,20	
5. 1,0 x 10 ¹²	1,00 x 10 ⁻¹²	-15,00	8,15 x 10 ¹¹	1,22 x 10 ⁻¹²	-14,88	
6. 7,78 x 10 ¹¹	1,28 x 10 ⁻¹²	-14,86	1,37 x 10 ¹¹	7,29 x 10 ⁻¹²	-13,91	

iguur 7.16 Densitometriese krommes van beide SV40-stringe om Sp1-bindingsgebiede te identifiseer en te kwantifiseer.

Paneel A toon die densitometriese krommes van SV40 koderende-DNA. Die kromme van die geen-proteienbaan (lig) is geprojekteer oor die kromme van die baan met 350 fmol Sp1-proteien (donker).

Paneel B toon die SV40 teenoorgestelde DNA-string. Die kromme van die geen-proteienbaan (lig) is oor die kromme van die 300 fmol Sp1-proteienbaan (donker) geprojekteer.

In beide panele kan die bindingsgebiede duidelik waargeneem word.

Paneel C toon die mikroskopiese ewewigsassosiasie (K) en disassosiasie (Kd) konstantes verkry tydens vloeistofsintillasiespektrometrie en densitometrie sowel as die vrye Gibbs-energie vir elke individuele bindingsgebied.

breed genoeg was nie sodat daar te min punte beskikbaar was om 'n goeie bindingskromme te verkry.

'n Sp1-proteïenkonsentrasiereeks wat breër gaan as 1 fpu (300 fmol) is voorts op die kollageenfragmente uitgevoer. In Figuur 7.17 en 7.18 word die DNase I-afskermingsanalise van die Eco RV - Pvu II-fragment weergegee. Figuur 7.17 toon die DNase I-afskermingsanalise met die Eco RV - Pvu II koderende string en Figuur 7.18 dié van die teenoorgestelde string. In beide gevalle is die eksperimente uitgevoer in die teenwoordigheid van 'n toenemende konsentrasie Sp1 vanaf 0 tot 1000 fmol-proteïen, waar 1 μ l Sp1 gelykstaande is aan 300 fmol. Hoewel geen Sp1-afskermingsgebiede na DNase I-afskermingsanalise soos weergegee in Figuur 7.4 waargeneem is nie, is 'n konsentrasiereeks nogtans uitgevoer om die moontlikheid van baie lae Sp1-affiniteitsbindingsgebiede te ondersoek. Daar kon egter ten spyte daarvan dat die Sp1-proteïenkonsentrasie tot 1000 fmol proteïen verhoog is, geen afskermingsgebiede op enige van die twee stringe waargeneem word nie. Die densitometrie se profiele van die 1000 fmol-baan en die "0"-baan geprojekteer bo-oorkaas is in paneel B van beide figure weergegee. In Tabel 7.5 is die K-, Kd- en Δ G-waardes bereken nadat densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie uitgevoer is.

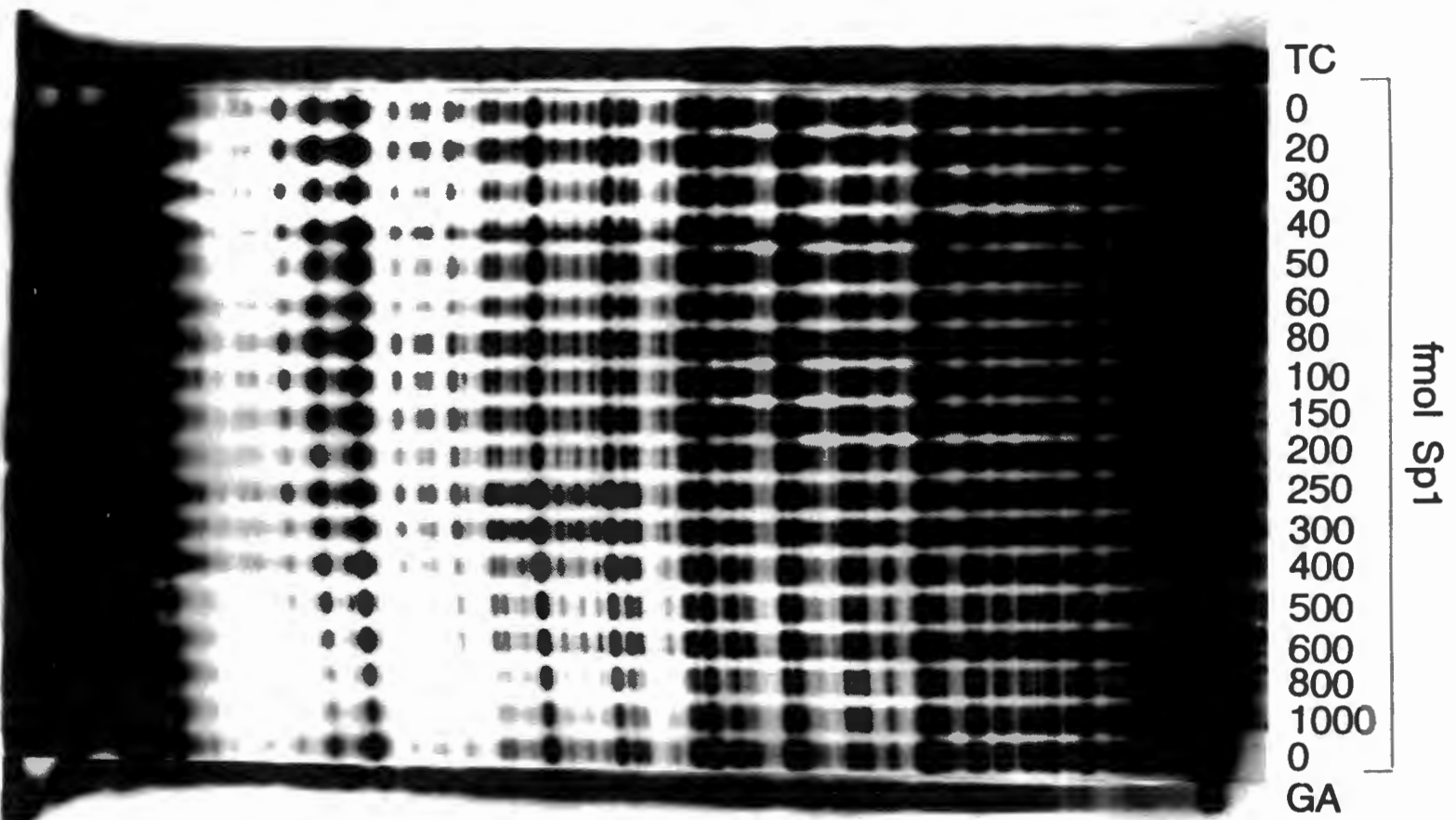
TABEL 7.5 DIE BEREKENDE K-, Kd- EN Δ G-WAARDES VAN SP1 IN DIE Eco RV - Pvu II-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE

Eco RV - Pvu II koderende string					
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie		
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	Δ G (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	Δ G (kcal/mol)
1. -1,54 x 10 ¹²	-6,47 x 10 ⁻¹³	-	-9,7 x 10 ¹⁰	-1,03 x 10 ⁻¹¹	-
Eco RV - Pvu II teenoorgestelde string					
1. -1,17 x 10 ¹²	-8,54 x 10 ⁻¹³	-	-3,4 x 10 ¹¹	-2,92 x 10 ⁻¹²	-

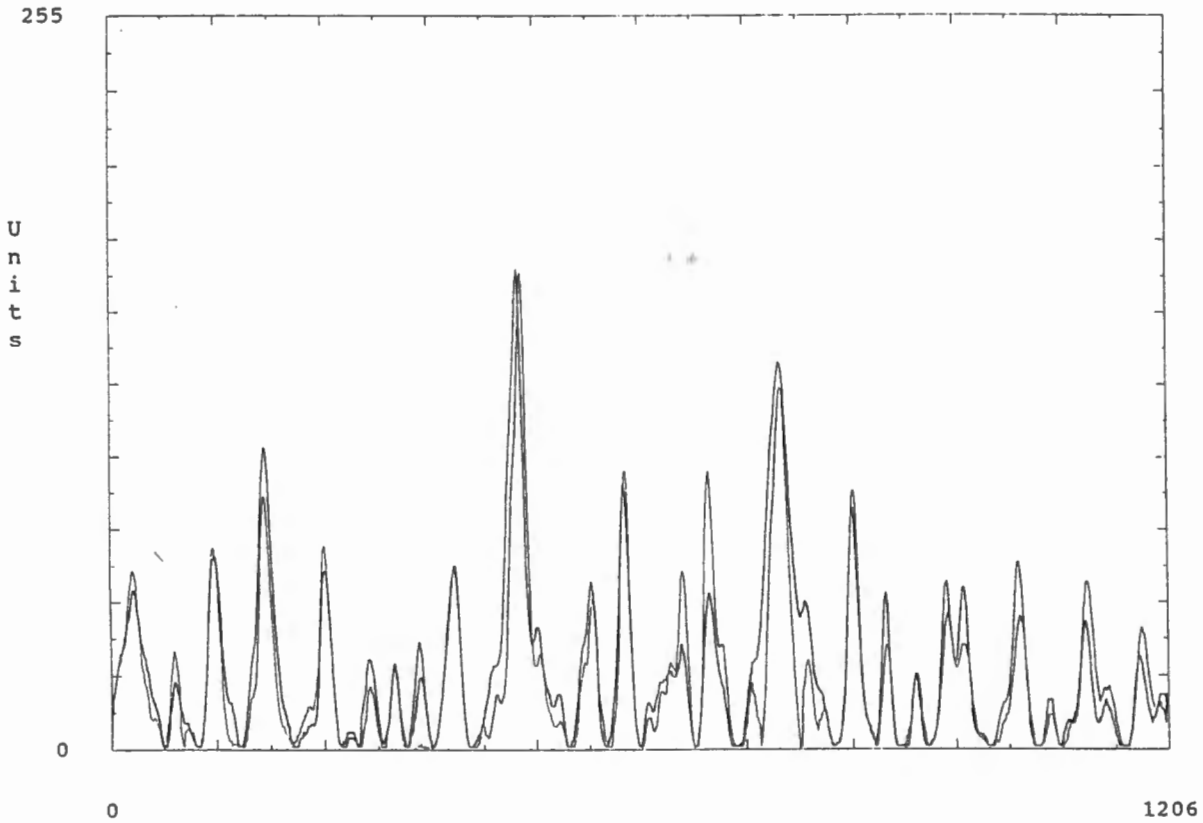
In alle gevalle is beide die K- en Kd-waardes negatief en kon die ΔG -waardes nie bereken word nie. Hierdie negatiewe waardes wat verkry is, is nie net 'n aanduiding dat geen proteïenbinding plaasgevind het nie, maar toon weer eens dat die waargenome f -waardes soos reeds genoem nie van 0 tot 1 strek nie. Onder ideale toestande sou 'n waarde van 0 dus by geen-binding waargeneem moet word. Soos gesien uit Tabel 7.5, is die berekende K-waardes nie 0 nie, aangesien eksperimentele foute sowel as die feit dat breuke in die DNA voor DNase I-vertering voorkom, nie in ag geneem is nie.

In Figure 7.19 en 7.20 word die DNase I-afskermingsanalises van die Cla I - Xba I-fragment weergegee. Toenemende konsentrasie Sp1-proteïen is by die koderende DNA-string (Figuur 7.19) vanaf 0 tot 800 fmol bygevoeg en by die teenoorgestelde DNA-string (Figuur 7.20) vanaf 0 tot 1000 fmol. Tydens die DNase I-afskermingsanalise in Figuur 7.5 is geen binding van Sp1 aan hierdie fragmente waargeneem nie. Soos uit Figure 7.19 en 7.20 waargeneem kan word, het selfs verhoging van die Sp1-proteïen tot 800 en 1000 fmol geen afskermingsgebiede op die DNA aangetoon nie. In paneel B van beide figure is die skanderingsprofiele van die "0"-baan en 800/1000 fmol Sp1-baan na densitometrie aangetoon na projeksie bo-oor mekaar. Ook uit hierdie profiele is dit duidelik dat geen binding van die proteïen verkry word nie. Soos in die geval van die Eco RV - Pvu II-fragment, is die berekende K- en Kd-waardes weer eens negatief, sodat geen ΔG -waardes bereken kon word nie. Die waardes wat na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie verkry is, is in Tabel 7.6 weergegee.

A



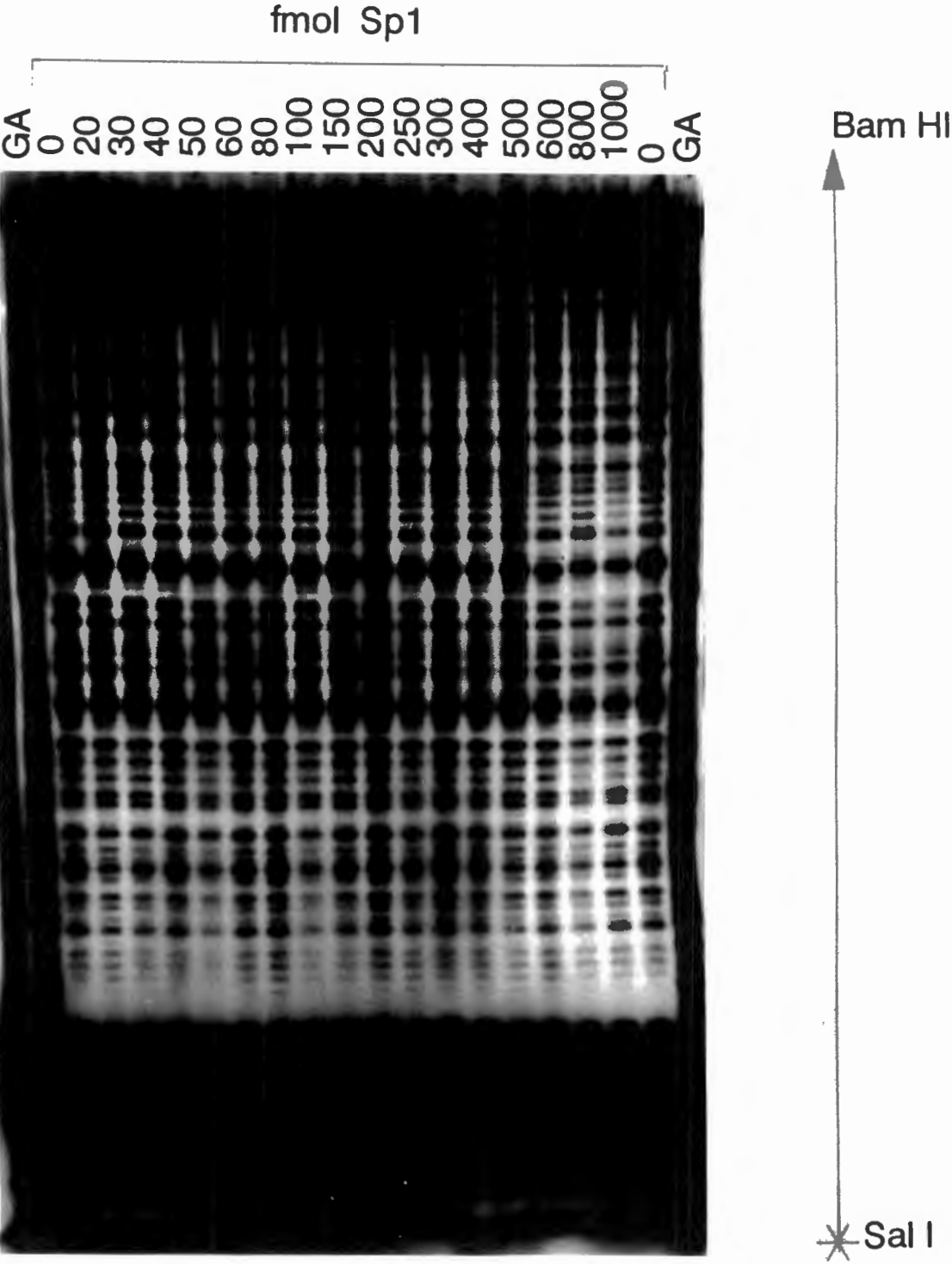
B



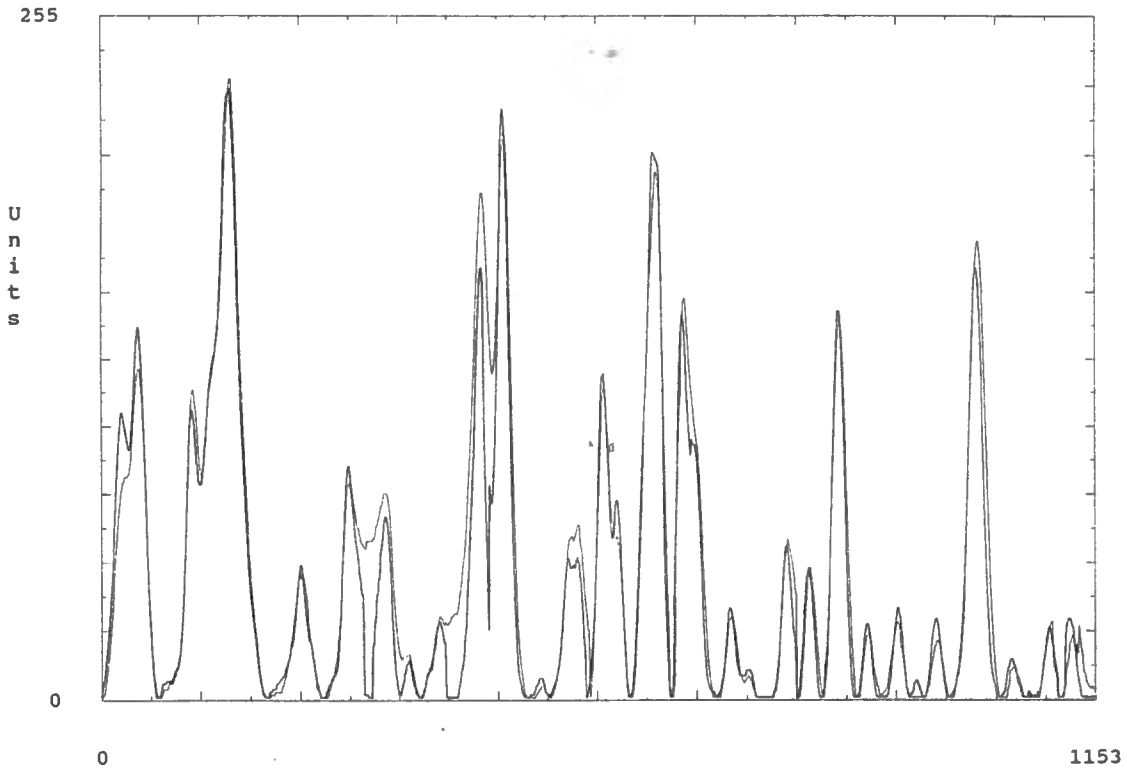
Figuur 7.17 DNase I-afskermingsanalise met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie en die koderende string van die Eco RV - Pvu II-fragment.

- A: Die koderende string van die Eco RV - Pvu II-fragment is 5'-radio-aktief gemerk en tesame met 'n toenemende konsentrasie Sp1, aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgorde-bepalings is saam met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei.
- B: Skanderingsprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1000 fmol Sp1-baan (donker) bo-op mekaar geprojekteer.

A



B



Figuur 7.18 DNase I-afskermingsanalise met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie en die teenoorgestelde Eco RV - Pvu II-fragment.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Eco RV - Pvu II-fragment is tesame met 'n toenemende Sp1-konsentrasie aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei.
- B: Skanderingsprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1000 fmol Sp1-baan (donker) bo-op mekaar geprojekteer.

TABEL 7.6 DIE BEREKENDE K-, Kd- EN Δ G-WAARDES IN SP1 AAN DIE Cla I - Xba I-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE

Cla I - Xba I-koderende DNA-string					
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie		
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	Δ G (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	Δ G (kcal/mol)
1. -2,21 x 10 ¹²	-4,5 x 10 ⁻¹³	-	-1,45 x 10 ¹²	-6,86 x 10 ⁻¹³	-
Cla I - Xba I teenoorgestelde DNA-string					
1. -1,11 x 10 ¹¹	-8,93 x 10 ⁻¹²	-	-2,08 x 10 ¹²	-4,81 x 10 ⁻¹³	-

Afskermingsanalise met die Xba I - Sac I-kollageenfragment in beide rigtings in die teenwoordigheid van 'n toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie toon geen afskermingsgebiede nie. Hierdie resultaat is in ooreenstemming met die resultaat verkry in Figuur 7.6. Selfs die teenwoordigheid van 1000 fmol Sp1 by die koderende string (Figuur 7.21) en 1000 fmol Sp1 by die teenoorgestelde DNA-string (Figuur 7.22) kon geen afskermingsgebiede aantoon nie. Die densitometriese skandeerprofiele van onderskeidelik die "0"-baan en die baan met die hoogste konsentrasie Sp1, is bo-op mekaar geprojekteer (paneel B van Figure 7.21 en 7.22). Ook uit hierdie profiele kan geen afskermingsgebiede vir Sp1 geïdentifiseer word nie. Soos met die vorige twee fragmente, is weer eens negatiewe K-waardes verkry. Die negatiewe K- en Kd-waardes is 'n verdere aanduiding dat geen binding van proteïene aan die DNA plaasgevind het nie. Soos reeds genoem, is die waardes negatief en nie 0 nie as gevolg van eksperimentele foute asook breuke wat reeds in die DNA voorgekom het en nie in ag geneem is nie. Die berekende waardes is in Tabel 7.7 aangetoon.

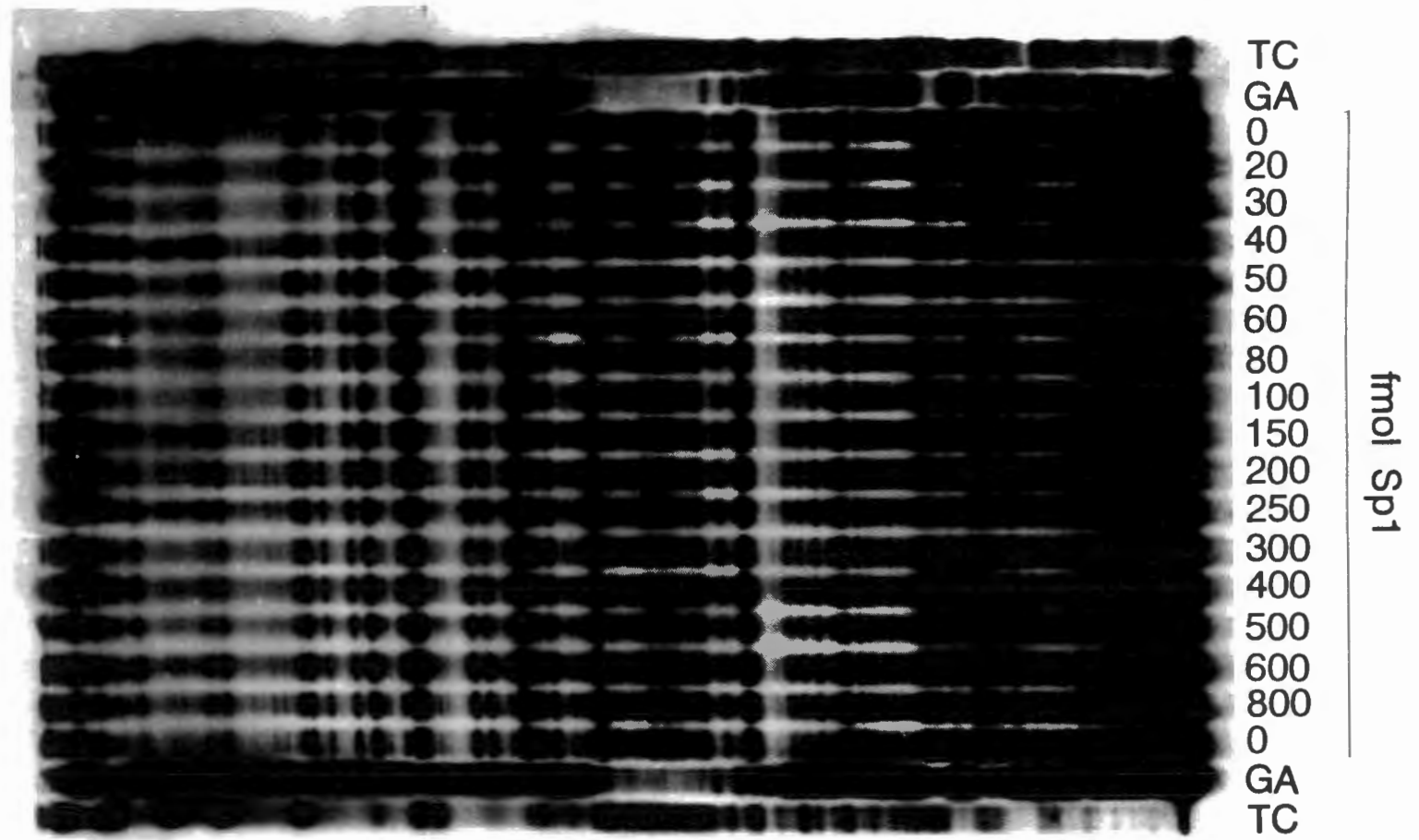
TABEL 7.7 DIE BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG-WAARDES VAN SP1 IN DIE Xba I - Sac I-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE

Xba I - Sac I-koderende DNA-string					
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie		
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)
1. -6,30 x 10 ¹²	-1,58 x 10 ⁻¹³	-	-7,45 x 10 ¹¹	-1,34 x 10 ⁻¹²	-
Xba I - Sac I teenoorgestelde DNA-string					
1. -2,27 x 10 ¹²	-4,4 x 10 ⁻¹³	-	-4,6 x 10 ¹²	-2,14 x 10 ⁻¹³	-

Fragment Sma I - Sma I toon twee afskermingsgebiede in die teenwoordigheid van Sp1 tydens DNase I-afskermingsanalise (Figuur 7.7). Hierdie resultaat is ook tydens toenemende Sp1-konsentrasie waargeneem (Figuur 7.23 en Figuur 7.24) Soos gesien kan word uit die resultate in Figure 7.23 en 7.24, word die twee Sp1-afskermingsgebiede op die koderende string vanaf 300 fmol waargeneem. Op die teenoorgestelde DNA-string word afskerming reeds vanaf 150 fmol uit bindingsgebied 2 en vanaf 200 fmol vir bindingsgebied 1 waargeneem.

Die verskil van begin van afskerming tussen ooreenstemmende bindingsgebiede tussen die twee stringe kan daaraan te wyte wees dat die DNA-konsentrasie van die twee stringe nie ekwivalent was nie (Afdeling 3.3). Die afskermingsgebiede op die koderende string is ook hoër in die gel geleë en baie nader aan mekaar en nie so uitgesprei soos in die geval van die teenoorgestelde string nie wat 'n moontlike verdere bydrae lewer tot die verskil in afskerming. Die afskermingsgebiede kom ook ooreen met die twee gebiede wat reeds in Figuur 7.7 geïdentifiseer is. Die skanderingsprofile van die afgeskermde gebiede is in paneel B langs die gel aangetoon. In beide gevalle kan die afname in die pieke duidelik vir altwee stringe waargeneem word.

A



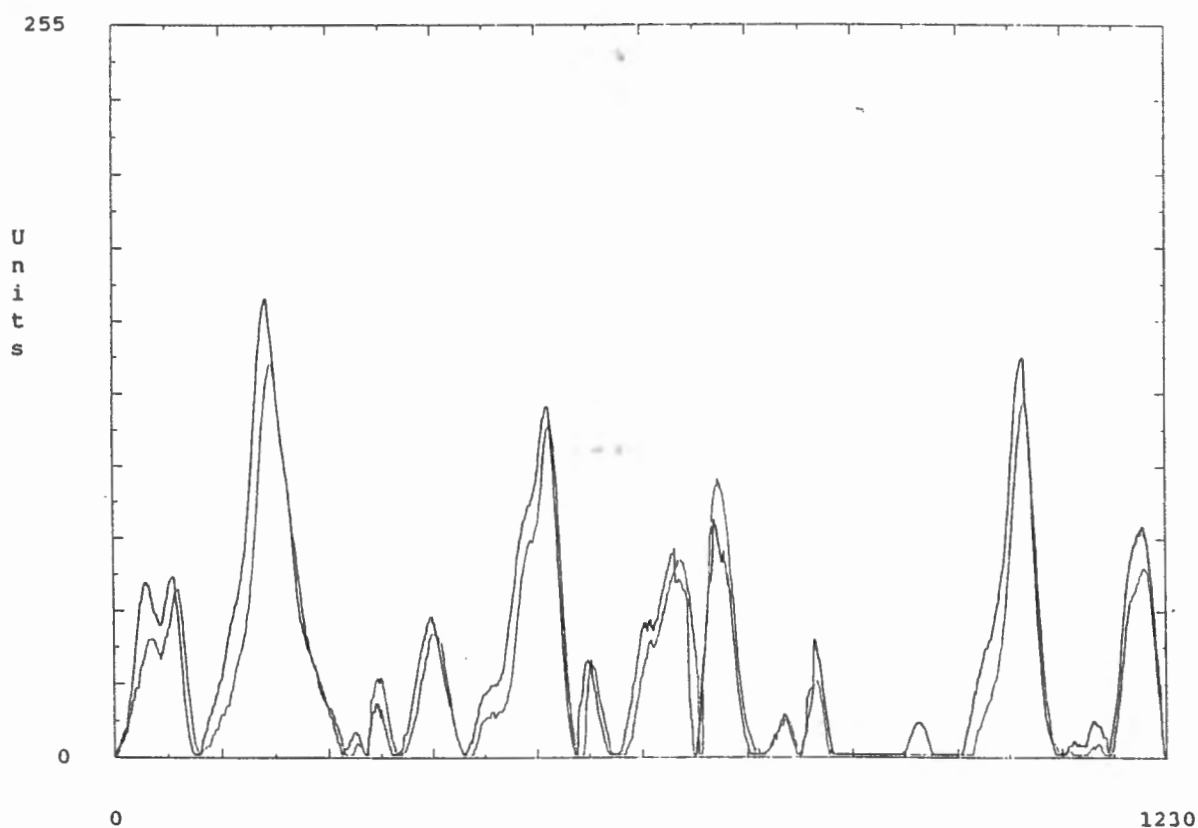
fmol Sp1

TC
GA
0
20
30
40
50
60
80
100
150
200
250
300
400
500
600
800
0
GA
TC

Bam HI

Sal I

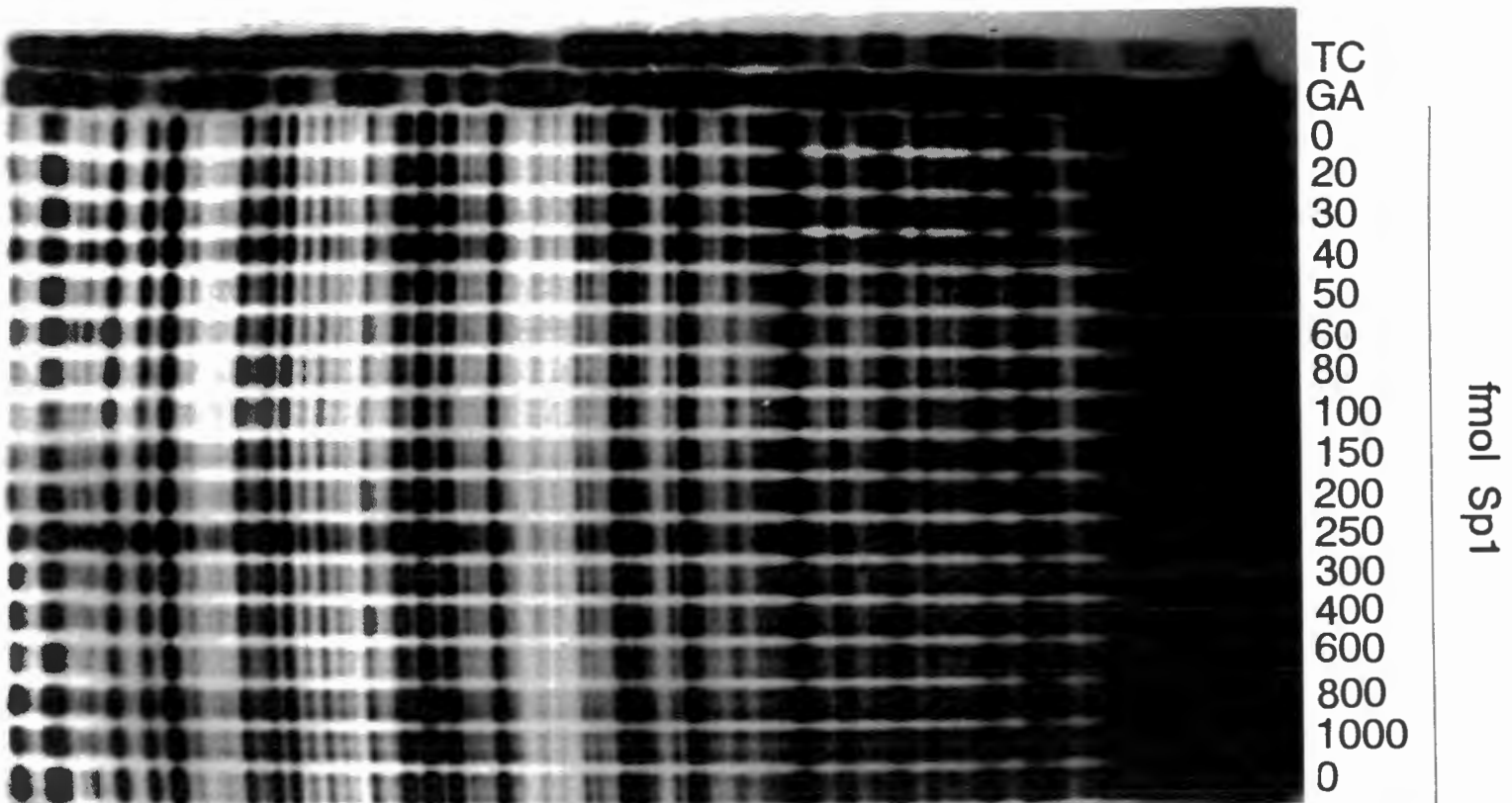
B



Figuur 7.19 DNase I-afskermingsanalyse met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie en die koderende Cla I - Xba I-fragment.

- A: Die koderende DNA-string van die Cla I - Xba I-kollageenfragment is met toenemende konsentrasie Sp1 aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei.
- B: Skanderingsprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 800 fmol Sp1-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer.

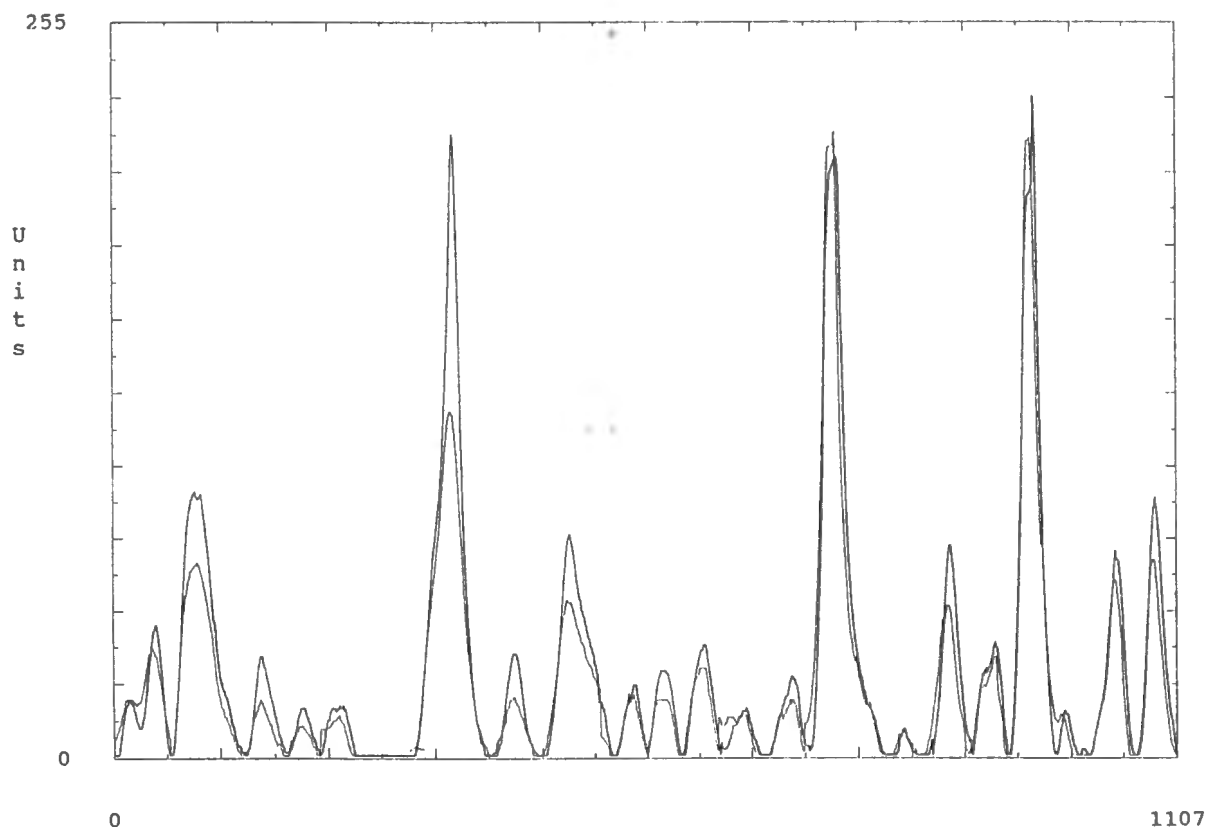
A



Sal I

Eco RI

B

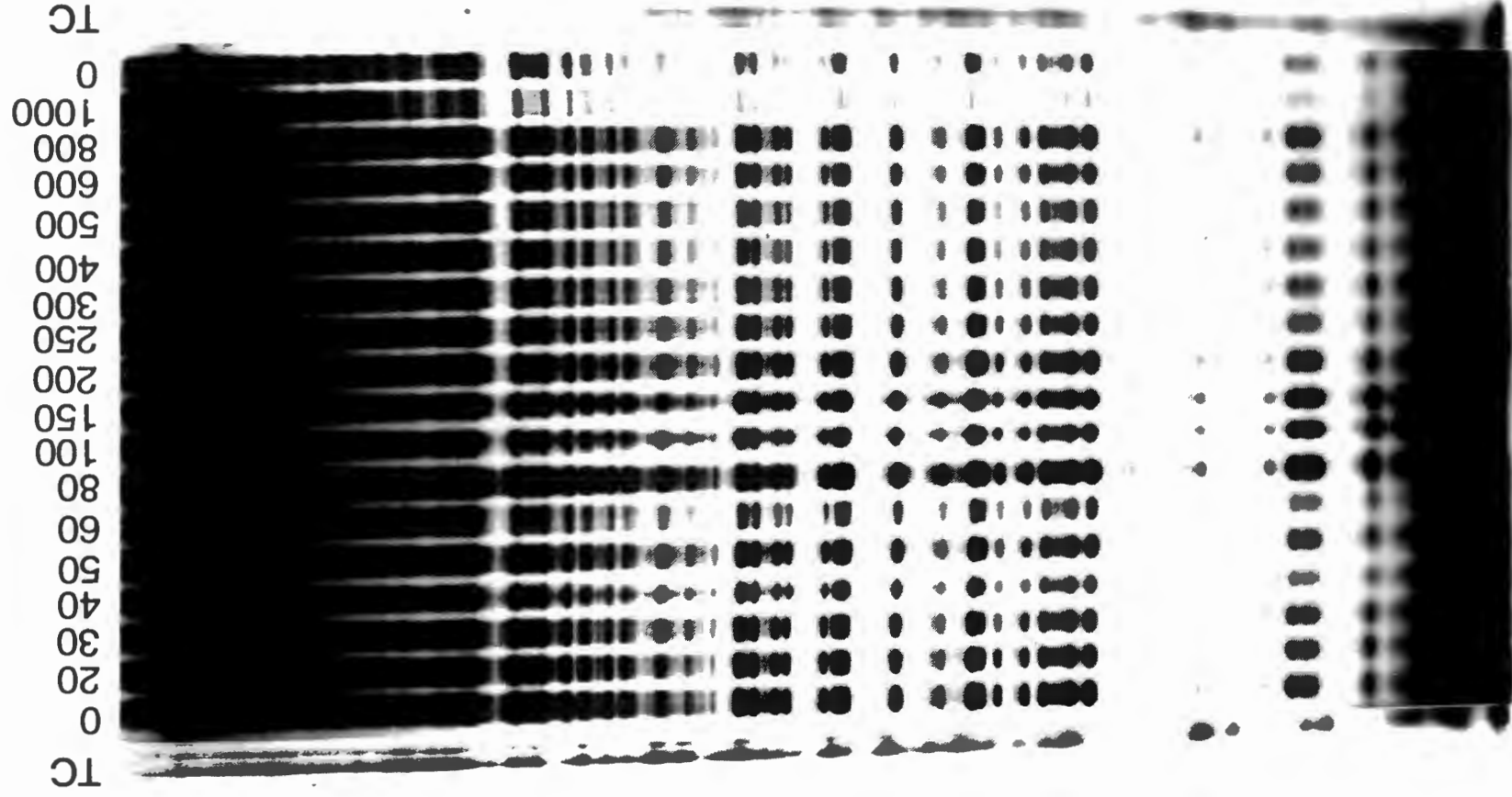


Figuur 7.20 DNase I-afskermingsanalyse met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie en die teenoorgestelde Cla I - Xba I-fragment.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Cla I - Xba I kollageenfragment is met toenemende Sp1-konsentrasie aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei.
- B: Skanderingsprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1000 fmol Sp1-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer.

A

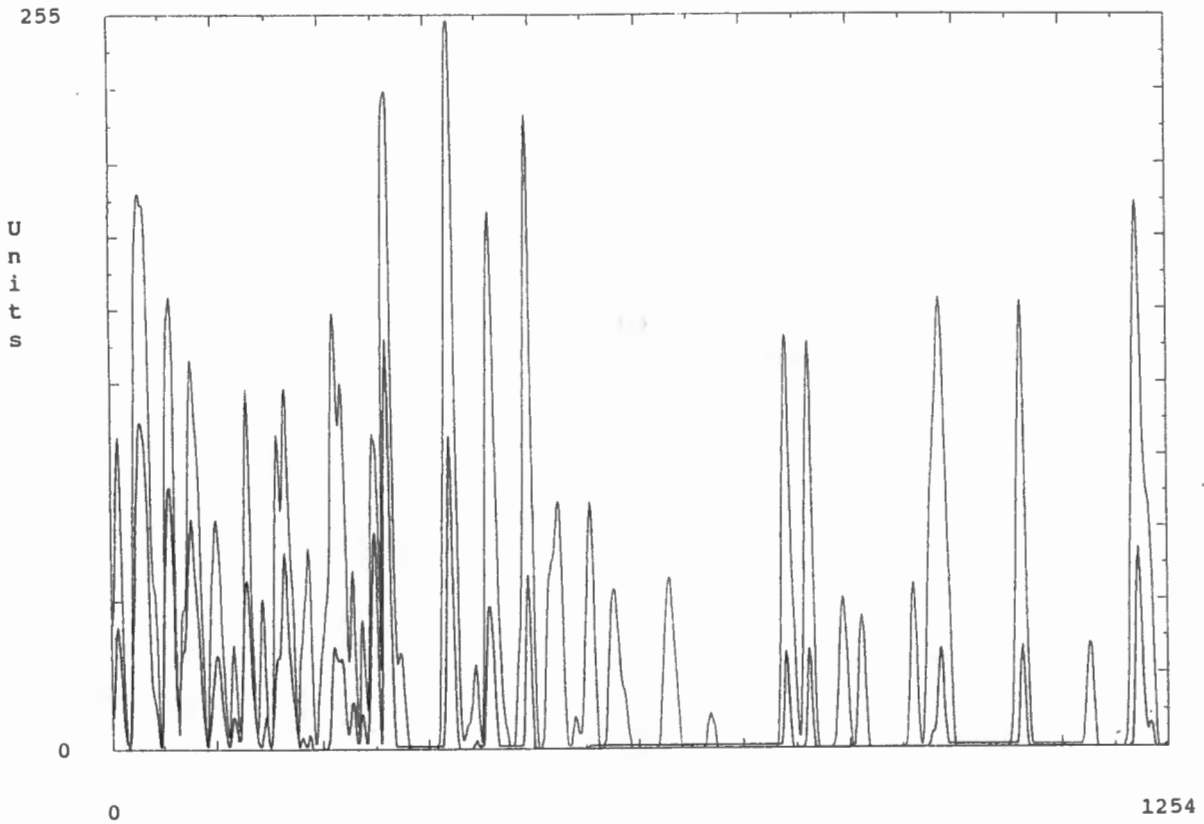
fmol Sp1



Bam HI

Sal I

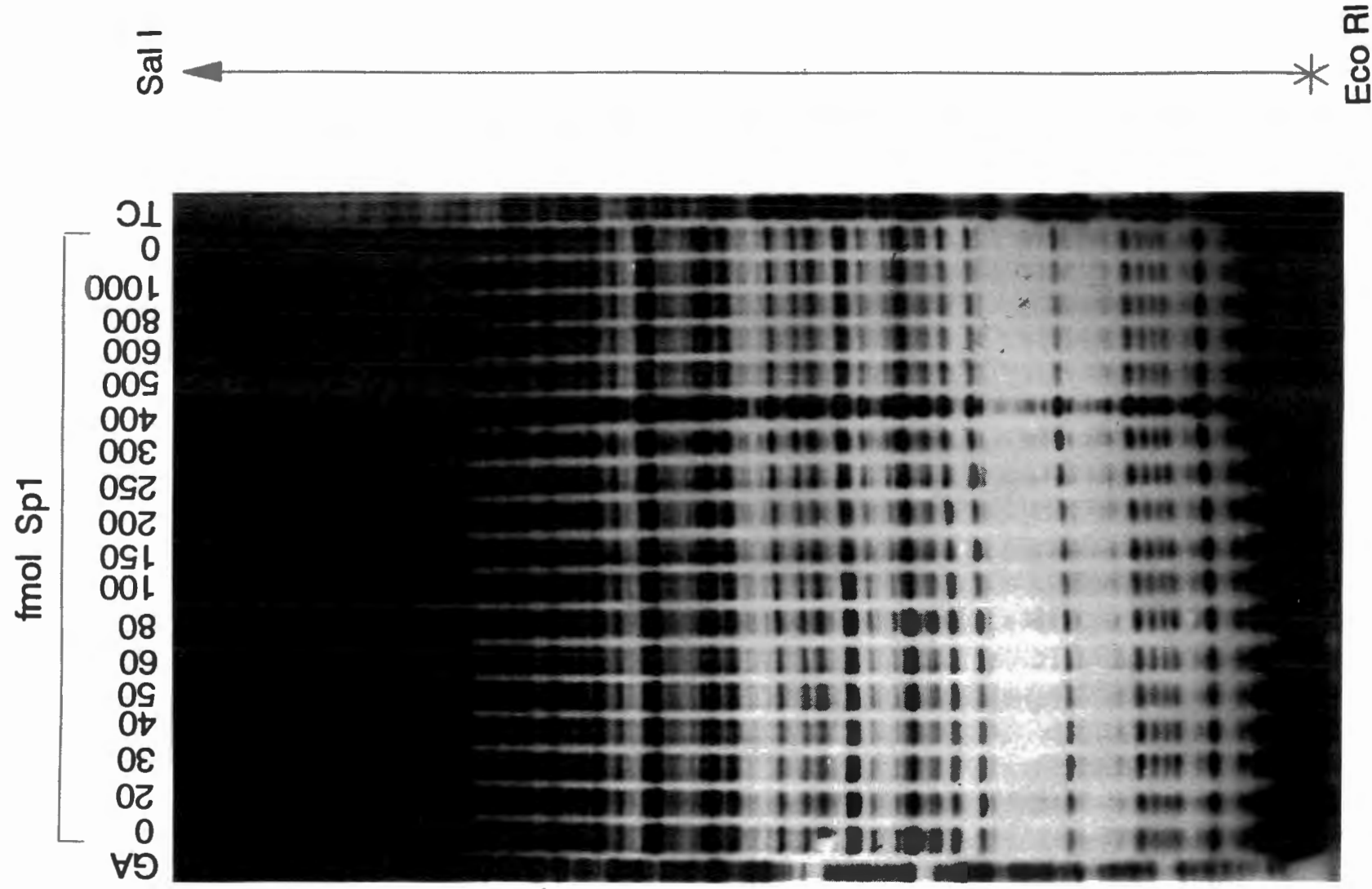
B



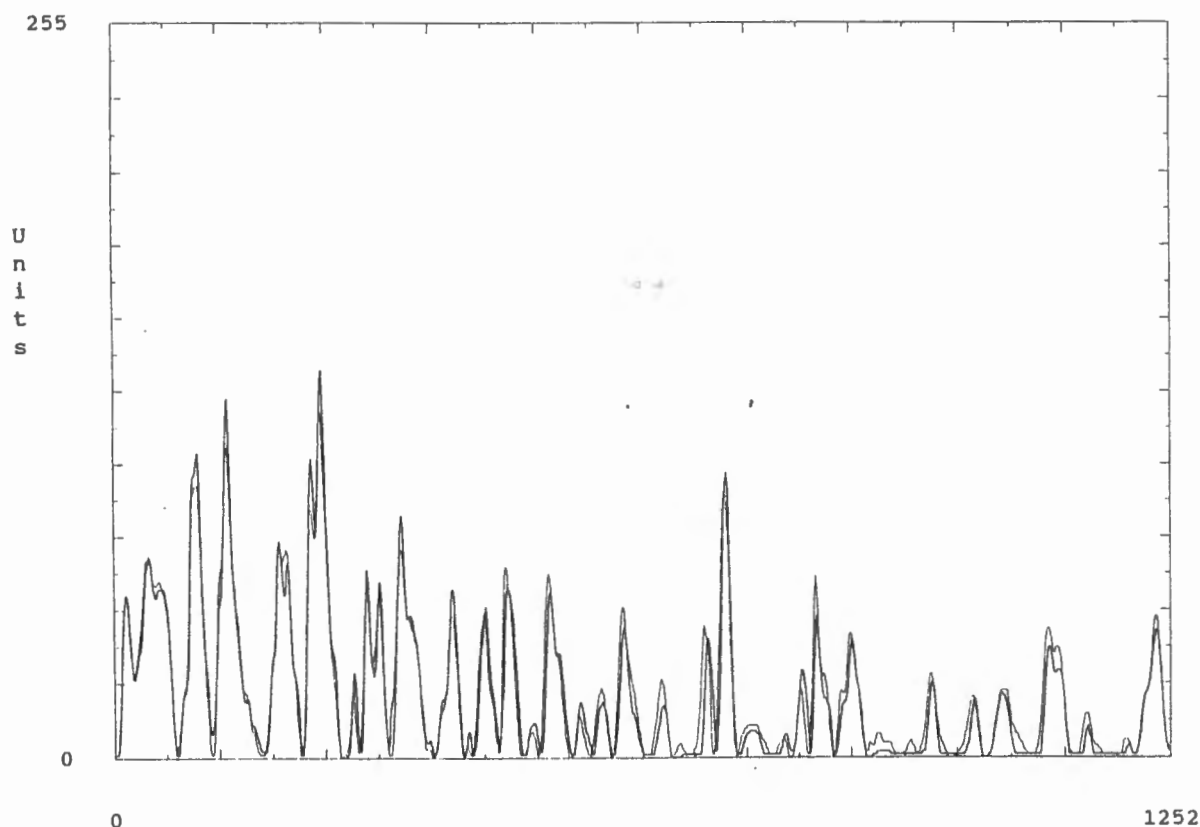
Figuur 7.21 DNase I-afskermingsanalise met koderende Sp1-proteïenkonsentrasie en die koderende Xba I - Sac I-fragment.

- A: Die koderende DNA-string van die Xba I - Sac I-kollageenfragment is met toenemende Sp1 aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepaling is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei.
- B: Skanderingsprofile is na densitometrie van die "0"-baan (lig) en 800 fmol Sp1 baan (donker) bo-op mekaar geprojekteer.

A



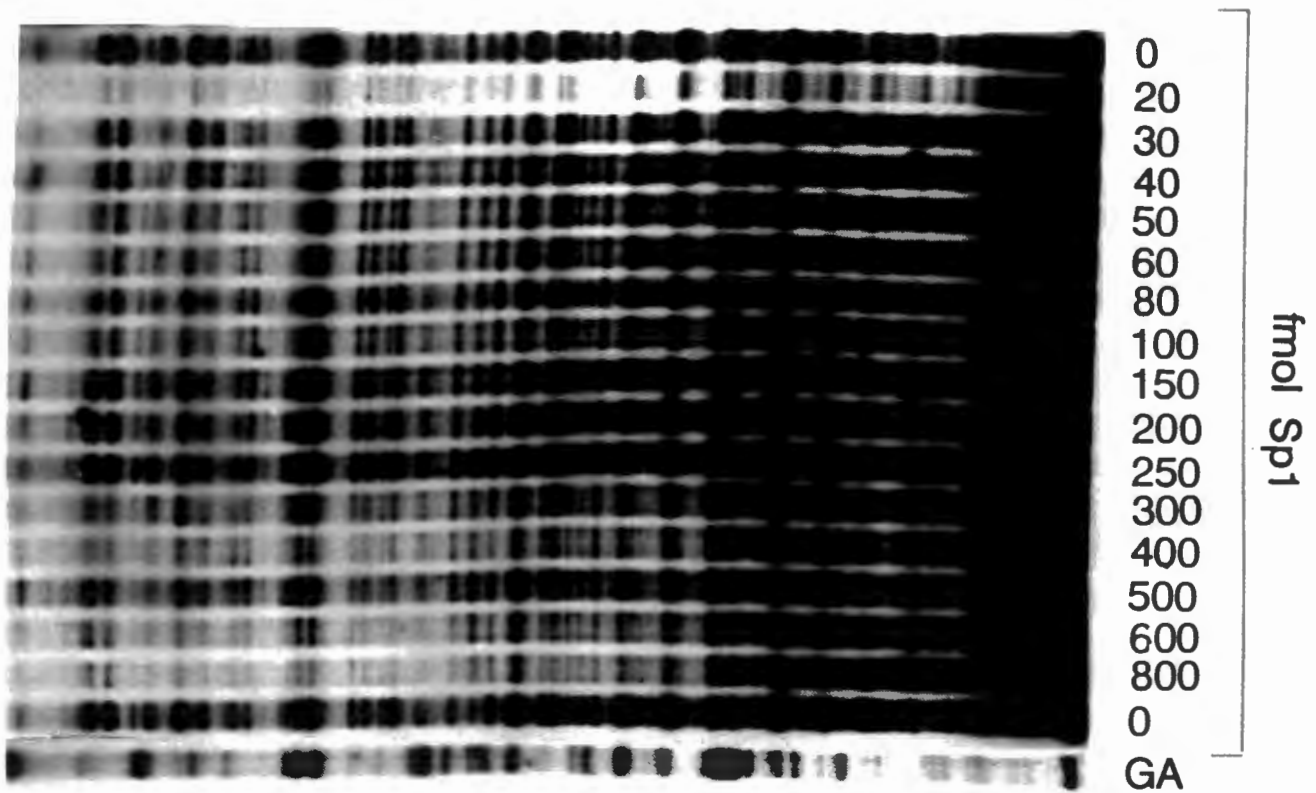
B



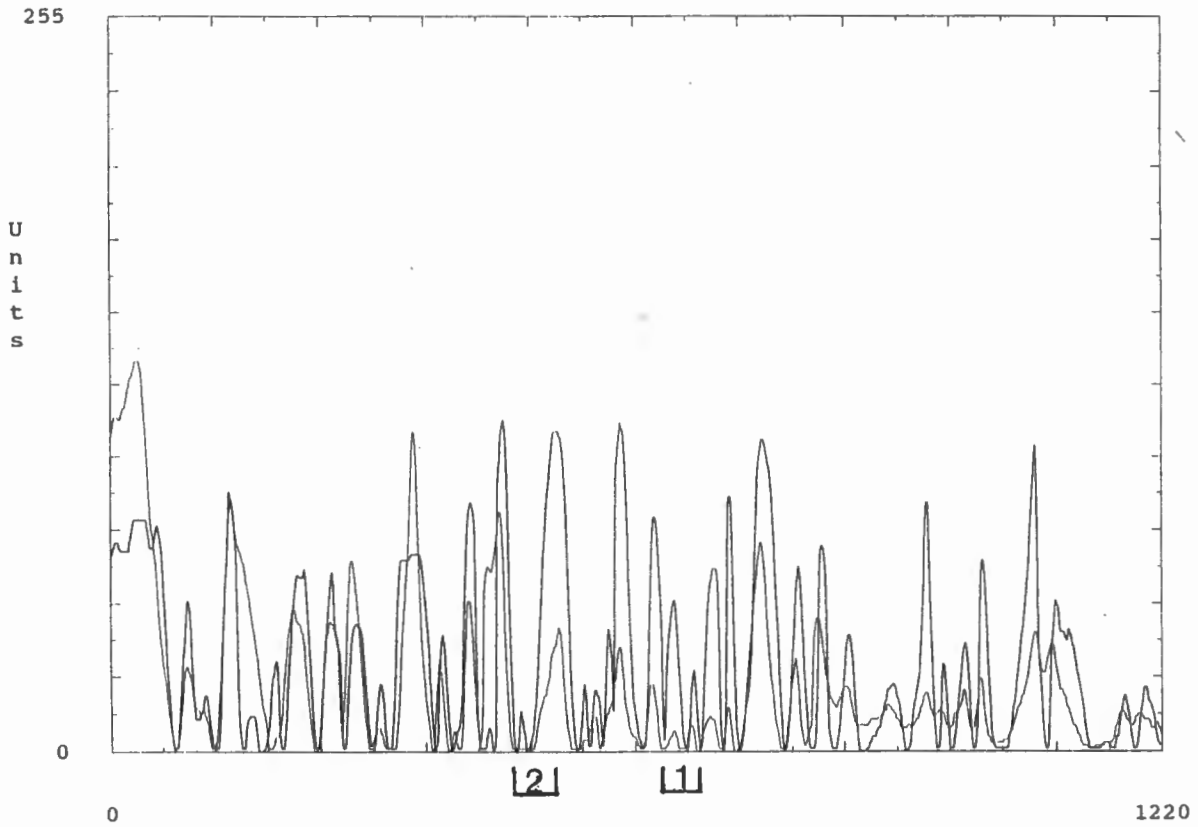
Figuur 7.22 DNase I-afskermingsanalise met toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie en die teenoorgestelde Xba I - Sac I-fragment.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Xba I - Sac I-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van toenemende Sp1 aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei.
- B: Skanderingsprofile na densitometrie is van die "0"-baan (lig) en 1000 fmol Sp1-baan (donker) op mekaar geprojekteer.

A



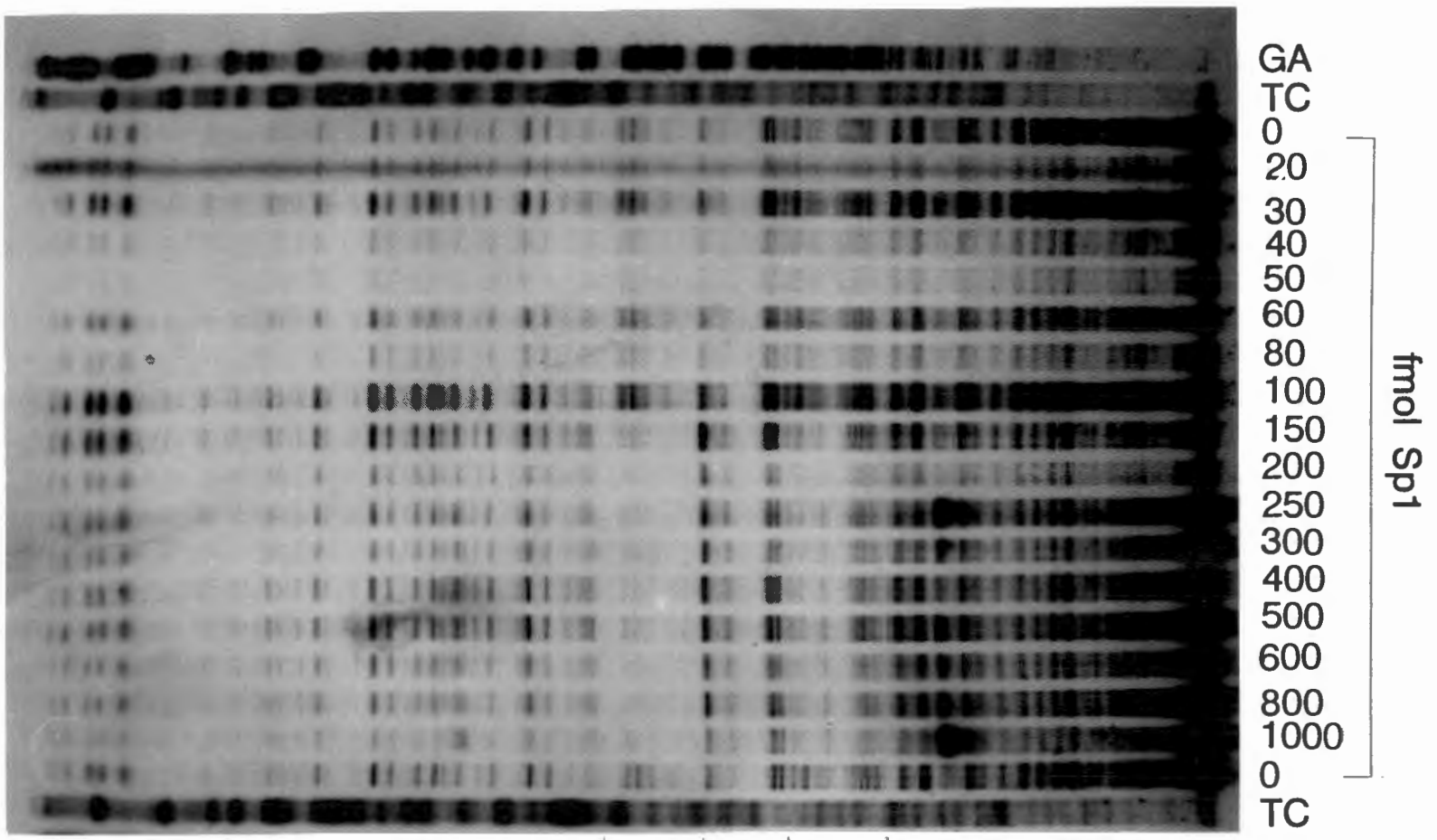
B



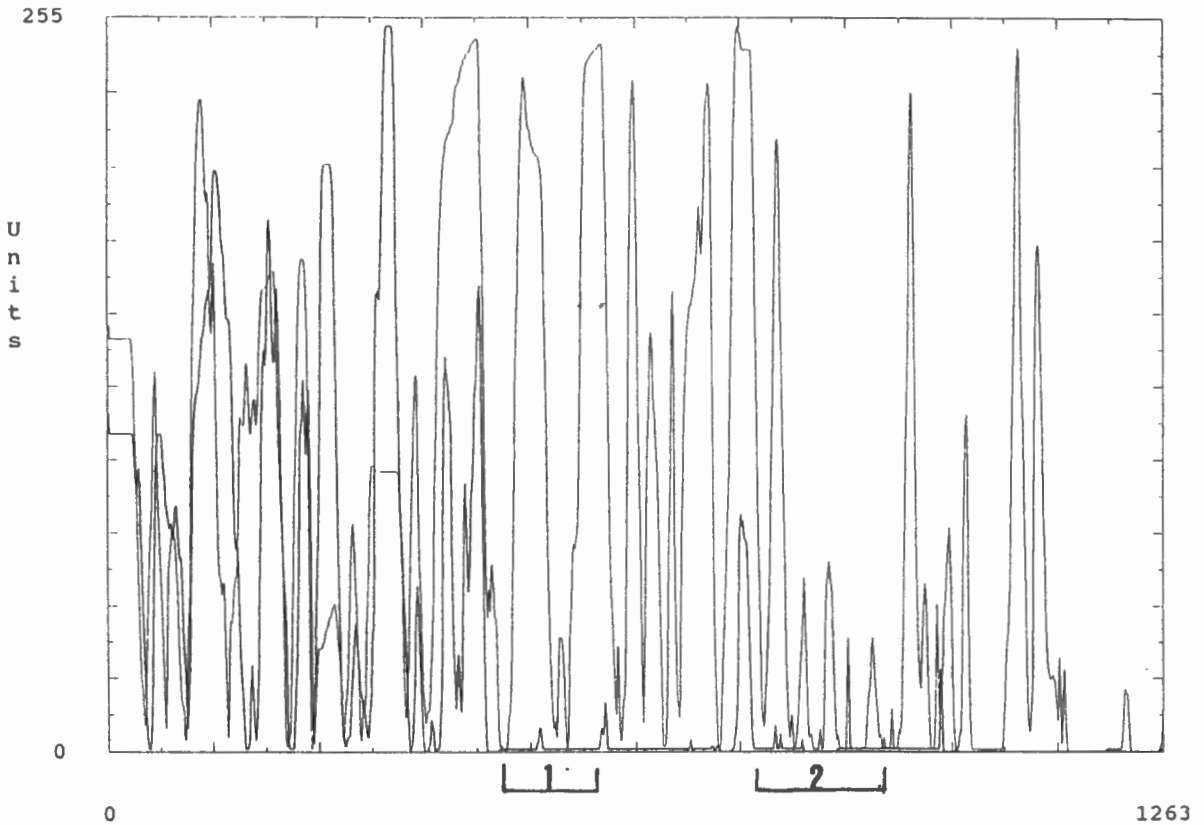
Figuur 7.23 DNase I-afskermingsanalise met die koderende string van die Sma I-fragment in die teenwoordigheid van toenemende Sp1.

- A:** Die koderende DNA-string van die Sma I-fragment is in die teenwoordigheid van toenemende Sp1 aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B:** Skandeerprofile na densitometrie is van die "0"-baan (lig) en die 800 fmol Sp1 baan (donker) bo-op mekaar geprojekteer.

A



B



Figuur 7.24 DNase I-afskermingsanalyse met die teenoorgestelde DNA-string van die Sma I-fragment in die teenwoordigheid van toenemende Sp1.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Sma I-fragment is tesame met toenemende Sp1-proteïene aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepaling is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akriëlamiedgel geskei. Afskermingsgebiede is langs die gel aangetoon.
- B: Skandeerprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1000 fmol Sp1 baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer.

Die K-, Kd- en ΔG -waardes van die twee Sp1-bindingsgebiede is na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie bereken. Die waardes wat verkry is, is in Tabel 7.8 weergegee:

**TABEL 7.8 DIE BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG -WAARDES VAN SP1 BINDINGS-
GEBIEDE IN DIE Sma I-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN
VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

Sma I koderende DNA-string						
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie			
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	
1. 1,44 x 10 ¹²	6,94 x 10 ⁻¹³	-15,19	1,44 x 10 ¹²	6,94 x 10 ⁻¹³	-15,19	
2. 3,13 x 10 ¹³	3,18 x 10 ⁻¹⁴	-16,86	4,48 x 10 ¹²	2,23 x 10 ⁻¹³	-15,81	
Sma I teenoorgestelde DNA-string						
1. 1,83 x 10 ¹²	5,46 x 10 ⁻¹³	-15,32	1,53 x 10 ¹²	6,53 x 10 ⁻¹³	-15,22	
2. 2,35 x 10 ¹³	4,25 x 10 ⁻¹⁴	-16,71	3,44 x 10 ¹²	2,90 x 10 ⁻¹³	-15,67	

Uit die waardes wat in Tabel 7.8 gegee word, wil dit uit die densitometriese berekeninge voorkom asof Sp1-bindingsgebied 2 'n hoër bindingsaffiniteit vir die proteïene het as bindingsgebied 1. Dit kom ook ooreen met Figuur 7.24, waar afskerming reeds vanaf 150 fmol Sp1 vir bindingsgebied 2 waargeneem is, terwyl bindingsgebied 1 eers afskerming vanaf 300 fmol Sp1 vertoon. Die K- en Kd-waardes volgens die vloeistofsintillasiespektrometrie vertoon egter geen verskil tussen die twee bindingspunte nie. Ook die vrye energie toon dieselfde tendens by die twee verskillende metodes.

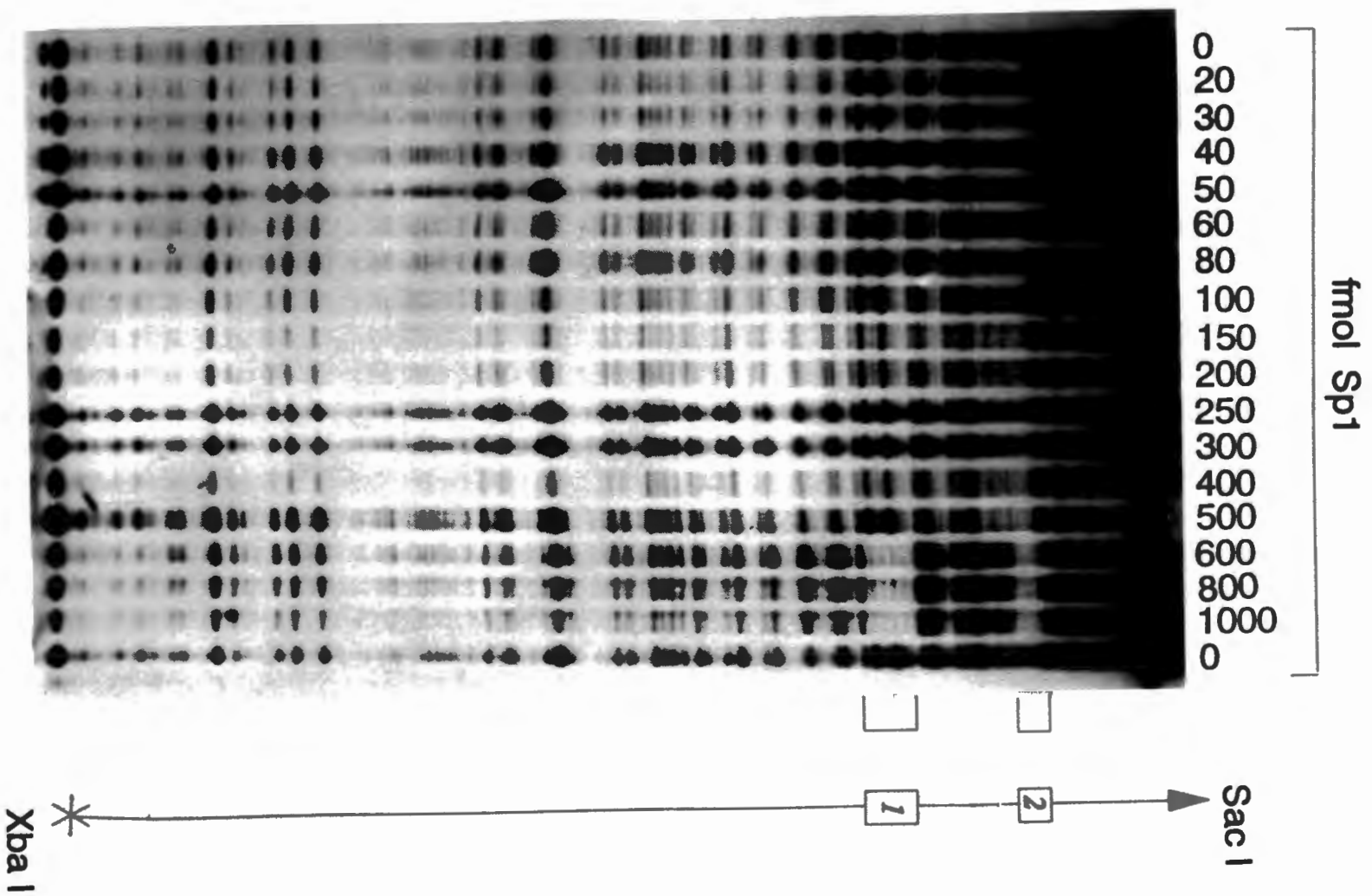
Die DNase I-afskermingsanalise van die Sma I - Rsa I-fragment op beide stringe is in Figuur 7.25 en Figuur 7.26 aangetoon. Sp1-proteïene is in 'n toenemende konsentrasie van 0 tot 1000 fmol in beide gevalle bygevoeg. Twee afskermingsgebiede ooreenkomstig dié in Figuur 7.8 verkry, is waargeneem. Aangesien bindingsgebied 1 uit twee oorvleuelende Sp1-bindingspunte bestaan, is dit moeilik om die K-waardes afsonderlik te bereken.

In hierdie geval is die K-waarde vir die totale afskermingsgebied 1 bereken. Op die koderende string (Figuur 7.25) is afskerming in gebied 1 en 2 vanaf 600 fmol waargeneem, terwyl in die teenoorgestelde DNA-string (Figuur 7.26) afskermingsgebied 1 vanaf 600 fmol en gebied 2 vanaf 300 fmol waargeneem word. Die feit dat die vlakke van afskerming tussen die twee stringe verskil, kan weer eens te wyte wees aan die feit dat die DNA-konsentrasies van die twee stringe nie ekwivalent is nie. 'n Ander probleem wat voorkom, is dat afskerming eers van 600 fmol waargeneem word, terwyl in Figuur 7.9 afskerming al met 300 fmol of 1 fpu verkry is. 'n Moontlike verklaring hiervoor is dat die aktiwiteit van die Sp1 wat vir hierdie spesifieke eksperiment gebruik is, moontlik al verlaag het as gevolg van verskeie eksterne faktore. Hoewel die proteïene verdeel word in kleiner volumes en so min as moontlik gevries en ontvries word, is dit soms onvermydelik dat sekere proteïene twee keer deur die vries/ontvriesproses moet gaan met gevolglike verlies van proteïenaktiwiteit. Skanderingsprofile na densitometrie wat in paneel B van die figure aangetoon word, vertoon duidelik 'n afname in die pieke vanaf die geen-proteïenbaan ("0"-baan) na die baan waar 1000 fmol Sp1 toegevoeg is. Die verskillende K-, Kd- en ΔG -waardes vir die twee afskermingsgebiede is na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie bereken en in Tabel 7.9 weergegee.

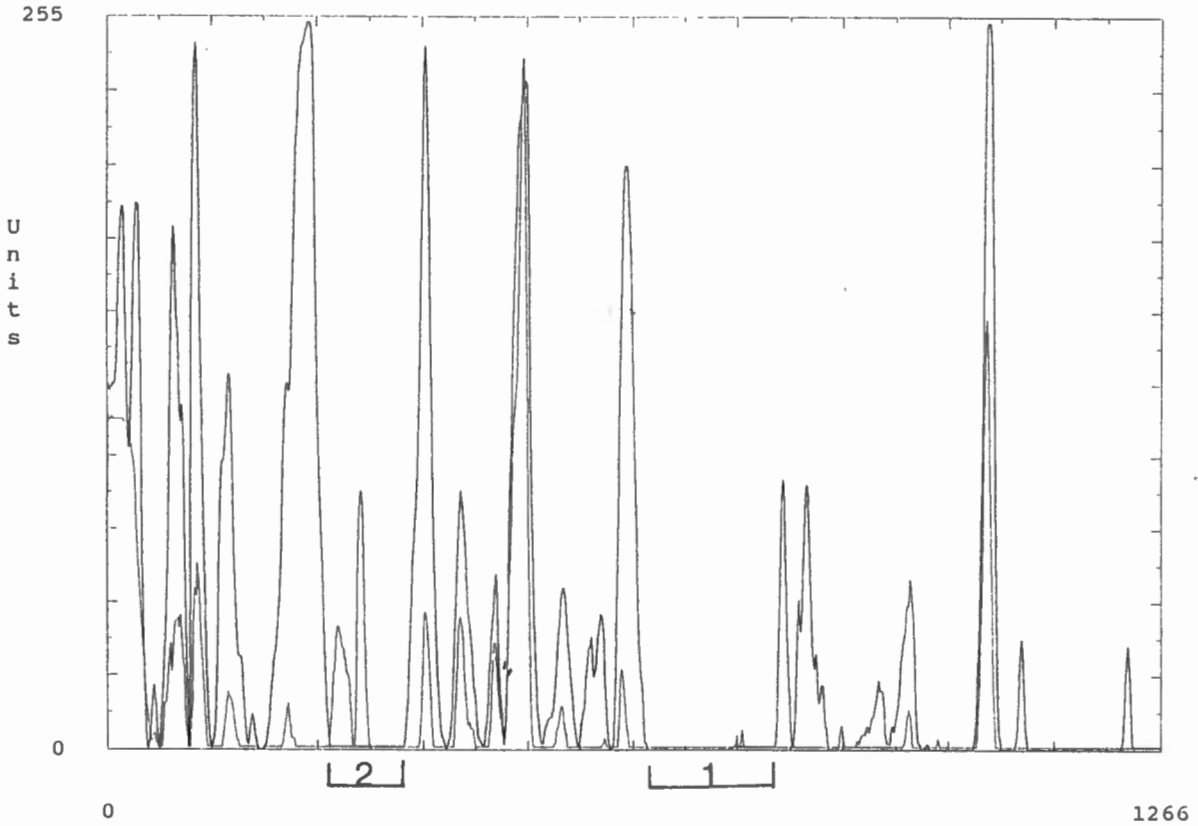
**TABEL 7.9 DIE BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG -WAARDES VAN SP1-BINDINGS-
BIEDE IN DIE Sma I - Rsa I-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN
VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

Sma I - Rsa I-koderende DNA-string						
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie			
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	
1. 1,16 x 10 ¹¹	8,60 x 10 ⁻¹²	-13,82	-4,49 x 10 ¹²	-2,22 x 10 ⁻¹³	-	
2. 3,47 x 10 ¹²	3,88 x 10 ⁻¹³	-15,67	-5,84 x 10 ¹²	-1,71 x 10 ⁻¹³	-	
Sma I - Rsa I teenoorgestelde DNA-string						
1. 1,79 x 10 ¹²	5,58 x 10 ⁻¹³	-15,31	-2,32 x 10 ¹¹	-4,31 x 10 ⁻¹²	-	
2. 6,44 x 10 ¹¹	1,55 x 10 ⁻¹²	-14,76	6,76 x 10 ¹⁰	1,48 x 10 ⁻¹¹	-13,53	

A



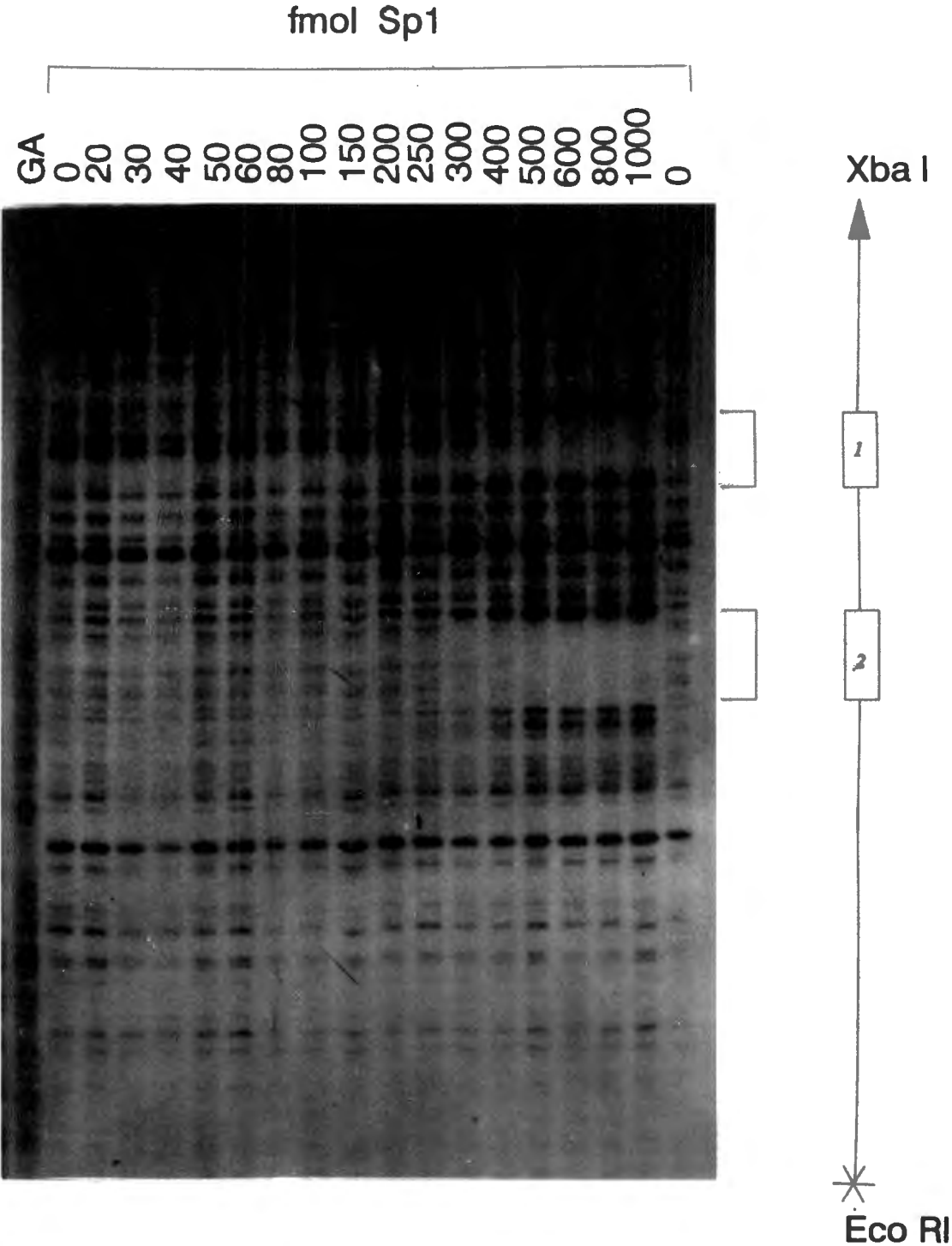
B



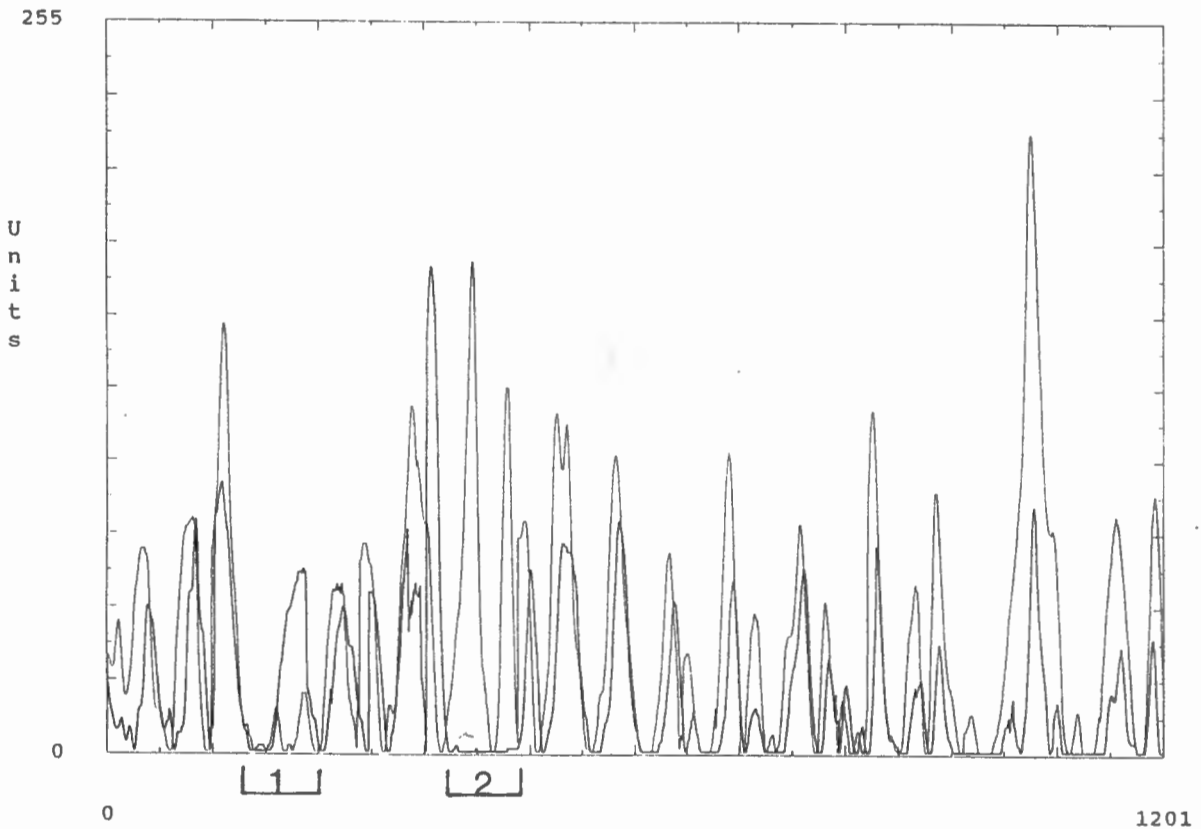
Figuur 7.25 DNase I-afskermingsanalyse met die koderende DNA-string van die Sma I - Rsa I-fragment in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene.

- A: Die koderende DNA-string van die Sma I - Rsa I is in die teenwoordigheid van toenemende Sp1-proteïene aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei. Die twee geïdentifiseerde afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skanderingsprofile van die "0"-baan (lig) en die 1000 fmol Sp1-baan (donker) is na densitometrie bo-op mekaar geprojekteer.

A



B



Figuur 7.26 DNase I-afskermingsanalise met die teenoorgestelde DNA-string van die Sma I - Rsa I-fragment en toenemende Sp1-proteïene.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Sma I - Rsa I- kollageenfragment is in die teenwoordigheid van toenemende Sp1-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei. Die twee geïdentifiseerde bindingsgebiede word langs die gel aange-
toon.
- B: Skanderingsprofiel is van die "0"-baan (lig) en die 1000 fmol Sp1-baan (donker) is na densitometrie bo-op mekaar geprojekteer.

Uit die berekende K-waardes is dit duidelik dat beide bindingsgebiede 'n betreklik lae tot medium bindingsaffiniteit vertoon, veral as die vrye energiewaardes vergelyk word met dié van die ander bindingsgebiede in die vorige figure. Die negatiewe waardes in die geval van die vloeistofsintillasiespektrometrie is waarskynlik daaraan te wyte dat die gedroogde gel moontlik foutief gesny is voor sintillasietelling.

In 'n volgende eksperiment is die Rsa I - Hind III-kollageenfragment in die teenwoordigheid van 'n toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Die koderende DNA-string (Figuur 7.27) sowel as die teenoorgestelde DNA-string (Figuur 7.28) is beide aan die teenwoordigheid van 0 tot 500 fmol Sp1 blootgestel.

Soortgelyke Sp1-afskermingsgebiede soos wat in Figuur 7.9 waargeneem is, is ook tydens die Sp1-proteïenkonsentrasiereeks verkry. Hoewel sommige van die afskermingsgebiede langs mekaar geleë is soos aangetoon in Figure 7.27 en 7.28, is by sowel vloeistofsintillasietellings as densitometrie dié K-waardes van die sewe verskillende bindingsgebiede vir Sp1 afsonderlik bereken. Op die DNA-koderende string (Figuur 7.27) is afskerming vir bindingsgebiede 1 en 2 vanaf 200 fmol Sp1 waargeneem. 'n Ligte afskerming vir bindingsgebied 3 word ook vanaf 200 fmol waargeneem, terwyl afskerming vir die ander bindingsgebiede vanaf 300 fmol Sp1 waarneembaar is.

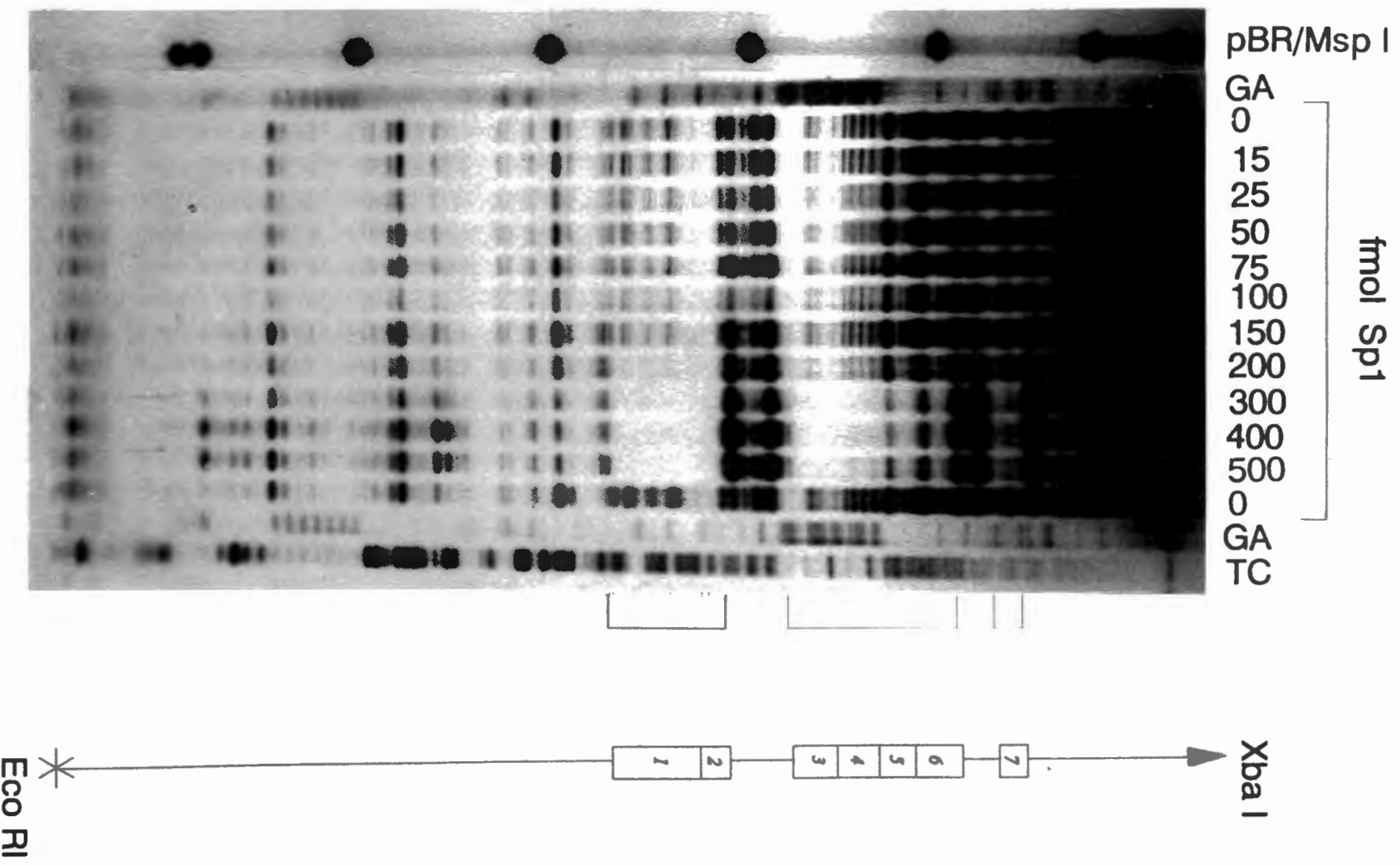
Op die teenoorgestelde DNA-string (Figuur 7.28) is afskerming vir bindingsgebiede 1 tot 2 vanaf 200 fmol Sp1 waarneembaar, terwyl bindingsgebiede 3 en 4 vanaf 300 fmol Sp1 afgeskerm word. Bindingsgebiede 5 tot 7 word egter in hierdie eksperiment eers afgeskerm vanaf 400 fmol Sp1. Die densitometriese skandeerprofiele van die "0"-baan en die baan met 500 fmol Sp1-proteïene is bo-op mekaar geprojekteer en in paneel B van die figure aangetoon. Proteïenbindingsgebiede is duidelik sigbaar in die 500 fmol profiel deur in die vermindering en verdwyning van die verskillende pieke wat in die geen-proteïenbaan teenwoordig is. Die K-, K_d- en ΔG -waardes is vir elke bindingsgebied bereken en in Tabel 7.10 gegee:

**TABEL 7.10 DIE BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG-WAARDES VAN SP1-BINDINGS-
GEBIEDE IN DIE Rsa I - Hind III-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE
EN VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

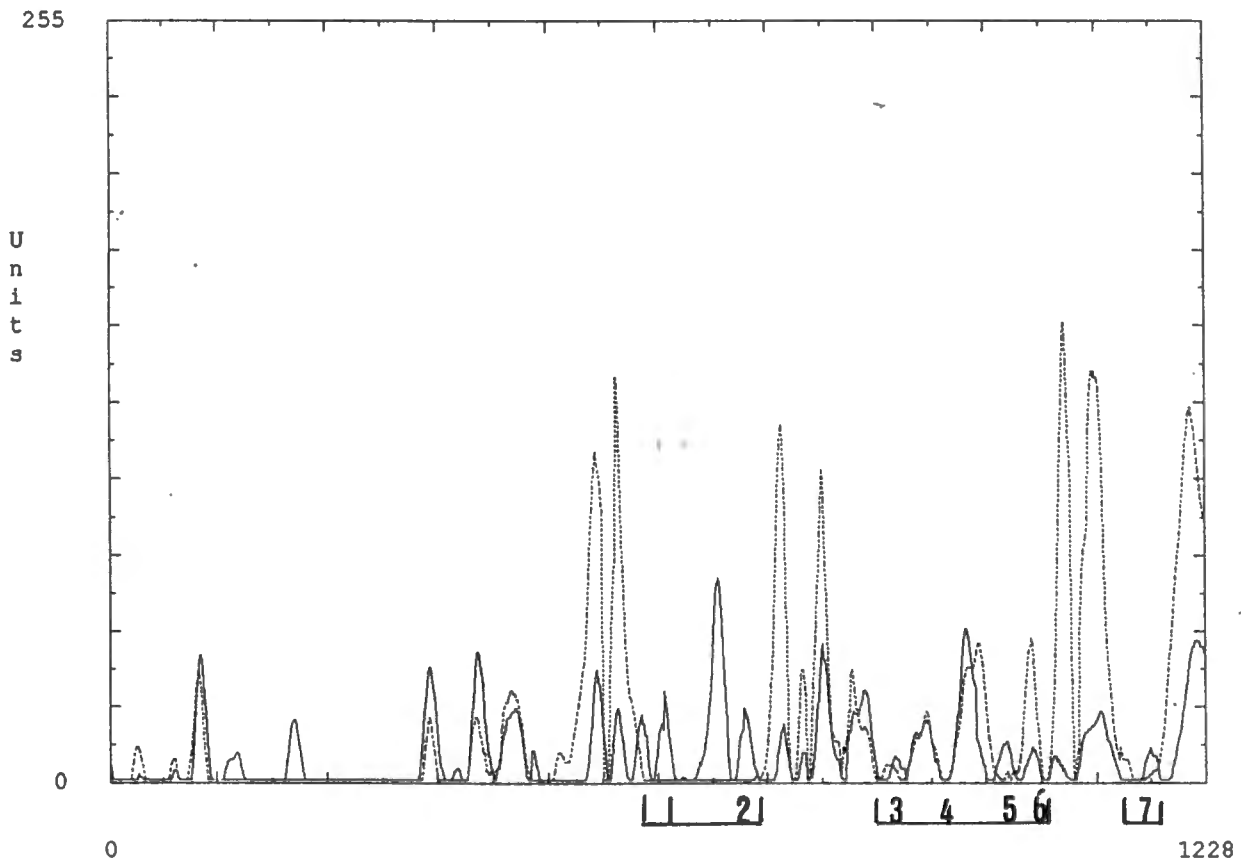
Rsa I - Hind III-koderende DNA-string						
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie			
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	Δ G (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	
1. 1,34 x 10 ¹³	7,46 x 10 ⁻¹⁴	-16,40	4,40 x 10 ¹³	2,27 x 10 ⁻¹⁴	-17,05	
2. 1,02 x 10 ¹³	9,80 x 10 ⁻¹⁴	-16,25	2,40 x 10 ¹²	4,16 x 10 ⁻¹³	-15,47	
3. 2,81 x 10 ¹²	3,43 x 10 ⁻¹³	-15,57	1,06 x 10 ¹²	9,43 x 10 ⁻¹³	-15,30	
4. 3,40 x 10 ¹²	2,94 x 10 ⁻¹³	-15,66	1,62 x 10 ¹²	6,17 x 10 ⁻¹³	-15,26	
5. 1,25 x 10 ¹²	8,00 x 10 ⁻¹³	-15,12	1,88 x 10 ¹²	5,32 x 10 ⁻¹³	-15,34	
6. 3,71 x 10 ¹²	2,69 x 10 ⁻¹³	-15,70	-1,06 x 10 ¹¹	-9,43 x 10 ⁻¹²	-	
7. 4,23 x 10 ¹²	2,36 x 10 ⁻¹³	-15,78	1,01 x 10 ¹²	9,90 x 10 ⁻¹³	-15,00	
Rsa I - Hind III teenoorgestelde DNA-string						
1. 3,34 x 10 ¹²	2,99 x 10 ⁻¹³	-15,65	4,30 x 10 ¹²	2,32 x 10 ⁻¹³	-15,78	
2. 2,75 x 10 ¹²	3,63 x 10 ⁻¹³	-15,54	4,01 x 10 ¹²	2,49 x 10 ⁻¹³	-15,75	
3. 1,36 x 10 ¹²	7,35 x 10 ⁻¹³	-15,16	3,16 x 10 ¹²	3,16 x 10 ⁻¹³	-15,62	
4. 1,52 x 10 ¹²	6,57 x 10 ⁻¹³	-15,22	5,21 x 10 ¹¹	1,92 x 10 ⁻¹²	-14,64	
5. 5,83 x 10 ¹¹	1,71 x 10 ⁻¹²	-14,70	5,75 x 10 ¹¹	1,74 x 10 ⁻¹²	-14,69	
6. 1,48 x 10 ¹²	6,75 x 10 ⁻¹³	-15,21	2,19 x 10 ¹²	4,56 x 10 ⁻¹³	-15,42	
7. 2,25 x 10 ¹²	4,44 x 10 ⁻¹³	-15,44	5,20 x 10 ¹²	1,92 x 10 ⁻¹³	-15,89	

Die waardes wat verkry is, toon dat die vrye energiewaardes basies dieselfde is vir die verskillende bindingsgebiede, buiten die koderende string se eerste twee bindingsgebiede wat 'n hoër affiniteit as die ander vyf bindingsgebiede vertoon. Oor die algemeen is die ander bindingsgebiede egter in dieselfde orde grootte. Die feit dat die eerste twee afskermingsgebiede in die koderende string 'n hoër affiniteit toon as in die teenoorgestelde string, kan aan die ligging van die gebiede op die gels te wyte wees. 'n Veel hoër afskermingsgebied vir gebiede 1 en 2 word op die koderende string verkry, wat kwantitatiewe analise vergemaklik en groter noukeurigheid in die hand werk.

A



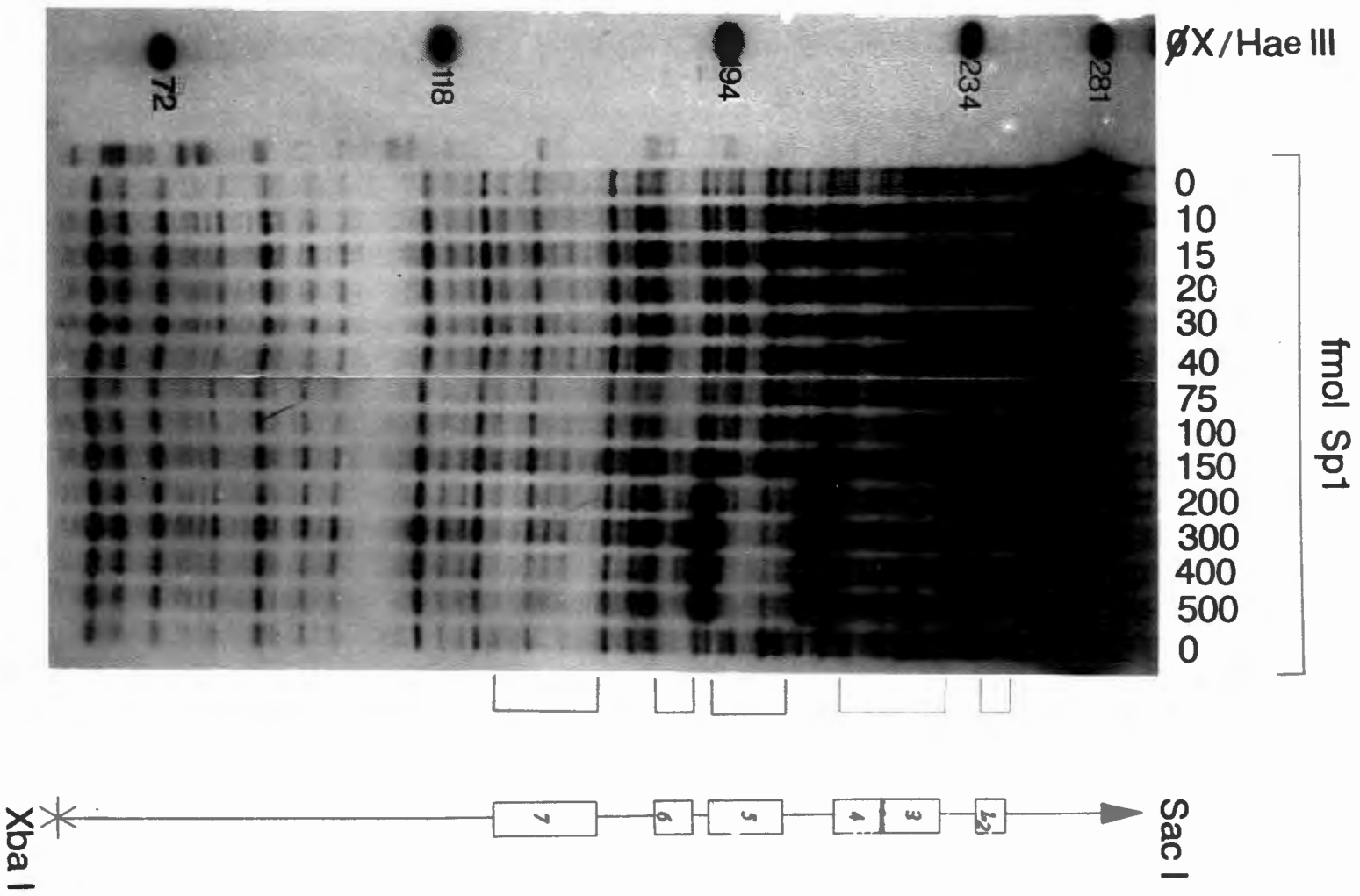
B



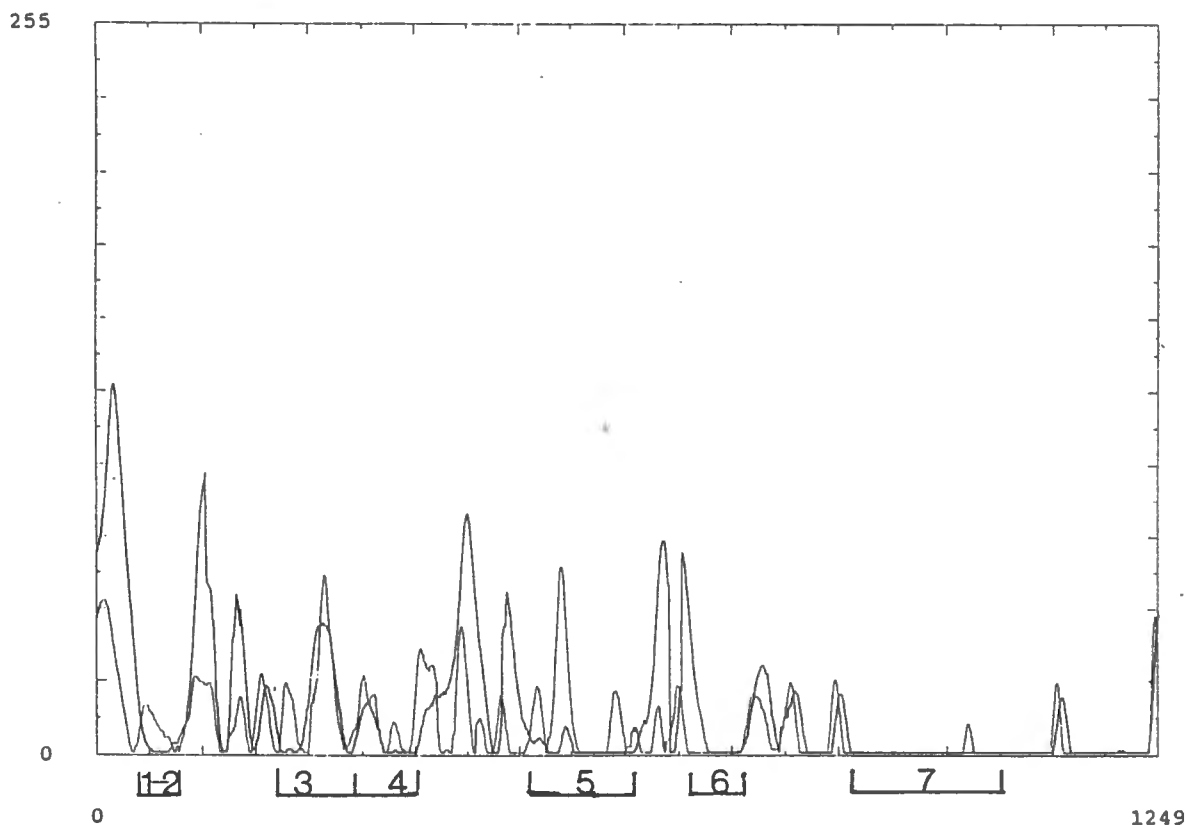
Figuur 7.27 DNase I-afskermingsanalise met die koderende string van die Rsa I - Hind III-fragment in die teenwoordigheid van toenemende Sp1-proteïene.

- A: Die koderende DNA-string van die Rsa I - Hind III-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van toenemende Sp1-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei sowel as pBR322 DNA gesny met restriksie-ensiem Msp I, wat as 'n verdere groottestandaard dien. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skanderingsprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 500 fmol Sp1-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer as aanduiding waar bindingspunte voorkom. Nommers kom ooreen met die van die afskermingsgebiede.

A



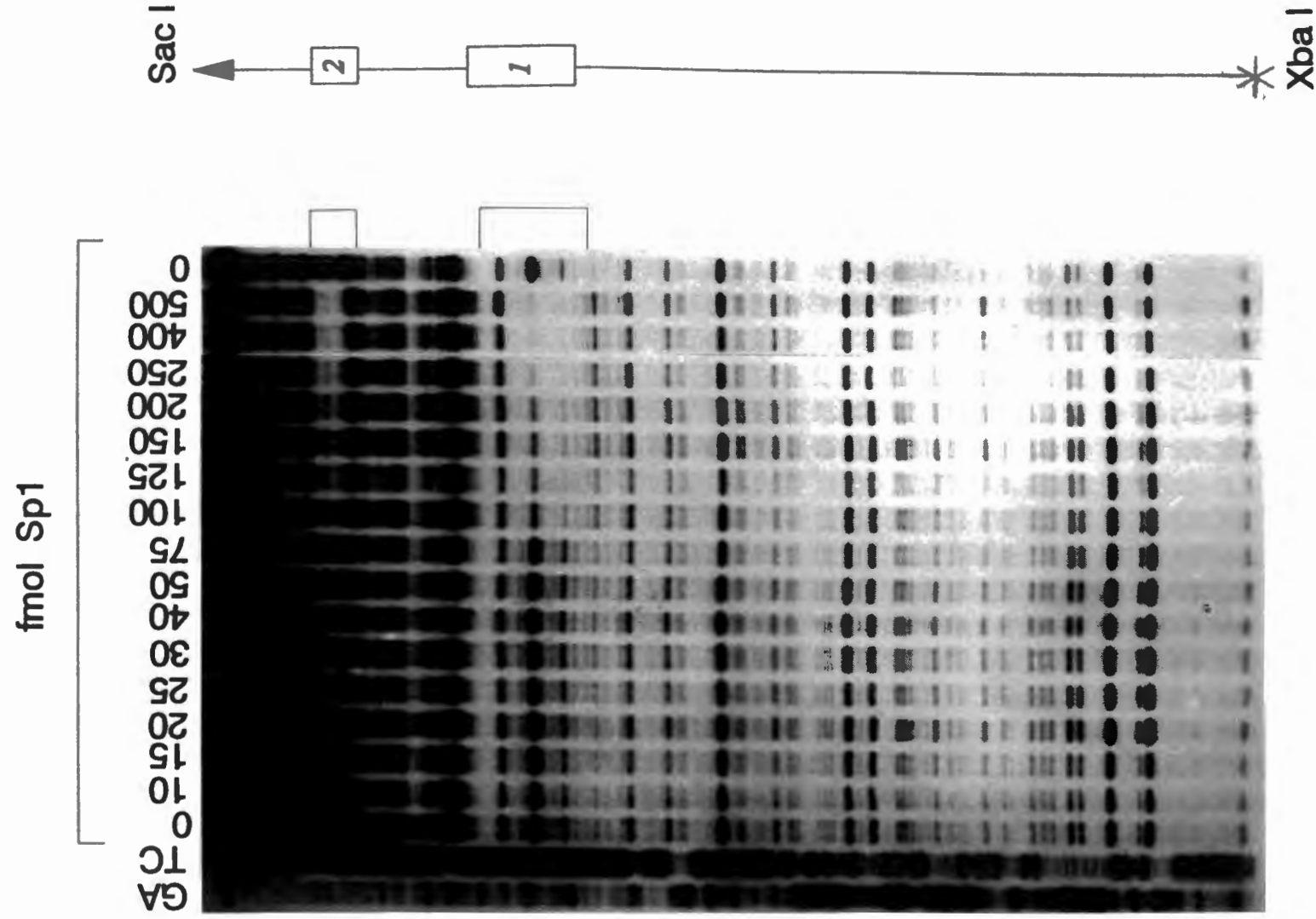
B



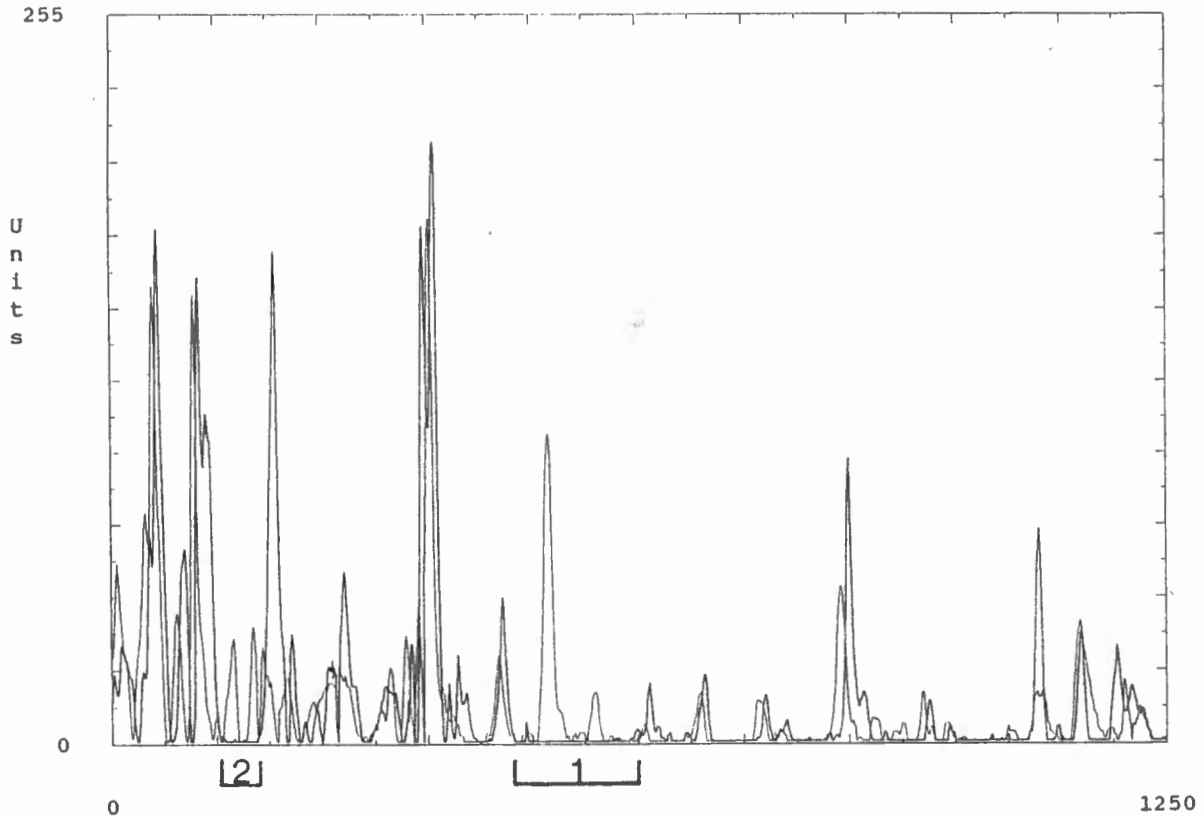
Figuur 7.28 DNase I-afskermingsanalise van die teenoorgestelde DNA-string van die Rsa I - Hind III-fragment in die teenwoordigheid van toenemende Sp1-proteïene.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Rsa I - Hind III-kollageen-fragment is in die teenwoordigheid van toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. ϕ X gesny met die restriksie-ensiem Hae III is as groottestandaard saam met die DNA op 'n 8% poli-akriëlamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skandeerprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 500 fmol Sp1-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer as aanduiding waar bindingsgebiede voorkom. Nommers kom ooreen met dié van die afskermingsgebiede.

A



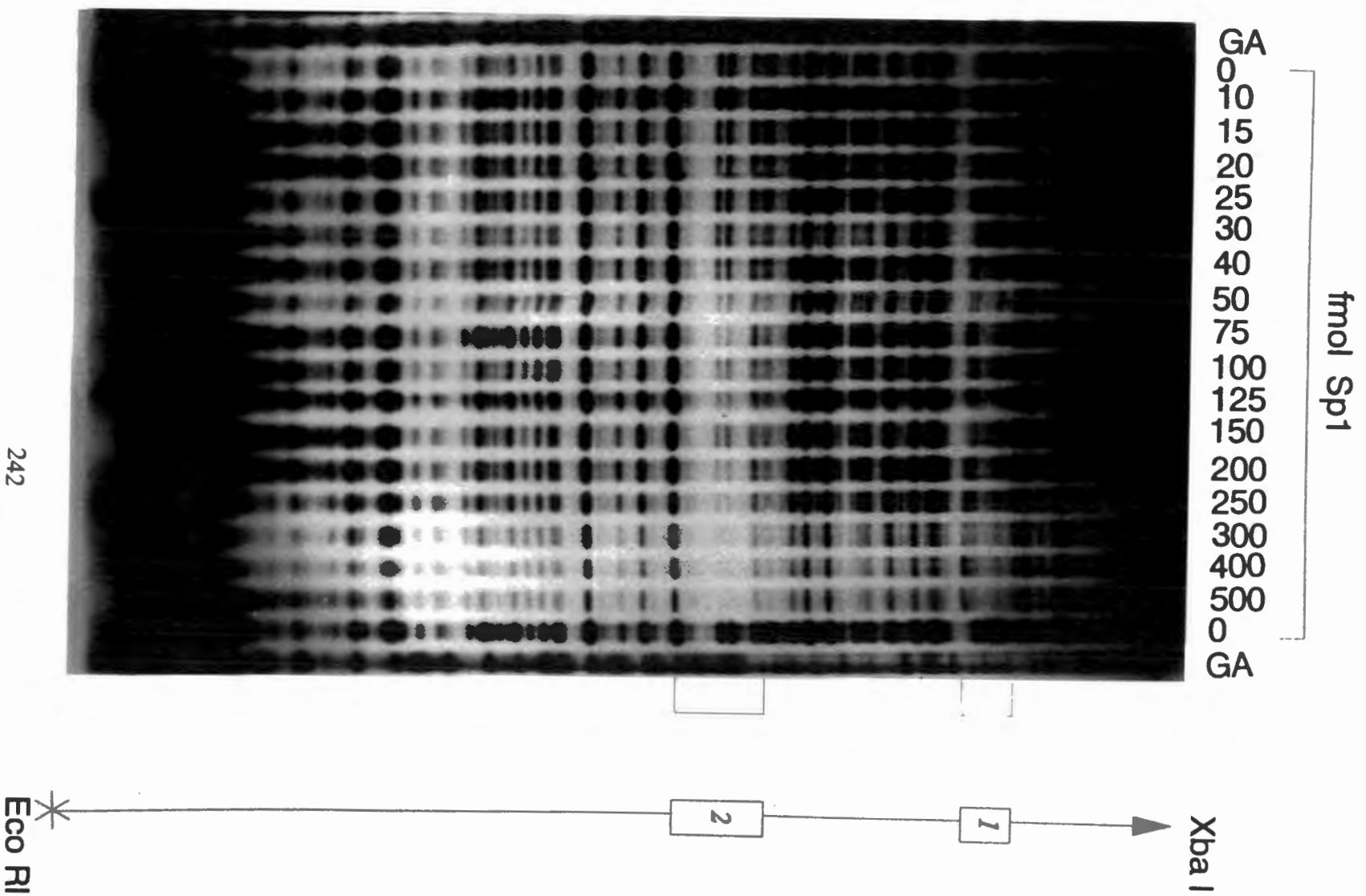
B



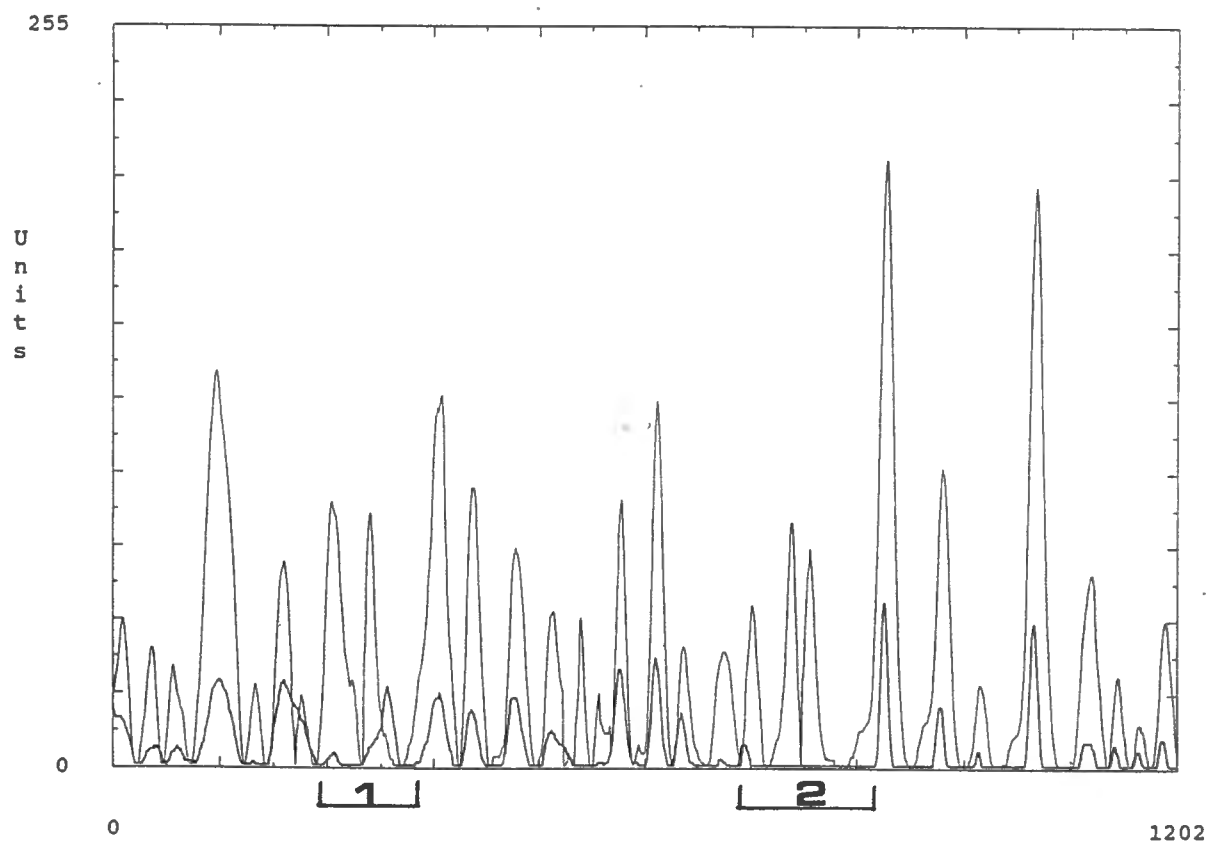
Figuur 7.29 DNase I-afskermingsanalyse met die koderende string van die Hind III - Rsa I-fragment en 'n toenemende Sp1-proteïenkonsentrasie.

- A: Die koderende DNA-string van die Hind III - Rsa I-fragment is in die teenwoordigheid van 'n toenemende konsentrasie Sp1-proteïene aan DNase-I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skanderingsprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 500 fmol Sp1-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer.

A



B



Figuur 7.30 DNase I-afskermingsanalyse van die teenoorgestelde DNA-string van die Hind III - Rsa I-fragment en toenemende Sp1-proteïene.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Hind III - Rsa I-kollageen-fragment is in die teenwoordigheid van 'n toenemende hoeveelheid Sp1-proteïenkonsentrasie aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akriëlamiedgel geskei.
- B: Skanderingsprofile na densitometrie is van die "0"-baan (lig) en die 500 fmol Sp1-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer sodat bindingsgebiede waargeneem kan word.

In Figuur 7.29 word die koderende DNA-string en in Figuur 7.30 die teenoorgestelde DNA-string van die Hind III - Rsa I-fragment onderwerp aan DNase I-afskermings-analise, weergegee. Toenemende hoeveelheid Sp1-proteïen, tot 'n konsentrasie van 500 fmol, is by die DNA gevoeg. Twee afskermingsgebiede soortgelyk aan dié verkry in Figuur 7.10, is geïdentifiseer. Ligte afskerming vir beide bindingsgebiede word op die koderende- en die teenoorgestelde DNA-stringe vanaf 100 fmol Sp1 waargeneem, hoewel die afskerming meer prominent op die koderende string (Figuur 7.29) waarneembaar is. Densitometrieske skandeerprofile van die "0"-baan en die 500 fmol Sp1-baan is bo-op mekaar geprojekteer soos weergegee in paneel B van Figure 7.29 en 7.30. Bindingsgebiede op hierdie profile is duidelik waarneembaar. Die berekende K-, K_d- en ΔG-waardes soos verkry na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie is in Tabel 7.11 weergegee:

**TABEL 7.11 DIE BEREKENDE K-, K_d- EN ΔG-WAARDES VAN SP1 BINDINGS-
GEBIEDE IN DIE Hind III - Rsa I-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE
EN VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

Hind III - Rsa I koderende DNA-string						
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie			
K (mol ⁻¹)	K _d (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	K _d (M)	ΔG (kcal/mol)	
1. 6,15 x 10 ¹²	1,62 x 10 ⁻¹³	-15,98	1,85 x 10 ¹¹	5,40 x 10 ⁻¹²	-14,08	
2. 2,49 x 10 ¹³	4,00 x 10 ⁻¹⁴	-16,74	1,92 x 10 ¹²	5,20 x 10 ⁻¹³	-15,35	
Hind III - Rsa I teenoorgestelde DNA-string						
1. 1,68 x 10 ¹²	5,95 x 10 ⁻¹³	-15,28	1,23 x 10 ¹¹	8,13 x 10 ⁻¹²	-13,86	
2. 2,34 x 10 ¹³	4,27 x 10 ⁻¹⁴	-16,71	2,24 x 10 ¹²	4,46 x 10 ⁻¹³	-15,43	

Die waardes wat verkry is, toon duidelik dat bindingsgebied 1 'n laer bindings-affiniteit vir Sp1 het as bindingsgebied 2. Hoewel die vloeistofsintillasiespektrometrie K-waardes 'n ordegrötte kleiner as vir die densitometrie gee, is die tendens van affiniteitsbinding egter dieselfde.

'n Samevatting van al die K_d - en ΔG -waardes wat vir die verskillende Sp1-bindingsgebiede verkry is, word in Tabel 7.12 gegee.

Volgens Jones *et al.* (1986) is by SV40 die Sp1 bindingsgebiede 1 en 6 lae affiniteitsbindingsgebiede vir Sp1, terwyl bindingsgebiede 3 en 5 hoë affiniteitsbindingsgebiede, en 2 en 4 medium affiniteitsbindingsgebiede, is. Indien die vrye energiewaardes vir SV40 soos in hierdie eksperimente verkry is as kriteria vir hoë, lae en medium affiniteit beskou word, wil dit uit die globale beeld van al die ΔG -waardes verkry vir SV40 voorkom asof lae affiniteitbindingsgebiede as dié, laer as -15,00 kcal/mol beskou kan word. Uit die waardes wat vir SV40 verkry is, is dit egter moeilik om tussen die medium en hoë affiniteitbindingsgebiede met die metodes wat in hierdie studie gevolg is, te onderskei. Op grond van die bindingsaffiniteit van Sp1 vir SV40-DNA soos verkry uit die literatuur (Jones *et al.*, 1986) en in samehang met die vrye energiewaardes verkry vir Sp1-binding in SV40-DNA na densitometrie en vloeistofsintillatiespektrometrie, is besluit om -16,00 kcal/mol as skeiding tussen die medium en hoë affiniteitbindingsgebied te stel.

As die genoemde kriterium gevolg word, wil dit voorkom asof die eerste bindingsgebied in die Sma I-fragment 'n medium bindingsaffiniteit vir Sp1 het en die tweede bindingsgebied 'n hoë bindingsaffiniteit. Beide bindingsgebiede in die Sma I - Rsa I-fragment is lae affiniteitsbindingsgebiede, terwyl die sewe Sp1-bindingsgebiede in die Rsa I - Hind III-fragment soortgelyke tendense vertoon as dié van die medium en hoë affiniteitsbindingsgebiede in SV40-DNA. Die twee Sp1-bindingsgebiede in die Hind III - Rsa I-fragment kan onderskeidelik as 'n medium en hoë affiniteitsbindingsgebied beskou word. Samevattend kan dus gesê word dat daar in die kollageengebied (-442 tot +1697) wat bestudeer is, twee lae-affiniteits-Sp1-bindingsgebiede en twee hoë-affiniteitsbindingsgebiede is, terwyl sewe bindingsgebiede 'n medium of hoë affiniteit vir Sp1-binding vertoon.

Tabel 7.12 Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van Spl-binding in die SV40-DNA en kollageengeenfragmente na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie

SV40		EcoRV - Pvu II		Cla I - Xba I	
Densitometer					
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
1. 6,74 x 10 ¹² 2. 1,18 x 10 ¹³ 3. 1,40 x 10 ¹³ 4. 1,72 x 10 ¹³ 5. 1,56 x 10 ¹³ 6. 9,45 x 10 ¹² 1 - K = Kd (M)	-16,03 -16,33 -16,43 -16,54 -16,49 -16,21	1. -1,54 x 10 ¹² 1 - K = Kd (M)	-	1. -2,21 x 10 ¹² 1 - K = Kd (M)	
1. 1,48 x 10 ⁻¹³ 2. 8,47 x 10 ⁻¹⁴ 3. 7,14 x 10 ⁻¹⁴ 4. 5,81 x 10 ⁻¹⁴ 5. 6,41 x 10 ⁻¹⁴ 6. 1,06 x 10 ⁻¹³		1. -6,47 x 10 ⁻¹³		1. -4,5 x 10 ⁻¹³	-
SINTILLASIE TELLER					
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
1. 7,86 x 10 ¹² 2. 5,00 x 10 ¹² 3. 2,79 x 10 ¹³ 4. 1,31 x 10 ¹³ 5. 8,33 x 10 ¹² 6. -7,76 x 10 ¹⁰ 1 - K = Kd (M)	-16,11 -15,87 -16,78 -16,39 -16,14 -	1. -9,7 x 10 ¹⁰ 1 - K = Kd (M)	-	1. -1,45 x 10 ¹² 1 - K = Kd (M)	-
1. 1,28 x 10 ⁻¹³ 2. 2,00 x 10 ⁻¹³ 3. 3,58 x 10 ⁻¹⁴ 4. 7,63 x 10 ⁻¹³ 5. 1,20 x 10 ⁻¹³ 6. -1,28 x 10 ⁻¹¹		1. -1,03 x 10 ¹¹		1. -6,86 x 10 ⁻¹³	

Densitometer - t/o

K(mol ⁻¹)	Δ G Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	Δ G Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	Δ G Kcal/mol
1. 2,81 x 10 ¹² 2. 2,51 x 10 ¹¹ 3. 9,60 x 10 ¹² 4. 3,20 x 10 ¹² 5. 1,00 x 10 ¹² 6. 7,78 x 10 ¹¹ 1 - = Kd (M) K	-15,55 -14,24 -16,22 -15,63 -15,00 -14,86	1. -1,17 x 10 ⁻¹² 1 - = Kd (M) K	-	1. -1,11 x 10 ¹¹ 1 - = Kd (M) K	-
1. 3,55 x 10 ⁻¹³ 2. 3,90 x 10 ⁻¹² 3. 1,04 x 10 ⁻¹³ 4. 3,12 x 10 ⁻¹³ 5. 1,00 x 10 ⁻¹² 6. 1,28 x 10 ⁻¹²		1. -8,54 x 10 ⁻¹³		1. -8,93 x 10 ⁻¹²	

SINTILLASIE TELLER - t/o

K(mol ⁻¹)	Δ G Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	Δ G Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	Δ G Kcal/mol
1. 7,64 x 10 ¹¹ 2. 6,14 x 10 ¹¹ 3. 1,11 x 10 ¹² 4. 1,47 x 10 ¹² 5. 8,15 x 10 ¹¹ 6. 1,37 x 10 ¹¹ 1 - = Kd (M) K	-14,85 -14,73 -15,05 -15,20 -14,88 -13,91	1. -3,4 x 10 ¹¹ 1 - = Kd (M) K	-	1. -2,08 x 10 ¹² 1 - = Kd (M) K	-
1. 1,30 x 10 ⁻¹² 2. 1,62 x 10 ⁻¹² 3. 9,00 x 10 ⁻¹³ 4. 6,80 x 10 ⁻¹³ 5. 1,22 x 10 ⁻¹² 6. 7,29 x 10 ⁻¹²		1. -2,92 x 10 ⁻¹²		1. -4,81 x 10 ⁻¹³	

Xba I - Sac I		Sma I - Sma I		Sma I - Rsa I	
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
Densitometer					
1. $-6,30 \times 10^{12}$ 1 - K = Kd (M)	-	1. $1,44 \times 10^{12}$ 2. $3,13 \times 10^{13}$ 1 - K = Kd (M)	-15,19 -16,86	1. $1,16 \times 10^{11}$ 2. $3,47 \times 10^{12}$ 1 - K = Kd (M)	-13.82 -15.67
1. $-1,58 \times 10^{-13}$		1. $6,94 \times 10^{-13}$ 2. $3,18 \times 10^{-14}$		1. $8,60 \times 10^{-12}$ 2. $3,88 \times 10^{-13}$	
SINTILLASIE TELLER					
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
1. $-7,45 \times 10^{11}$ 1 - K = Kd (M)	-	1. $1,44 \times 10^{12}$ 2. $4,48 \times 10^{12}$ 1 - K = Kd (M)	-15,19 -15,81	1. $-4,49 \times 10^{12}$ 2. $-5,84 \times 10^{12}$ 1 - K = Kd (M)	- -
1. $1,34 \times 10^{-12}$		1. $6,94 \times 10^{-13}$ 2. $2,23 \times 10^{-13}$		1. $-2,22 \times 10^{-13}$ 2. $-1,71 \times 10^{-13}$	

Densitometer t/o					
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
1. $-2,27 \times 10^{12}$ $\frac{1}{K} = K_d (M)$	-	1. $1,83 \times 10^{12}$ 2. $2,35 \times 10^{13}$ $\frac{1}{K} = K_d (M)$	-15,32 -16,71	1. $1,79 \times 10^{12}$ 2. $6,44 \times 10^{11}$ $\frac{1}{K} = K_d (M)$	-15,31 -14,76
1. $-4,40 \times 10^{-13}$		1. $5,46 \times 10^{-13}$ 2. $4,25 \times 10^{-12}$		1. $5,58 \times 10^{-13}$ 2. $1,55 \times 10^{-12}$	
SINTILLASIE TELLER t/o					
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
1. $-4,6 \times 10^{12}$ $\frac{1}{K} = K_d (M)$	-	1. $1,53 \times 10^{12}$ 2. $3,44 \times 10^{12}$ $\frac{1}{K} = K_d (M)$	-15,22 -15,67	1. $-2,32 \times 10^{11}$ 2. $6,76 \times 10^{10}$ $\frac{1}{K} = K_d (M)$	- -13,53
1. $-2,14 \times 10^{-13}$		1. $6,53 \times 10^{-13}$ 2. $2,90 \times 10^{-13}$		1. $-4,3 \times 10^{-12}$ 2. $1,48 \times 10^{-11}$	

Rsa I - Hind III		Hind III - Rsa I	
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
Densitometer			
1. $1,34 \times 10^{13}$ 2. $1,02 \times 10^{13}$ 3. $2,81 \times 10^{12}$ 4. $3,40 \times 10^{12}$ 5. $1,25 \times 10^{12}$ 6. $3,71 \times 10^{12}$ 7. $4,23 \times 10^{12}$ $\frac{1}{K} = K_d (M)$	-16,40 -16,25 -15,57 -15,66 -15,12 -15,70 -15,78	1. $6,15 \times 10^{12}$ 2. $2,49 \times 10^{13}$ $\frac{1}{K} = K_d (M)$	-15,98 -16,74
1. $7,46 \times 10^{-14}$ 2. $9,80 \times 10^{-14}$ 3. $3,43 \times 10^{-13}$ 4. $2,94 \times 10^{-13}$ 5. $8,00 \times 10^{-13}$ 6. $2,69 \times 10^{-13}$ 7. $2,36 \times 10^{-13}$		1. $1,62 \times 10^{-13}$ 2. $4,00 \times 10^{-14}$	
SINTILLASIE TELLER			
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
1. $4,40 \times 10^{13}$ 2. $2,40 \times 10^{12}$ 3. $1,06 \times 10^{12}$ 4. $1,62 \times 10^{12}$ 5. $1,88 \times 10^{12}$ 6. $-1,06 \times 10^{11}$ 7. $1,01 \times 10^{12}$ $\frac{1}{K} = K_d (M)$	-17,05 -15,47 -15,30 -15,26 -15,34 - -15,00	1. $1,85 \times 10^{11}$ 2. $1,92 \times 10^{12}$ $\frac{1}{K} = K_d (M)$	-14,08 -15,35
1. $2,27 \times 10^{-14}$ 2. $4,16 \times 10^{-13}$ 3. $9,43 \times 10^{-13}$ 4. $6,17 \times 10^{-13}$ 5. $5,32 \times 10^{-13}$ 6. $-9,43 \times 10^{-12}$ 7. $9,90 \times 10^{-13}$		1. $5,40 \times 10^{-12}$ 2. $5,20 \times 10^{-13}$	

Densitometer - t/o			
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
1. 3,34 x 10 ¹² 2. 2,75 x 10 ¹² 3. 1,36 x 10 ¹² 4. 1,52 x 10 ¹² 5. 5,83 x 10 ¹¹ 6. 1,48 x 10 ¹² 7. 2,25 x 10 ¹² 1 - = Kd (M) K	-15,65 -15,54 -15,16 -15,22 -14,70 -15,21 -15,44	1. 1,68 x 10 ¹² 2. 2,34 x 10 ¹³ 1 - = Kd (M) K	-15,28 -16,71
1. 2,99 x 10 ⁻¹³ 2. 3,63 x 10 ⁻¹³ 3. 7,35 x 10 ⁻¹² 4. 6,57 x 10 ⁻¹³ 5. 1,71 x 10 ⁻¹² 6. 6,75 x 10 ⁻¹³ 7. 4,44 x 10 ⁻¹³		1. 5,95 x 10 ⁻¹³ 2. 4,27 x 10 ⁻¹⁴	
SINTILLASIE TELLER			
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
1. 4,30 x 10 ¹² 2. 4,01 x 10 ¹² 3. 3,16 x 10 ¹² 4. 5,21 x 10 ¹¹ 5. 5,75 x 10 ¹¹ 6. 2,19 x 10 ¹² 7. 5,20 x 10 ¹² 1 - = Kd (M) K	-15,78 -15,75 -15,62 -14,64 -14,69 -15,42 -15,89	1. 1,23 x 10 ¹¹ 2. 2,24 x 10 ¹² 1 - = Kd (M) K	-13,86 -15,43
1. 2,32 x 10 ⁻¹³ 2. 2,49 x 10 ⁻¹³ 3. 3,16 x 10 ⁻¹³ 4. 1,92 x 10 ⁻¹² 5. 1,74 x 10 ⁻¹² 6. 4,56 x 10 ⁻¹³ 7. 1,92 x 10 ⁻¹³		1. 8,13 x 10 ⁻¹² 2. 4,46 x 10 ⁻¹³	

7.3.2 BINDINGSAFFINITEIT VAN AP1

Aangesien slegs die SV40-DNA en die Sma I-kollageenfragment oor Ap1-bindingsgebiede beskik soos waargeneem uit die DNase I-afskermingseksperimente vroeër bespreek by Figure 7.3 en 7.7, is net hierdie twee fragmente aan 'n Ap1-konsentrasiereeks onderwerp. Die DNase I-afskermingsanalise, sowel as al die kwantifiseringstappe, is uitgevoer net soos dit in die vorige afdelings vir Sp1 beskryf is.

Beide DNA-stringe van die SV40-fragment is aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp in die teenwoordigheid van 'n toenemende Ap1 proteïenkonsentrasie. Hierdie konsentrasiereeks wissel van 0 tot 69 pmol, waar 1 μ l Ap1 (1,1 μ g/ μ l) ekwivalent is aan 27 pmol. Aangesien die aangekoopte Ap1-proteïene se proteïenkonsentrasie hoër is in vergelyking met dié van die aangekoopte Sp1-proteïene (30 ng/ μ l), is die konsentrasiereeks ook hoër as die van Sp1. Dit was egter moeilik om Ap1-proteïene laer as 1,08 pmol (0,04 μ l) in die konsentrasiereeks te gebruik, daar die Ap1-proteïene se aktiwiteit tydens verdunning verlore geraak het. Drie afskermingsgebiede vir Ap1 in die SV40-DNA, soortgelyk aan die gebiede wat in Figuur 7.3 verkry is, is tydens hierdie kwantifiserende DNase I-afskermingsanalise vir die koderende string (Figuur 7.31) sowel as die teenoorgestelde DNA-string (Figuur 7.32) waargeneem. Soos gesien kan word uit Figuur 7.31, word gedeeltelike afskerming van Ap1-bindingsgebied 1 vanaf 5,4 pmol Ap1 waargeneem en volledige afskerming vanaf 17,3 pmol Ap1. In die teenoorgestelde DNA-string in Figuur 7.32 is Ap1 bindingsgebied 1 aan die bo-punt van die gel geleë, maar kan afskerming vanaf 5,4 pmol Ap1 waargeneem word. Bindingsgebied 2 vertoon in die koderende string ligte afskerming vanaf 1,08 pmol Ap1 en volledige afskerming vanaf 17,3 pmol Ap1, terwyl op die teenoorgestelde string afskerming vanaf 2,16 pmol Ap1 sigbaar is. Afskermingsgebied 3 vertoon afskerming in die koderende string vanaf 5,4 pmol Ap1 en in die teenoorgestelde string vanaf 8,64 pmol Ap1. Die verskil van afskerming wat tussen die twee stringe waargeneem kan word, is te wyte aan eksperimentele foute wat moontlik ingesluit het en ook waarskynlik as gevolg van die feit dat die twee DNA-stringe se konsentrasies nie ekwivalent is nie.

Skanderingsprofiel van die geen-proteïenbaan of "0"-baan en die 69 pmol Ap1-baan is bo-op mekaar geprojekteer en is in paneel B van die figure gegee. Uit die profiele kan die verdwyning van die pieke in die teenwoordigheid van die proteïene en dus 'n aanduiding van afskerming, duidelik waargeneem word. Die K-, Kd- en ΔG -waardes van die Ap1-bindingsgebiede na kwantifisering deur densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie word in Tabel 7.13 weergegee.

**TABEL 7.13 DIE BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG -WAARDES VAN AP1-BINDINGS-
GEBIEDE IN DIE SV40-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN
VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

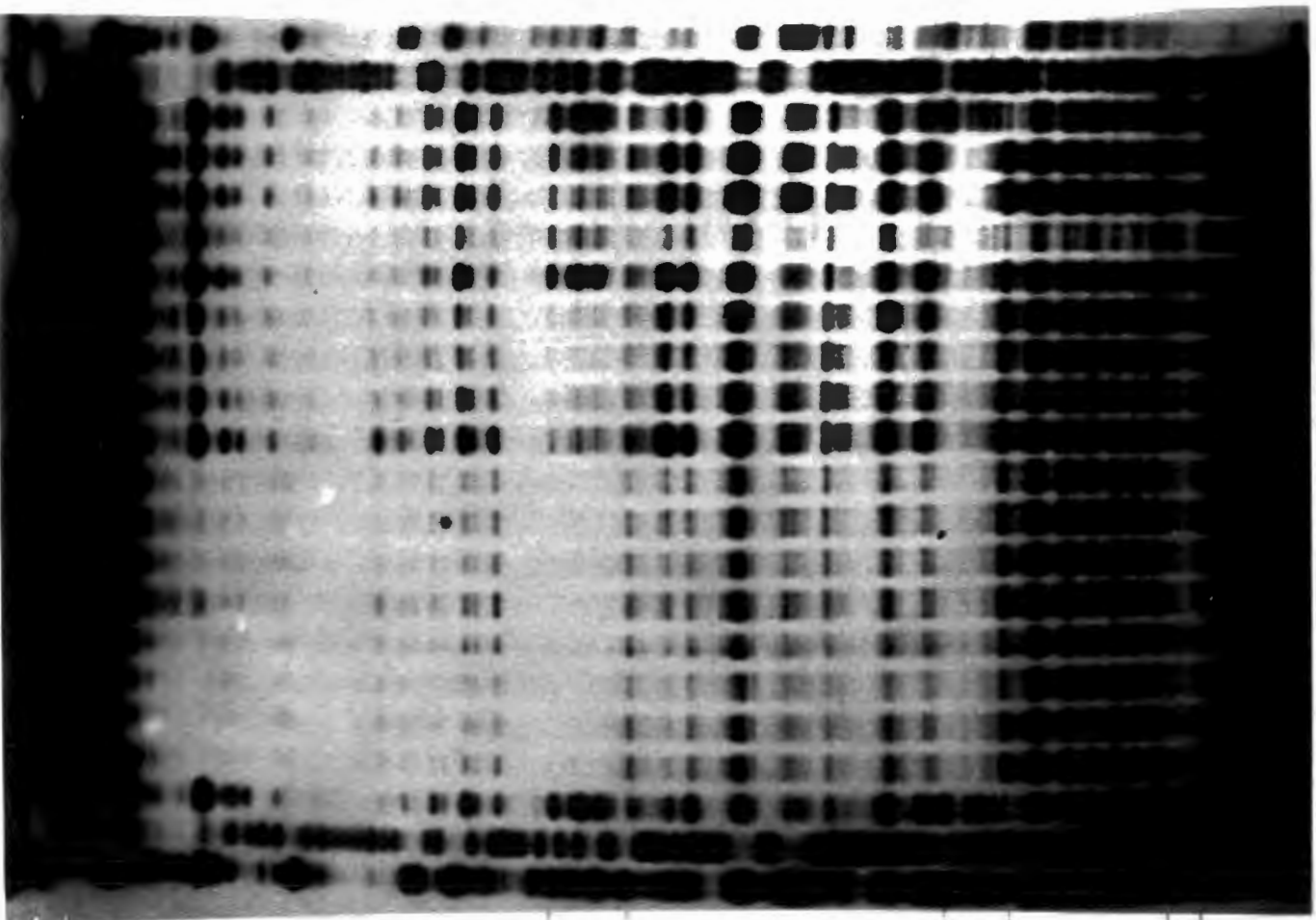
SV40 koderende string						
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie			
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	
1. 9,35 x 10 ¹⁰	1,07 x 10 ⁻¹¹	-13,71	5,39 x 10 ¹⁰	1,85 x 10 ⁻¹¹	-13,41	
2. 4,89 x 10 ¹¹	2,04 x 10 ⁻¹²	-14,61	8,41 x 10 ¹¹	1,19 x 10 ⁻¹²	-14,90	
3. 1,16 x 10 ⁹	8,62 x 10 ⁻¹⁰	-11,33	1,36 x 10 ¹⁰	7,35 x 10 ⁻¹¹	-12,66	
SV40 teenoorgestelde DNA-string						
1. 6,21 x 10 ¹¹	1,61 x 10 ⁻¹²	-14,73	4,45 x 10 ¹¹	2,24 x 10 ⁻¹²	-14,55	
2. 7,42 x 10 ¹¹	1,34 x 10 ⁻¹²	-14,83	7,4 x 10 ¹¹	1,35 x 10 ⁻¹²	-14,83	
3. 1,46 x 10 ¹¹	6,85 x 10 ⁻¹²	-13,95	1,74 x 10 ¹⁰	5,75 x 10 ⁻¹¹	-12,80	

Uit die berekende waardes is dit duidelik dat bindingsgebied 2 die hoogste bindings-affiniteit van die drie bindingspunte het. Bindingspunt 1 kan waarskynlik as medium en bindingspunt 3 as lae affiniteitsbindingspunte beskou word. Hierdie resultate kom goed ooreen met dié in die literatuur (vergelyk Tabel 7.2), waar Coleman *et al.* (1992), SV40 (II) as hoë affiniteitsgebied en Lee *et al.* (1987a), SV40 (III) as lae affiniteitsgebied beskryf. Die proteïen konsentrasiereeks wat vir hierdie twee eksperimente gebruik is, is dus breed genoeg om die affiniteit van Ap1 vir die DNA te kan bepaal.

A

pmol Ap1

TC
GA
0
1,08
2,16
3,24
4,32
5,4
6,5
8,64
12,96
17,28
21,6
25,9
34,5
43,2
51,8
60,48
69,12
0
GA
TC



Hind III

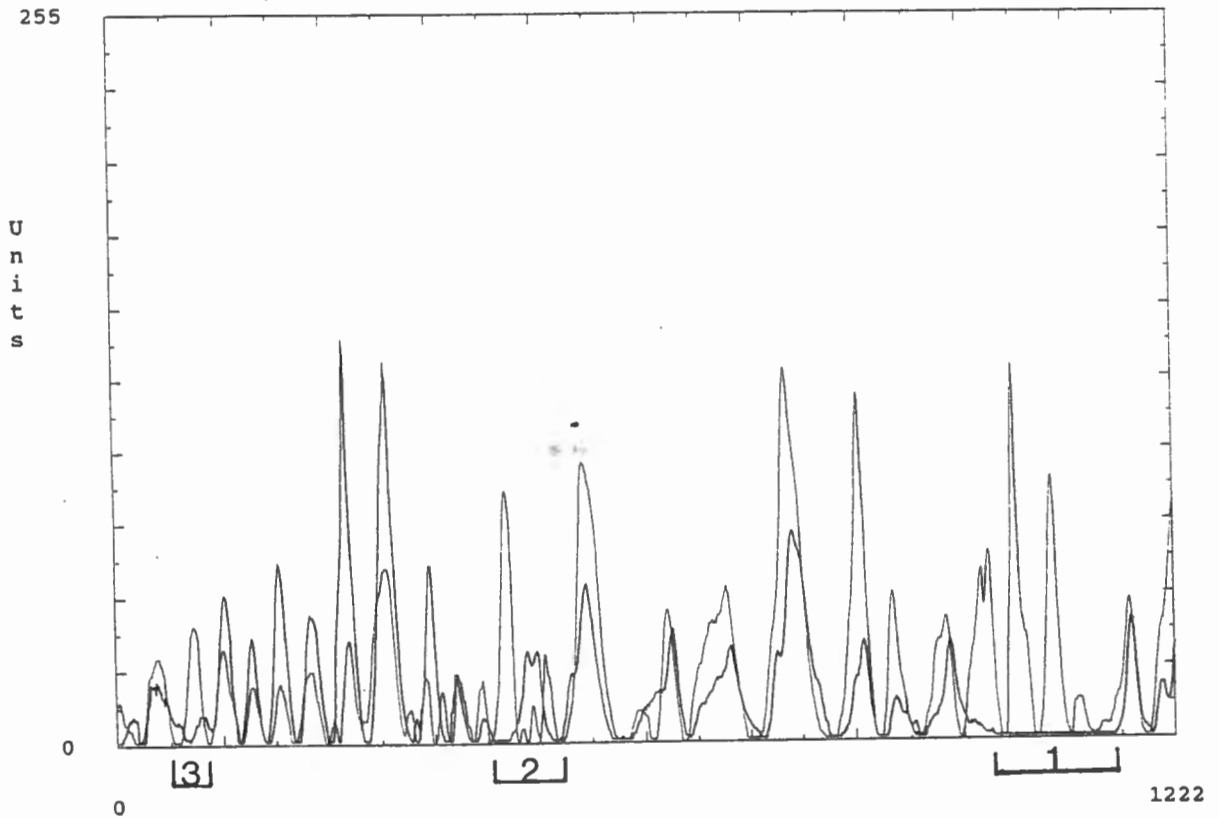
3

2

1

Eco RI

B

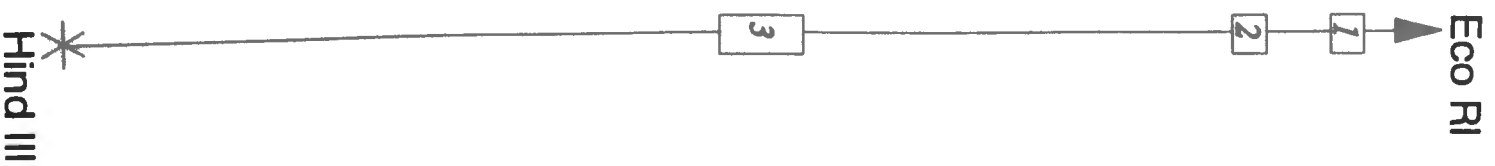
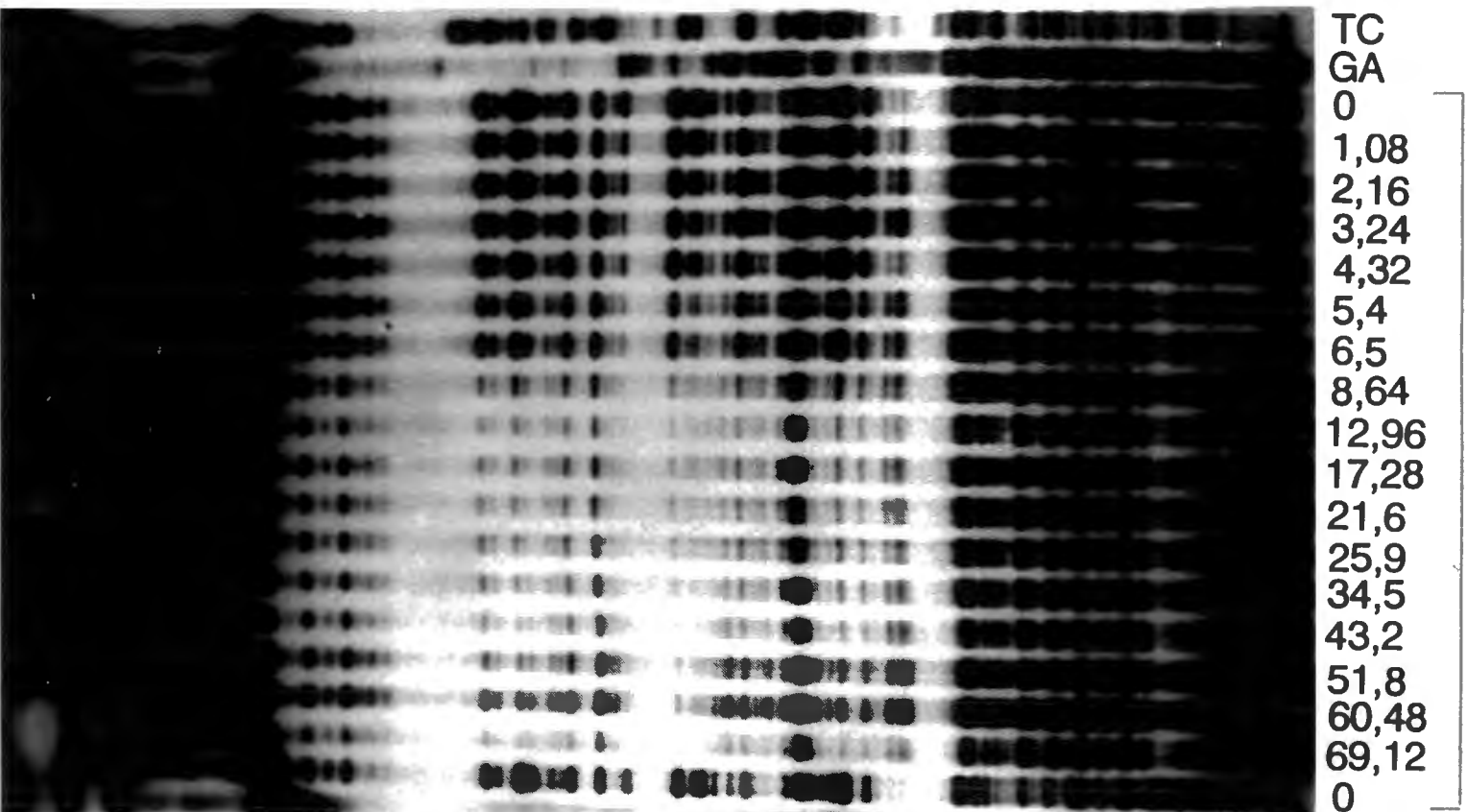


Figuur 7.31 DNase I-afskermingsanalyse van die koderende DNA-string van die SV40-fragment en 'n toenemende Ap1-proteïenkonsentrasie.

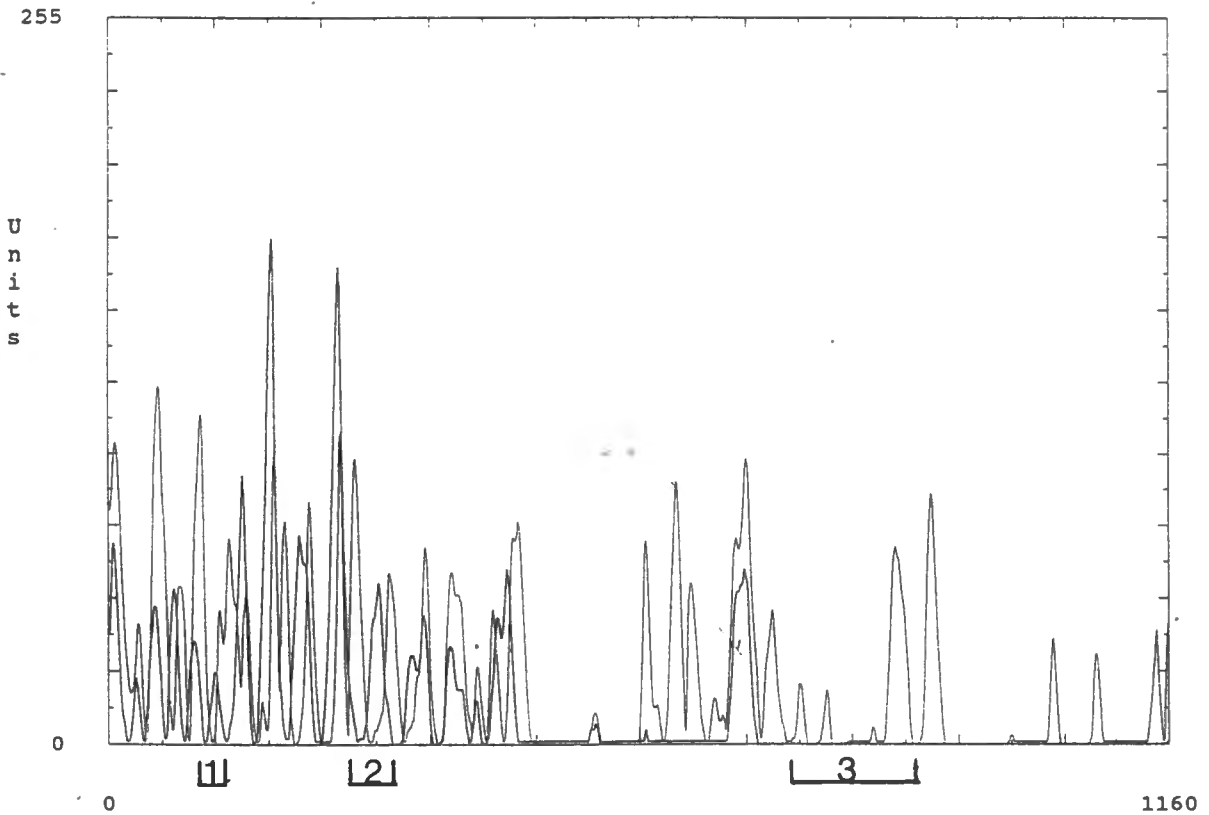
- A: Die koderende string van die SV40-fragment is in die teenwoordigheid van 'n toenemende Ap1-proteïenkonsentrasie aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skanderingsprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 69 pmol Ap1-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer. Verdwyning van pieke toon bindingsgebiede aan.

A

pmol Ap1



B



Figuur 7.32 DNase I-afskermingsanalyse van die teenoorgestelde DNA-string van die SV40-fragment met toenemende Ap1-proteïenkonsentrasie.

- A: Die SV40 teenoorgestelde string is in die teenwoordigheid van toenemende Ap1-proteïene aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akriëlamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skanderingsprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 69 pmol Ap1-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer. Verdwyning van pieke toon bindingsgebiede aan.

Uit Figuur 7.7 is dit bekend dat die Sma I-kollageenfragment oor 'n bindingsgebied vir Ap1 beskik. DNase I-afskermingsanalise van hierdie fragment in die teenwoordigheid van 'n toenemende Ap1-konsentrasie is uitgevoer om die bindingsaffiniteit van hierdie proteïene vir die bindingsgebied te bepaal. In Figuur 7.33 en Figuur 7.34 word die DNase I-afskermingsanalise met onderskeidelik die koderende string en die teenoorgestelde DNA-string van die SmaI-fragment weergegee. In beide gevalle word afskerming reeds vanaf 2,16 pmol Ap1 waargeneem. Uit die twee figure kan ook waargeneem word dat as gevolg van die hoë proteïenkonsentrasie soos reeds bespreek in Afdeling 6.2.2. by baie hoë Ap1-konsentrasies DNase I-vertering aan die onderpunt van die gel verhinder word. Die skanderingsprofiel van veral die teenoorgestelde DNA-string van die Sma I-fragment (Figuur 7.34, paneel B), toon as gevolg van die slegte DNase I-vertering van die DNA dan ook ooreenstemmende lae pieke aan. Skanderingsprofile van die geen-proteïenbaan en die baan met die hoogste Ap1-konsentrasie is bo-op mekaar geprojekteer om die bindingsgebiede duidelik te visualiseer. In die geval van die koderende string is 60,5 pmol die hoogste Ap1-konsentrasie en by die teenoorgestelde DNA-string is dit 69 pmol Ap1. Hierdie profile word in paneel B van Figuur 7.33 en Figuur 7.34 aangetoon. Die berekende K-, Kd- en ΔG -waardes van die bindingspunt is bereken en in Tabel 7.14 weergegee.

**TABEL 7.14 BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG -WAARDES VAN API-BINDINGS-
GEBIEDE IN DIE Sma I-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN
VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

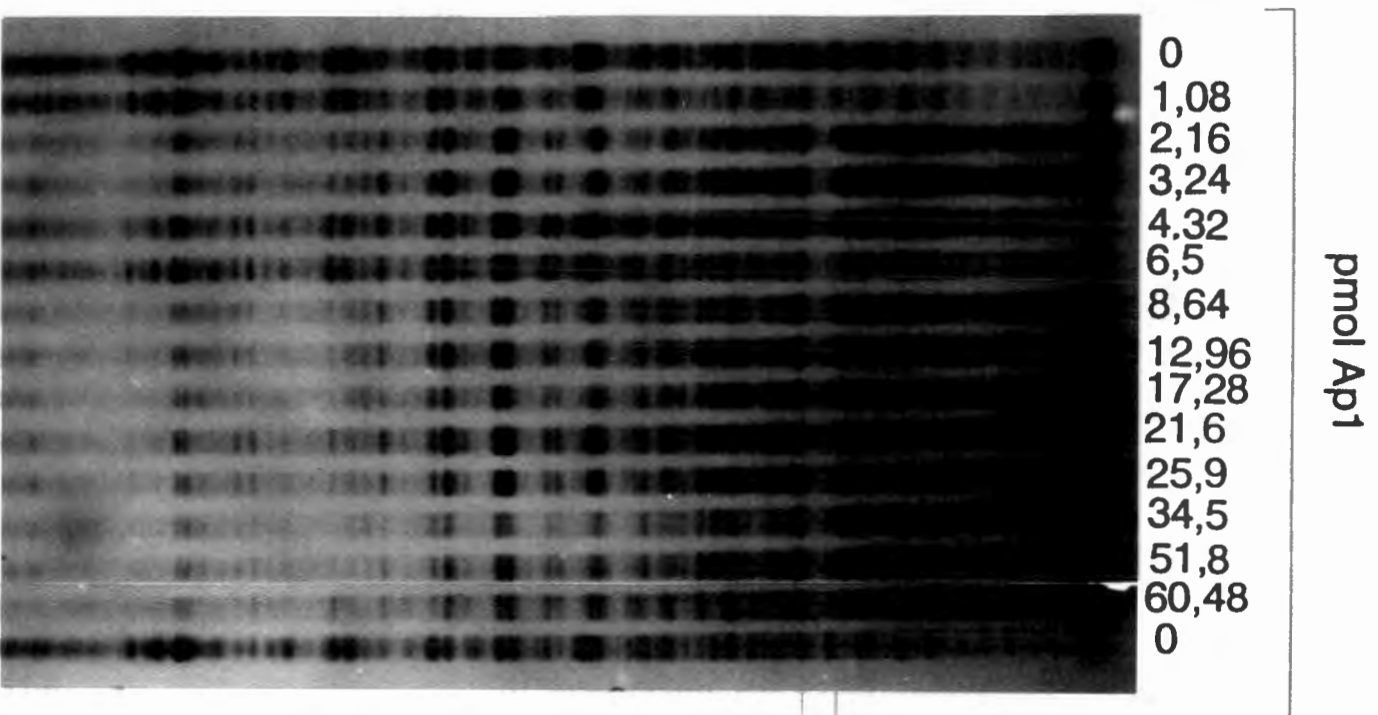
Sma I koderende string					
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie		
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)
1. 9,36 x 10 ¹¹	1,07 x 10 ⁻¹²	-14,96	2,19 x 10 ¹⁰	4,56 x 10 ⁻¹²	-12,92
Sma I teenoorgestelde DNA-string					
1. 9,90 x 10 ¹¹	1,01 x 10 ⁻¹²	-14,99	1,38 x 10 ¹⁰	7,24 x 10 ⁻¹¹	-12,67

In vergelyking met die SV40 Ap1-bindingsgebiede, kom die bindingsaffiniteit van die Sma I-fragment se Ap1-bindingsgebied ooreen met dié van die SV40 Ap1-bindingsgebied 2. Die Ap1-bindingsgebied in die Sma I-kollageenfragment kan dus op grond van die affiniteitsbinding van Ap1 in die SV40-DNA as kriteria, as hoë bindingsaffiniteitsgebied vir Ap1 beskou word.

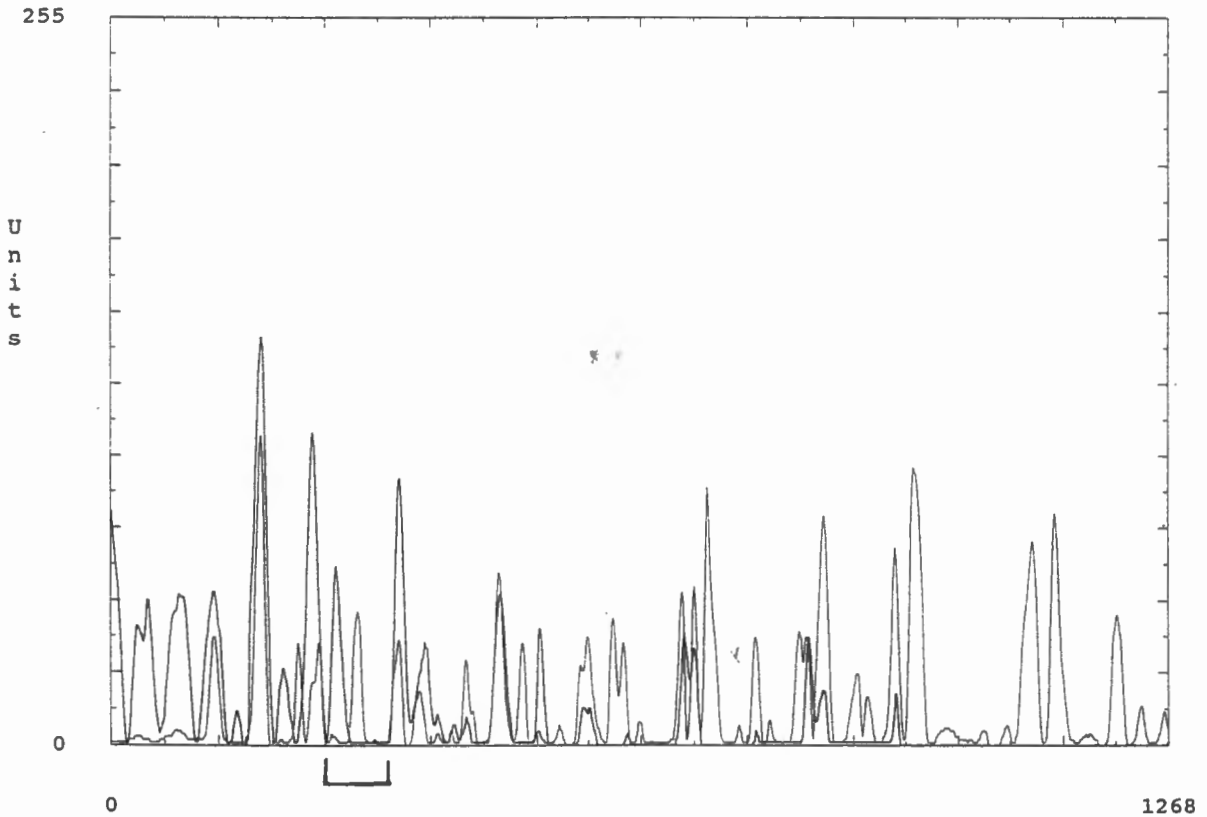
7.3.3 BINDINGSAFFINITEIT VAN AP2

Soos in die geval van die bepaling van die bindingsaffiniteit van die Sp1-bindingsgebiede (Afdeling 7.3.1), is al die kollageenfragmente en die SV40-DNA aan 'n Ap2-konsentrasiereeks onderwerp. Dieselfde prosedure, metodes en berekeninge is gebruik as vir die Sp1 en Ap1-bindingsaffiniteitbepalings. In Figuur 7.35 en Figuur 7.36 word die DNase I-afskermingsanalise van onderskeidelik die koderende DNA-string en die teenoorgestelde DNA-string van SV40 weergegee. Ap2-proteïene is in 'n toenemende proteïenkonsentrasie van 0 tot 1100 fmol by die DNA gevoeg, waar 1 μ l Ap2 (10-25 ng/ μ l) ekwivalent is aan 336 fmol. Drie afskermingsgebiede vir Ap2 soortgelyk aan dié waargeneem in Figuur 7.3, word op beide stringe waargeneem. Bindingsgebied 1 wat uit twee naasliggende Ap2-bindingsgebiede bestaan, is vir die koderende string afsonderlik gekwantifiseer. Op grond van die ligging van bindingsgebied 1 in die teenoorgestelde string, was die twee naasliggende bindingsgebiede egter moeilik onderskeibaar en is hulle as een bindingsgebied gekwantifiseer. Bindingsgebied 3 wat uit die kort bindingsvolgordes van Ap2 bestaan (Afdeling 7.2.2.1), is in beide gevalle as 'n enkele bindingsgebied gekwantifiseer. Afskerming vir bindingsgebied 1 en bindingsgebied 2, in die koderende string, is vanaf 75 fmol Ap2 waarneembaar.

A



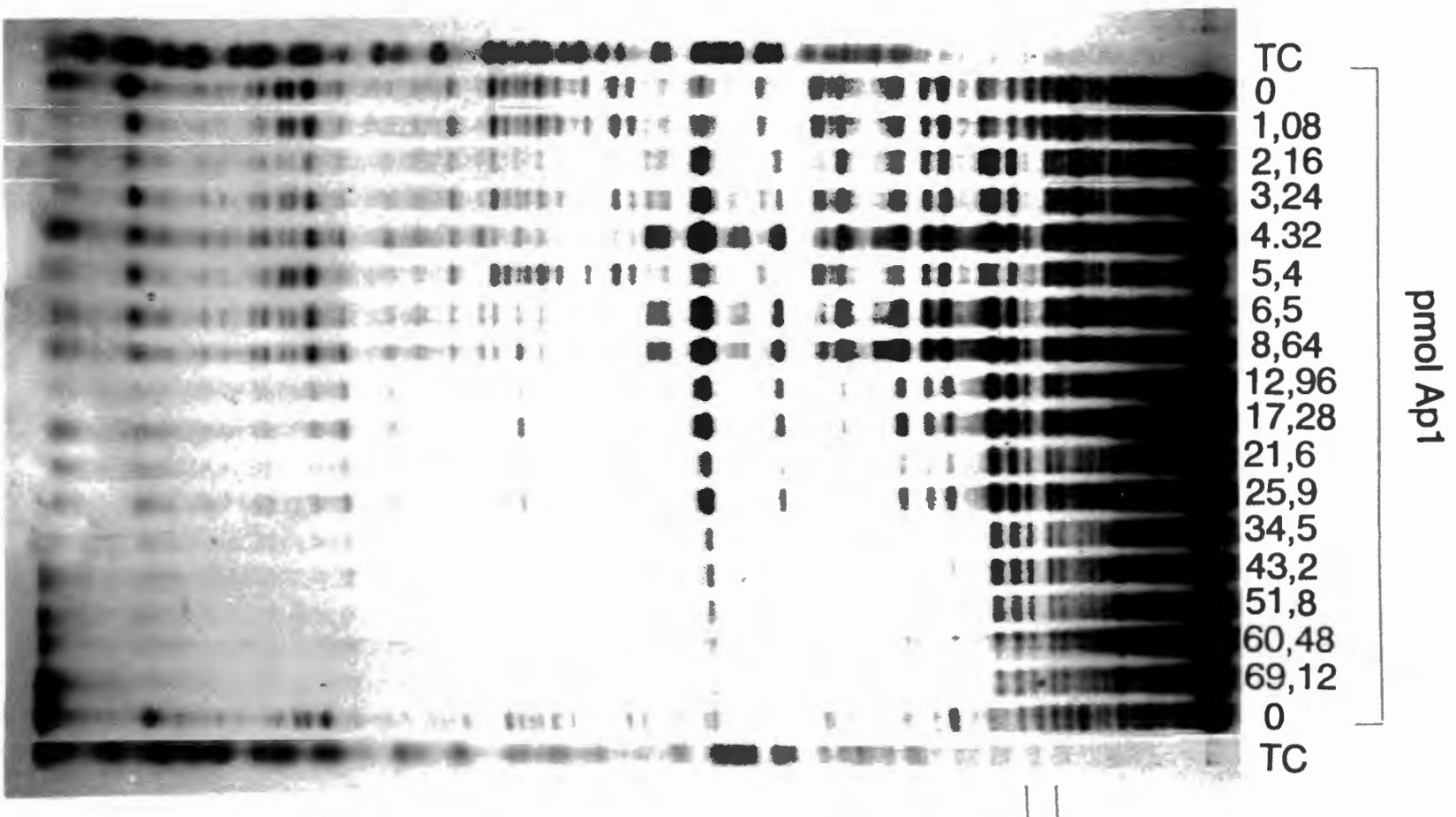
B



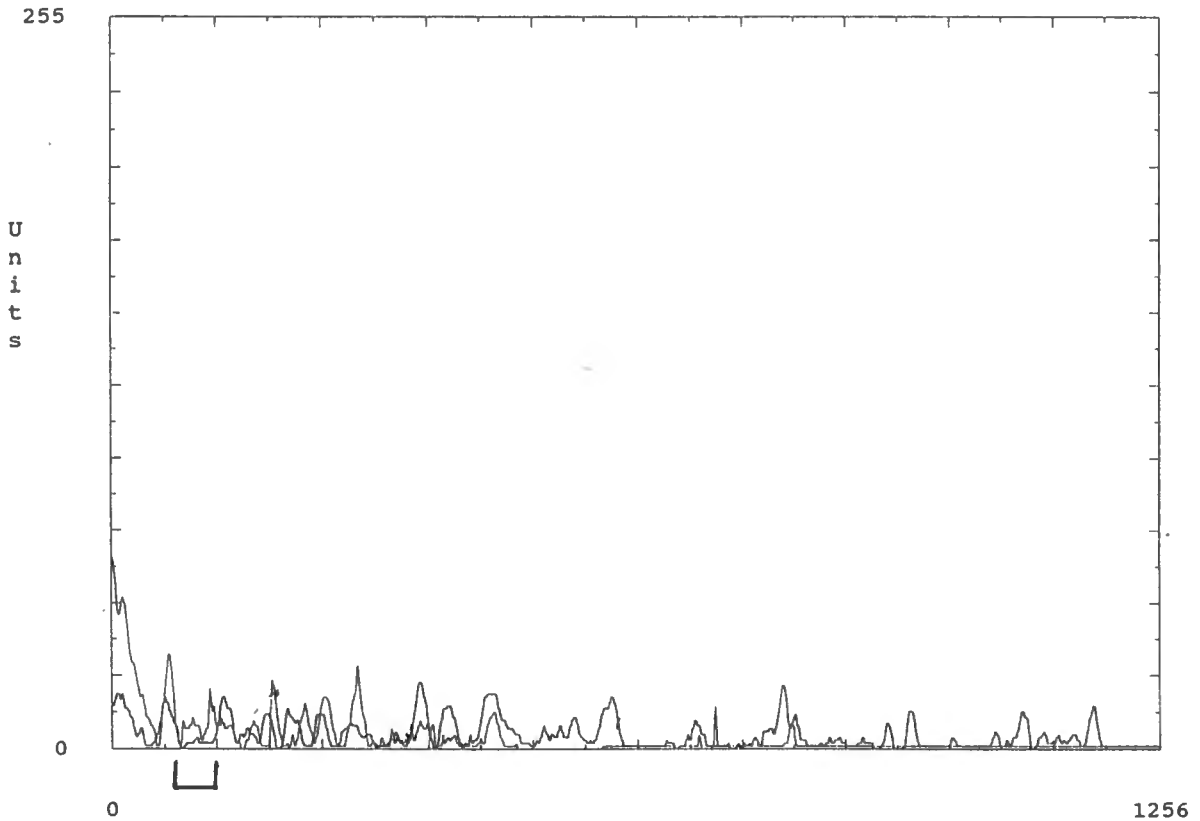
Figuur 7.33 DNase I-afskermingsanalise van die koderende string van die Sma I-fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap1-proteïenkonsentrasie.

- A: Die koderende string van die Sma I-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van toenemende Ap1-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Die DNA is op 'n 8% poli-akrielamiedgel geskei.
- B: Skanderingsprofile verkry na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 60,5 pmol Ap1-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om die bindingsgebied te identifiseer.

A



B



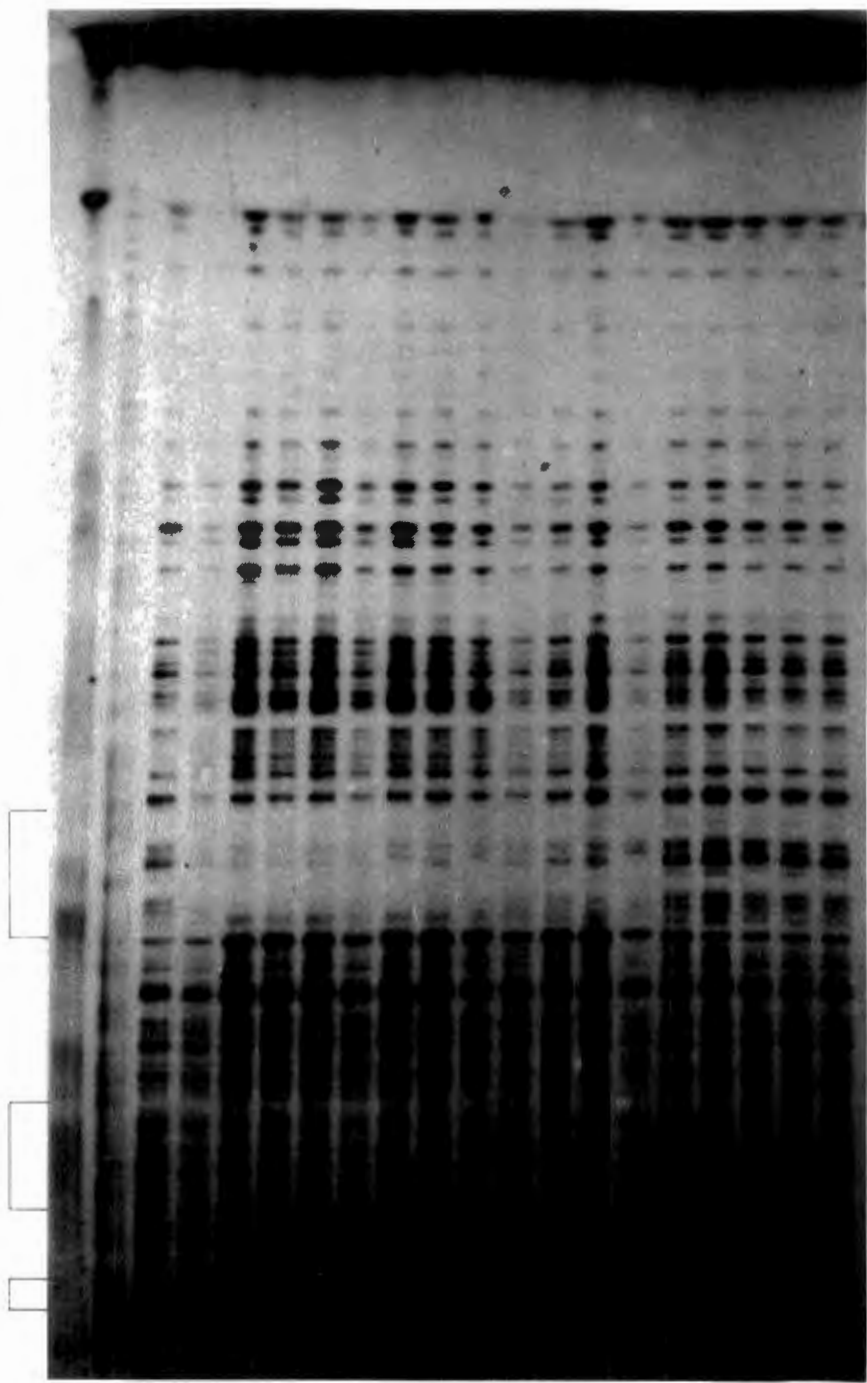
Figuur 7.34 DNase I-afskermingsanalyse van die teenoorgestelde DNA-string van die Sma I-fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap1-proteïenkonsentrasie.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Sma I-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van toenemende Ap1-proteïene aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% poli-akriëlamiedgel geskei. Die afskermingsgebied word langs die gel aangetoon.
- B: Skanderingsprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 69 pmol Ap1-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om die bindingsgebied te identifiseer.

Eco RI



Hind III

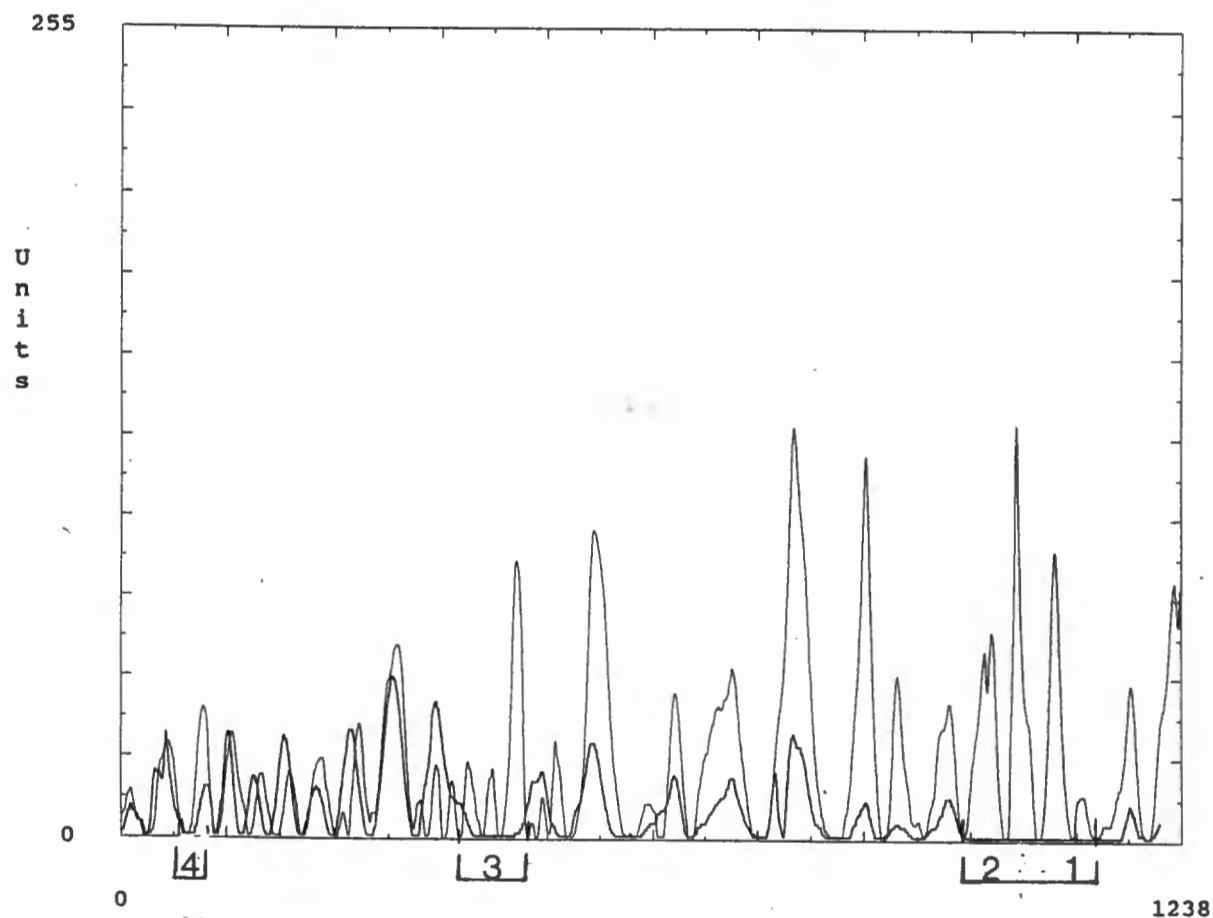


0
20
30
40
50
75
100
150
200
250
300
400
500
600
700
900
1100
GA
TC

fmol Ap2

A

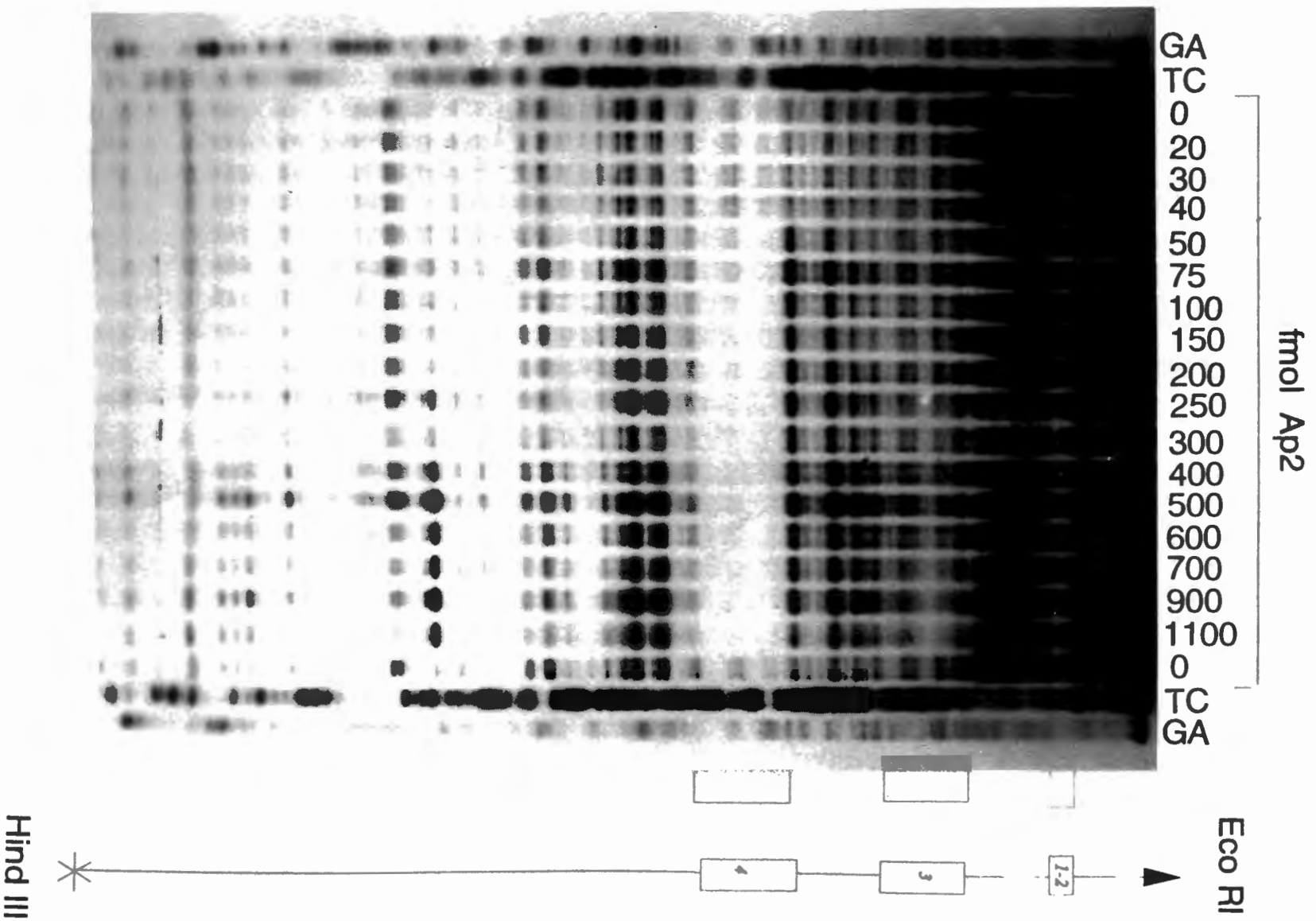
B



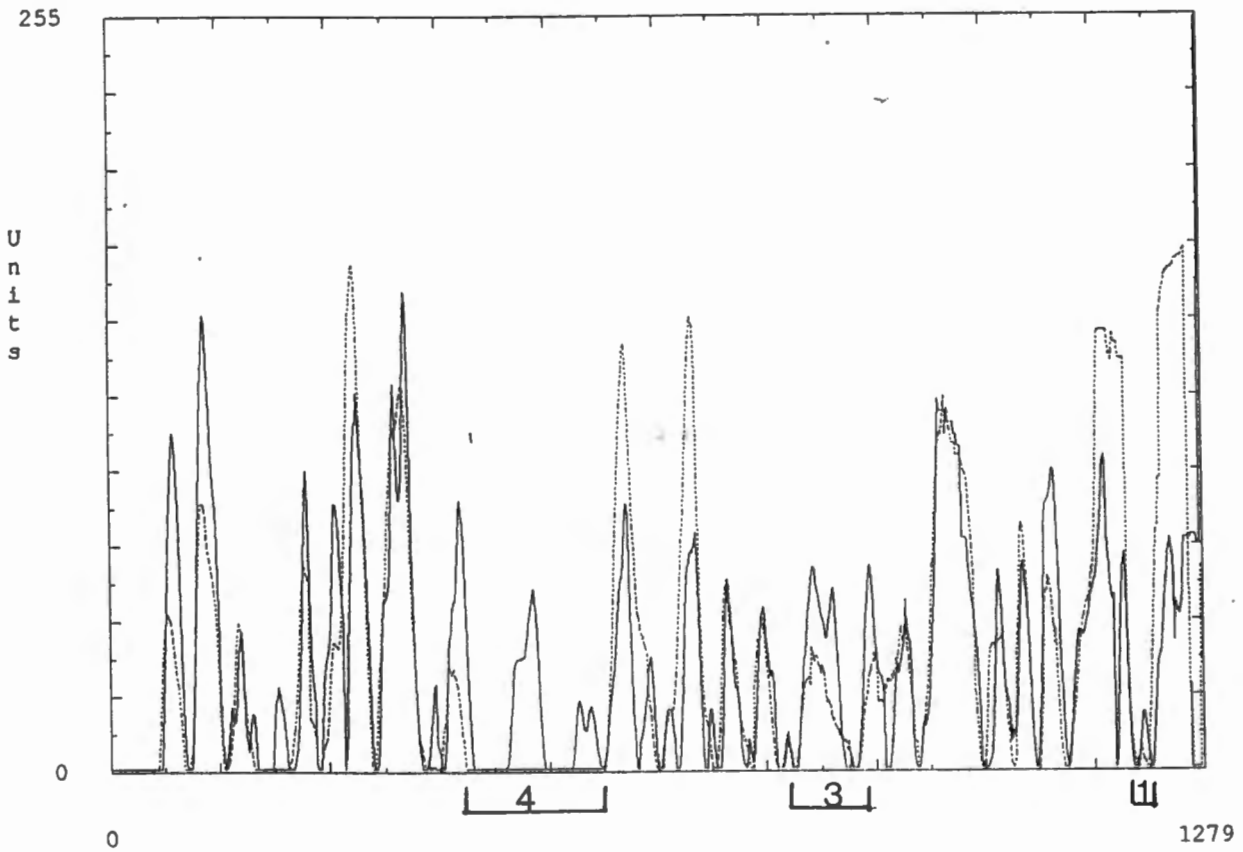
Figuur 7.35 DNase I-afskermingsanalyse van die koderende DNA-string van die SV40-fragment met toenemende Ap2-proteïene.

- A: Die koderende DNA-string van die SV40-fragment is in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepaling is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei.
- B: Skandeerprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede te identifiseer.

A



B



Figuur 7.36 DNase I-afskermingsanalyse van die teenoorgestelde DNA-string van die SV40-fragment met toenemende Ap2-proteïene.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die SV40-fragment is in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poli-akriëlamiedgel geskei.
- B: Skandeerprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede te identifiseer.

Bindingsgebied 3 op die koderende string vertoon afskerming vanaf 250 fmol Ap2, terwyl bindingsgebied 4 gedeeltelike afskerming vanaf 150 fmol Ap2 vertoon en volledige afskerming vanaf 250 fmol Ap2. Op die teenoorgestelde DNA-string (Figuur 7.36) word afskerming vir bindingsgebiede 1 en 2 vanaf 75 fmol Ap2 waargeneem. Bindingsgebied 3 vertoon gedeeltelike afskerming vanaf 250 fmol en bindingsgebied 4 vanaf 50 fmol Ap2. Volledige vertering vir bindingsgebied 4 is van 250 fmol Ap2 waarneembaar. Afskerming van DNA-volgordes kom dus ooreen tussen die twee DNA-stringe.

Densitometriese skandeerprofile van die "0"-baan of geen-proteïenbaan en die baan met die hoogste konsentrasie Ap2, naamlik 1100 fmol, is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede van die proteïen waar te neem (paneel B van Figuur 7.35 en Figuur 7.36). In alle gevalle kan verlaging of verdwyning van pieke in die baan met die hoogste konsentrasie Ap2 teenoor die van die geen-proteïenbaan waargeneem word en bindingsgebiede sodoende geïdentifiseer word. Die K-, Kd- en ΔG -waardes wat na densitometriese en vloeistofsintillasiespektrometrie kwantitatief vir elke bindingspunt bereken is, is in Tabel 7.15 weergegee.

**TABEL 7.15 BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG -WAARDES VAN AP2-BINDINGS-
BIEDE IN DIE SV40-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN VLOEI-
STOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

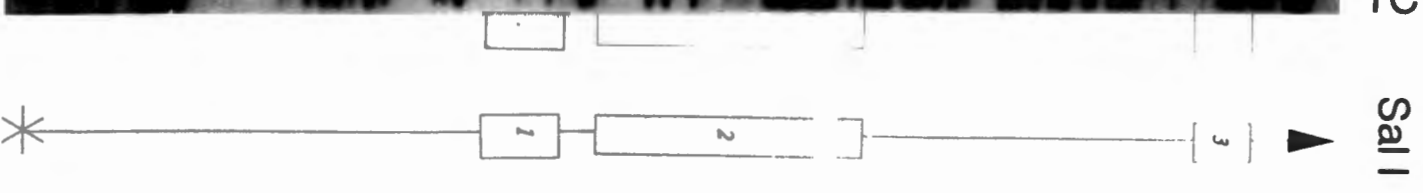
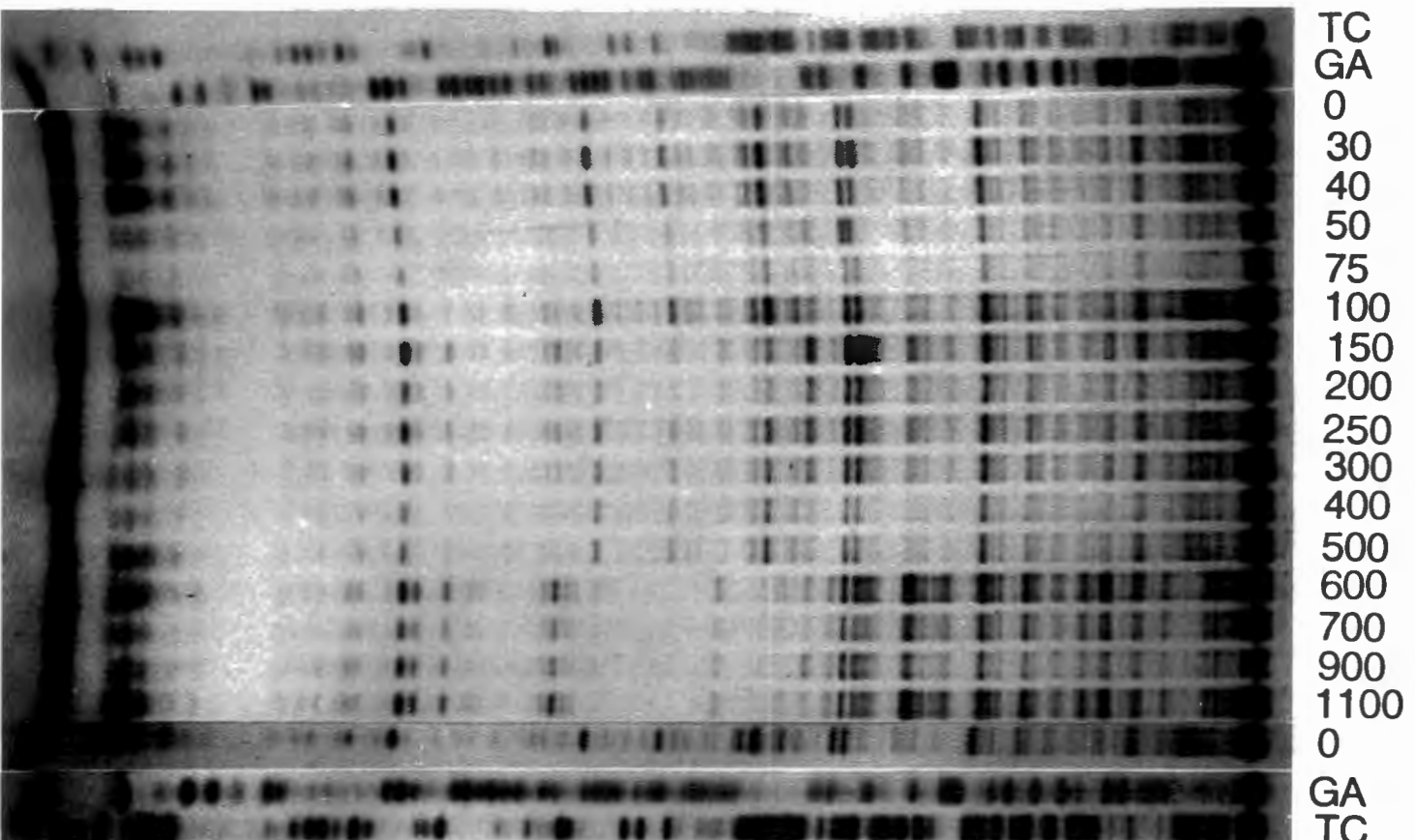
SV40 koderende DNA-string						
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie			
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	
1. 4,86 x 10 ¹²	2,05 x 10 ⁻¹³	-15,85	3,12 x 10 ¹²	3,20 x 10 ⁻¹³	-15,61	
2. 6,34 x 10 ¹²	1,57 x 10 ⁻¹³	-16,00	4,63 x 10 ¹²	2,15 x 10 ⁻¹³	-15,83	
3. 4,30 x 10 ¹¹	2,32 x 10 ⁻¹²	-14,54	1,36 x 10 ¹²	7,35 x 10 ⁻¹³	-15,16	
4. 2,89 x 10 ¹²	3,45 x 10 ⁻¹³	-15,57	3,00 x 10 ¹²	3,33 x 10 ⁻¹³	-15,59	
SV40 teenoorgestelde DNA-string						
1. 3,33 x 10 ¹³	3,0 x 10 ⁻¹⁴	-16,90	1,14 x 10 ¹³	8,77 x 10 ⁻¹⁴	-16,32	
3. 1,40 x 10 ¹¹	7,10 x 10 ⁻¹²	-13,93	1,36 x 10 ¹²	7,35 x 10 ⁻¹³	-15,16	
4. 2,43 x 10 ¹³	4,10 x 10 ⁻¹⁴	-16,72	2,70 x 10 ¹²	3,70 x 10 ⁻¹³	-15,53	

Soos waargeneem kan word uit die waardes van Tabel 7.15, is die vrye energie-waardes van gebied 1 in die teenoorgestelde DNA-string hoog. In die teenoorgestelde DNA-string is Ap2-bindingsgebiede 1 en 2 saam gekwantifiseer, wat die hoër affiniteitswaarde en vrye energiewaarde van hierdie gebied tot die waardes in dieselfde gebiede in die koderende string verklaar. Daarteenoor vertoon die waardes van Ap2-bindingsgebied 3 wat afskerming vir die verkorte Ap2-bindingsvolgorde gee, 'n laer K-waarde en vrye energiewaarde as vir al die ander bindingsgebiede in die fragment. Derhalwe kan hierdie Ap2-bindingsgebied as 'n gebied met 'n laer affiniteit vir Ap2 beskou word. Die bindingsaffiniteit wat vir Ap2 vir die SV40-DNA verkry is, korreleer nie goed met dié van die literatuur nie. Mitchell *et al.* (1987), het bevind dat gebied 1, 'n hoër affiniteit vir die DNA het, terwyl die ander gebiede lae affiniteit vertoon. Hierdie verskille is waarskynlik aan verskille in eksperimentele en kwantifiseringsmetodes te wyte.

'n Ap2-konsentrasiereeks is ook op die kollageenfragmente uitgevoer. Paneel A van Figuur 7.37 en Figuur 7.38 toon die DNase I-afskermingsanalise van onderskeidelik die koderende string en die teenoorgestelde DNA-string van die Eco RV - Pvu II-kollageenfragment. Op die koderende string word drie afskermingsgebiede waargeneem en twee op die teenoorgestelde string. Analises van Figuur 7.4 het getoon dat afskermingsgebied 1 vir Ap2 uit twee Ap2-bindingsgebiede bestaan. In Figuur 7.37 is die DNase I-afskermingsanalise op 'n 8% poli-akrielamiedgel uitgevoer, terwyl dit in Figuur 7.4 op 'n 6% gel uitgevoer is. Hierdie verskil het daartoe aanleiding gegee dat afskermingsgebied 1 vir Ap2 in Figuur 7.37 meer gefragmenteerd voorkom en die twee bindingsgebiede dus afsonderlik waargeneem kan word. Afskerming vir al drie bindingsgebiede op die koderende string (Figuur 7.37) is waarneembaar vanaf 600 fmol Ap2. Op die teenoorgestelde string (Figuur 7.38) is afskerming in gebied 2 vanaf 300 fmol en gebied 3 vanaf 200 fmol Ap2 sigbaar. 'n Verlaagde Ap2-aktiwiteit is waarskynlik in Figuur 7.37 verantwoordelik vir die feit dat al drie bindingsgebiede eers vanaf 600 fmol Ap2-afskerming vertoon, terwyl dit in die teenoorgestelde string (Figuur 7.4) reeds vanaf 342 fmol Ap2 sigbaar is. Densitometriesse skanderingsprofile is in paneel B van die figure aangetoon. Twee profile, naamlik dié van die geen-proteïenbaan en dié van die baan met die

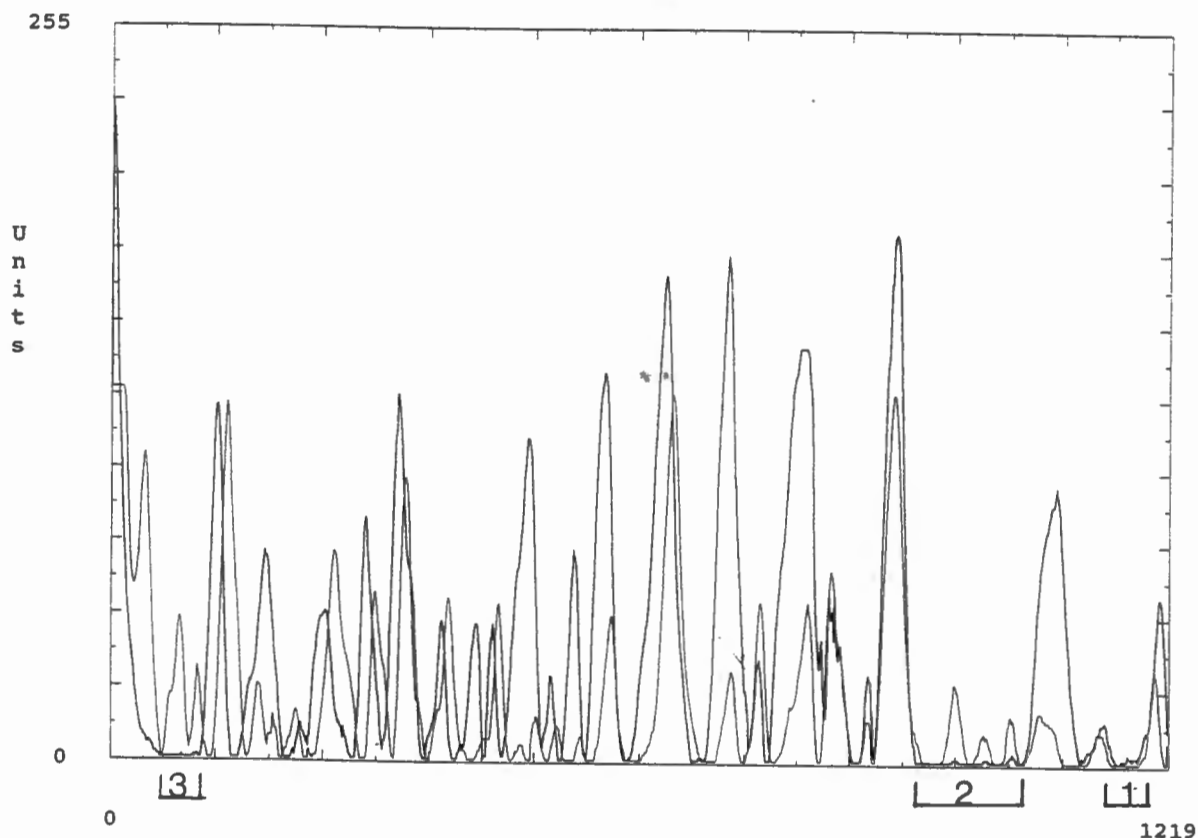
A

fmol Ap2



Eco RI

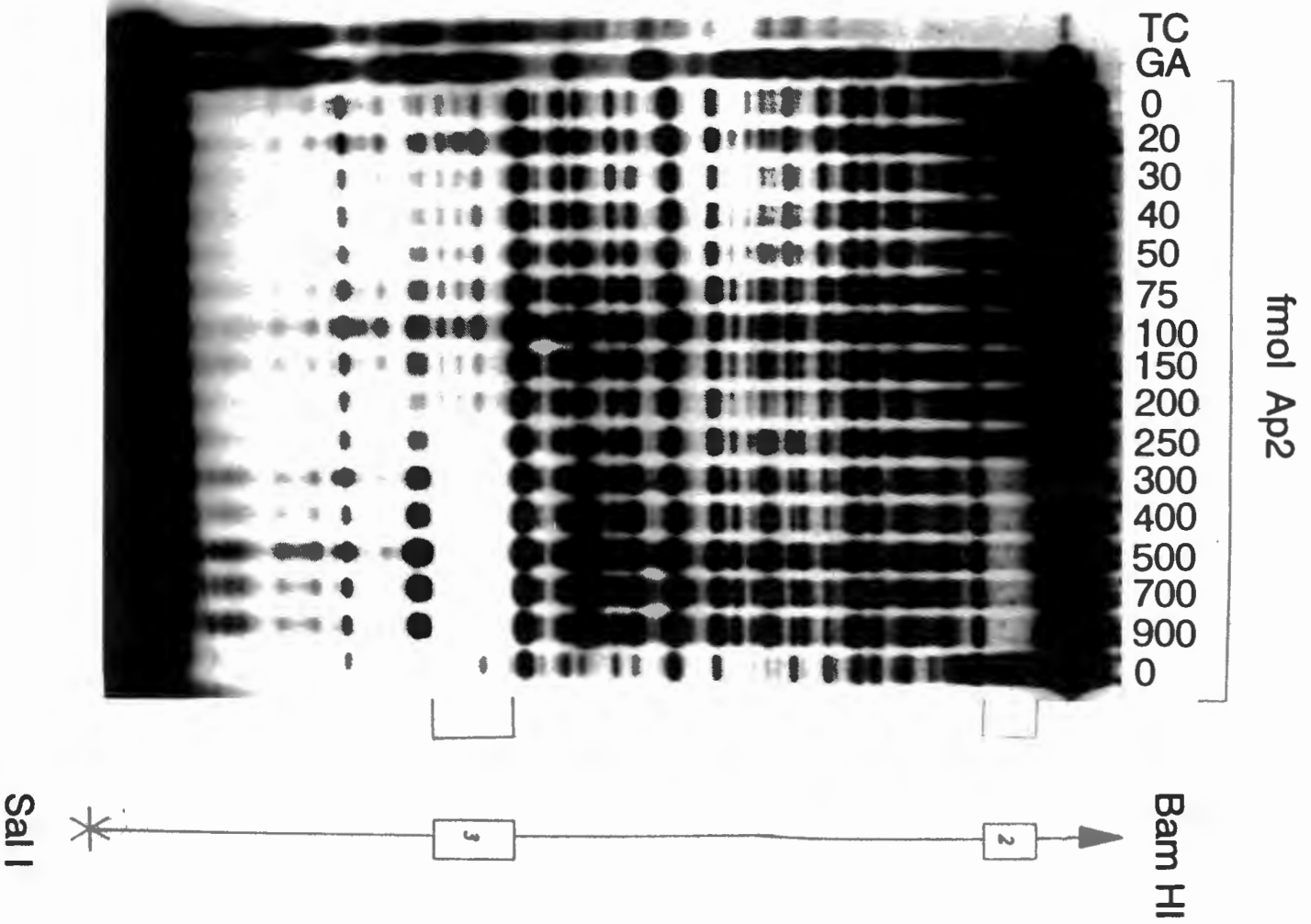
B



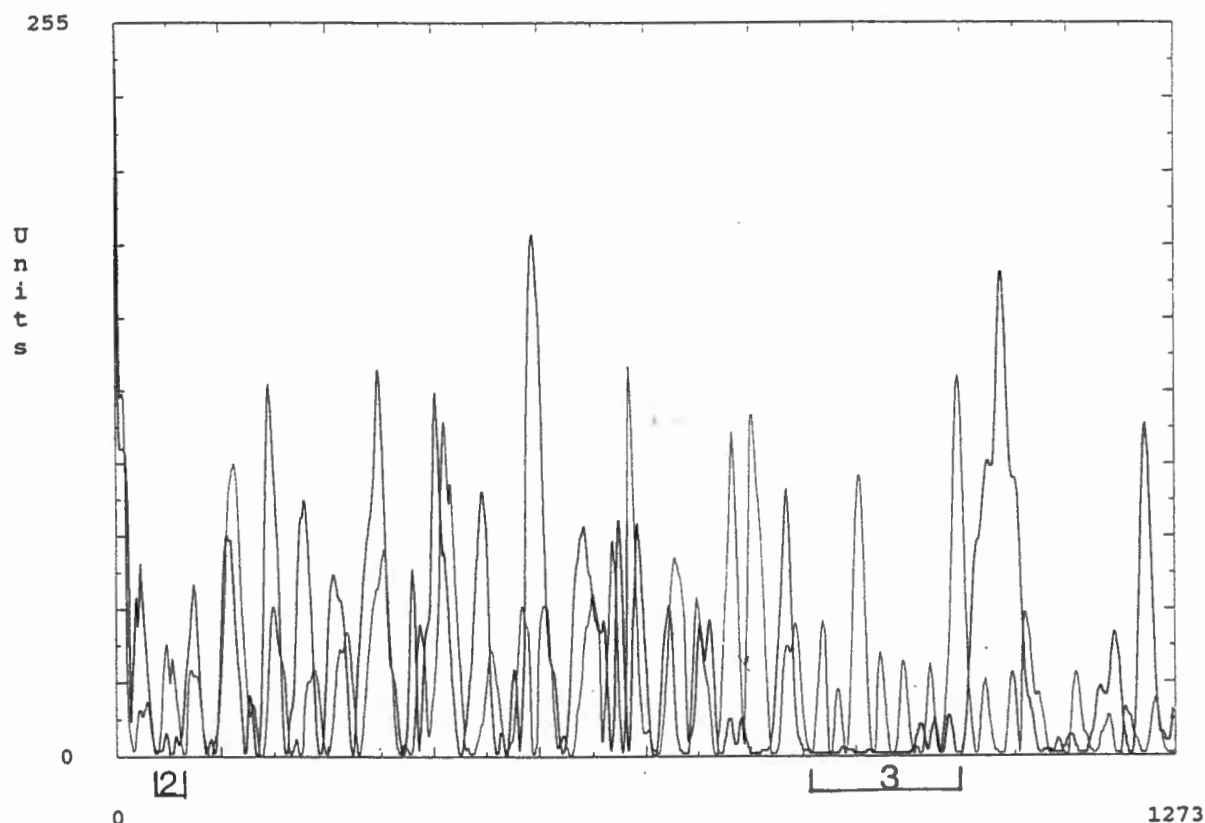
Figuur 7.37 DNase I-afskermingsanalyse van die koderende string van die Eco RV - Pvu II-fragment met toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie.

- A: Die konsensusstring van die Eco RV - Pvu II-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïene aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skandeerprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede aan te dui.

A



B



Figuur 7.38 DNase I-afskermingsanalise van die teenoorgestelde Eco RV - Pvu II fragment met toenemende Ap2-proteïene.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Eco RV - Pvu II-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poliakriëlamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skandeerprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 900 fmol Ap2-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede aan te dui.

hoogste Ap2-konsentrasie is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede te identifiseer. Die K-, Kd- en ΔG -waardes van hierdie bindingsgebiede na kwantifisering is in Tabel 7.16 weergegee.

**TABEL 7.16 BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG -WAARDES VAN AP2-BINDINGS-
GEBIEDE IN DIE Eco RV - Pvu II-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE
EN VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

Eco RV - Pvu II koderende DNA-string					
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie		
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)
1. 1,73 x 10 ¹²	5,78 x 10 ⁻¹³	-15,29	2,91 x 10 ¹²	3,43 x 10 ⁻¹³	-15,57
2. 9,87 x 10 ¹²	1,01 x 10 ⁻¹³	-16,24	2,91 x 10 ¹²	3,43 x 10 ⁻¹³	-15,57
3. 1,81 x 10 ¹¹	5,52 x 10 ⁻¹²	-14,07	2,24 x 10 ¹²	4,46 x 10 ⁻¹³	-15,43
Eco RV - Pvu II teenoorgestelde DNA-string					
2. 2,08 x 10 ¹³	4,80 x 10 ⁻¹⁴	-16,66	5,75 x 10 ¹²	1,74 x 10 ⁻¹³	-15,96
3. 1,52 x 10 ¹²	6,57 x 10 ⁻¹³	-15,23	9,03 x 10 ¹¹	1,10 x 10 ⁻¹²	-14,95

Die hoër waardes in bindingsgebied 2 van die teenoorgestelde DNA-string kan verklaar word deurdat bindingsgebiede 1 en 2 tesame gekwantifiseer is. Uit die waardes wat verkry is, wil dit verder voorkom of bindingsgebiede 1 en 2 'n medium tot hoë affiniteit vir Ap2 het, terwyl die laer waardes in bindingsgebied 3 'n lae bindingsaffiniteit vir Ap2 toon.

DNase I-afskermingsanalise is ook op fragment Cla I - Xba I op beide stringe uitgevoer. In die geval van die koderende DNA-string is Ap2-proteïene in 'n toenemende konsentrasie tot 1100 fmol toegevoeg terwyl dit vir die teenoorgestelde DNA-string tot 1050 fmol bygevoeg is. Drie afskermingsgebiede vir Ap2 soortgelyk aan die gebiede wat in Figuur 7.5 waargeneem is, is weer eens verkry.

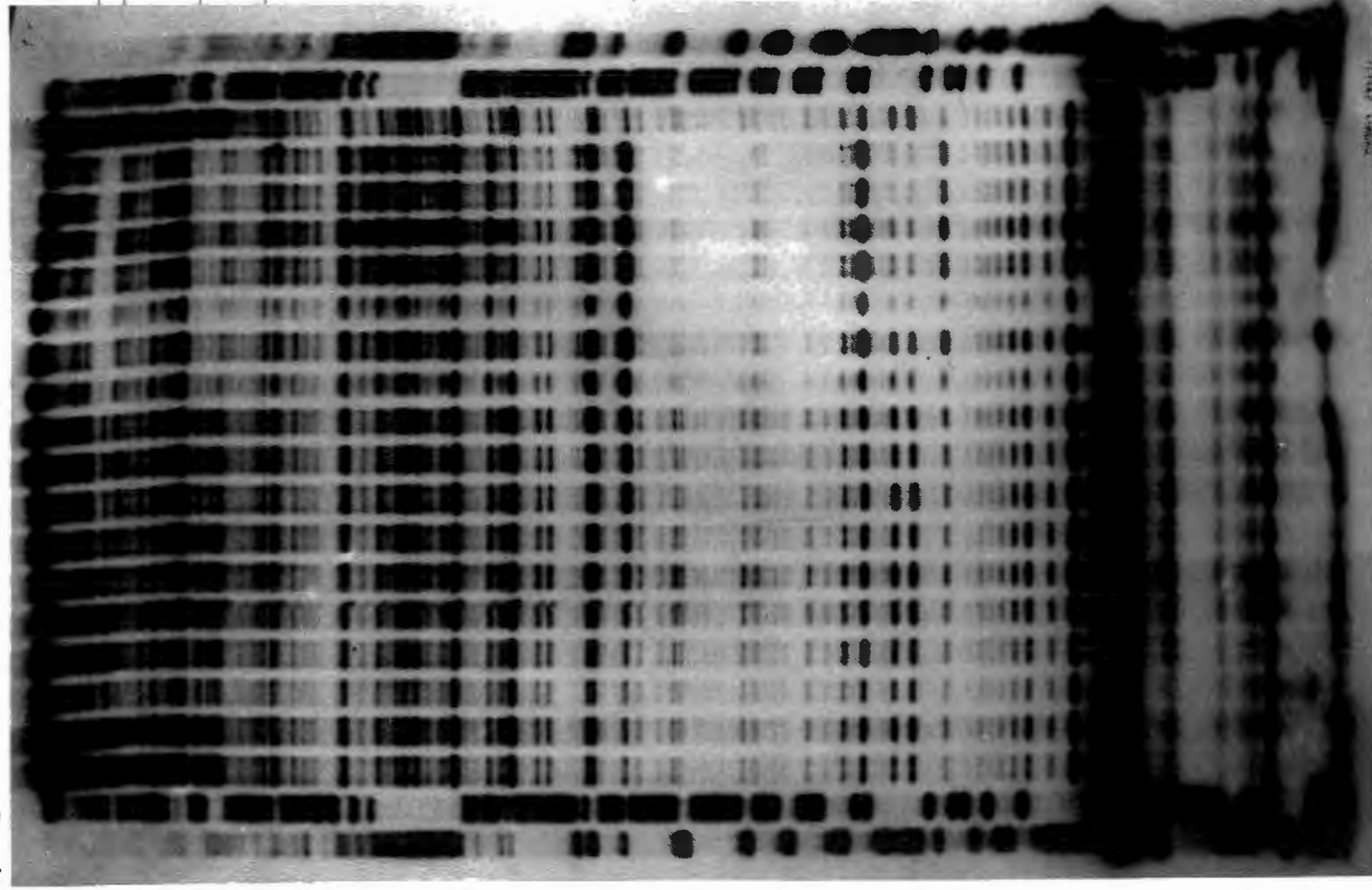
Elk van die bindingsgebiede is afsonderlik gekwantifiseer. Soos uit die figure waargeneem kan word, vind gedeeltelike afskerming van die eerste bindingsgebied, wat uit drie Ap2-bindingspunte bestaan, vanaf 200 fmol Ap2 by die koderende string (Figuur 7.39) sowel as die teenoorgestelde string (Figuur 7.40) plaas. Volledige afskerming kan vanaf 300 fmol Ap2 op die koderende string waargeneem word. Afskermingsgebied 2 toon afskerming op die koderende string vanaf 300 fmol en op die teenoorgestelde string vanaf 550 fmol. Tekens van afskerming word by afskermingsgebied 3 bindingspunt 7 vanaf 150 en 200 fmol Ap2 waargeneem op die koderende string en volledige afskerming word vanaf 300 fmol waargeneem. Op die teenoorgestelde string kom daar vir gebied 3 ook afskerming vanaf 200 fmol voor, terwyl totale afskerming vanaf 700 fmol waargeneem word. Die verskille in afskerming is dikwels te wyte aan verlaging in die proteïenaktiwiteit van die Ap2 as gevolg van eksterne faktore en buiten ander eksperimentele foute, die feit dat die DNA-konsentrasies nie altyd ekwivalent is nie. Laasgenoemde is daaraan te wyte dat 5 μ l-gemerke DNA direk na merking vir die DNase I-afskermingsanalise gebruik word en verliese tydens merking en presipitering nie vooraf bepaal word nie (Afdeling 3.3).

Densitometrie skandeerprofile van elke afskermingsgebied is in paneel B van die figure gegee. Deur die baanprofiel van die hoogste Ap2-proteïenkonsentrasie bo-op die geen-proteïenbaanprofiel te projekteer, kan bindingsgebiede aangetoon word deur waarneming van die veranderinge in die pieke. Na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie is die K-, K_d- en G-waardes van elke bindingspunt kwantitatief bepaal (Tabel 7.17).

A

fmol Ap2

TC GA 0 20 30 40 50 75 100 150 200 250 300 400 500 600 700 900 1100 TC GA

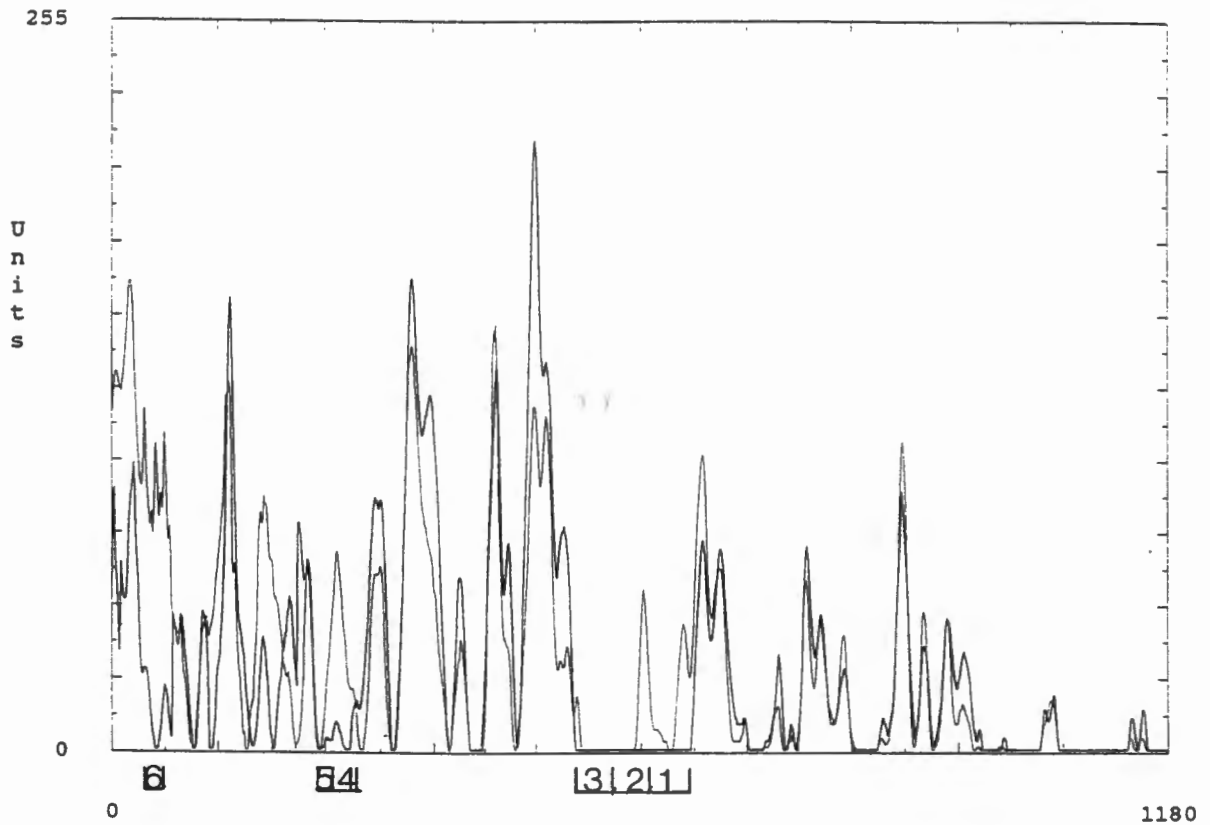


Bam HI



Sal I

B



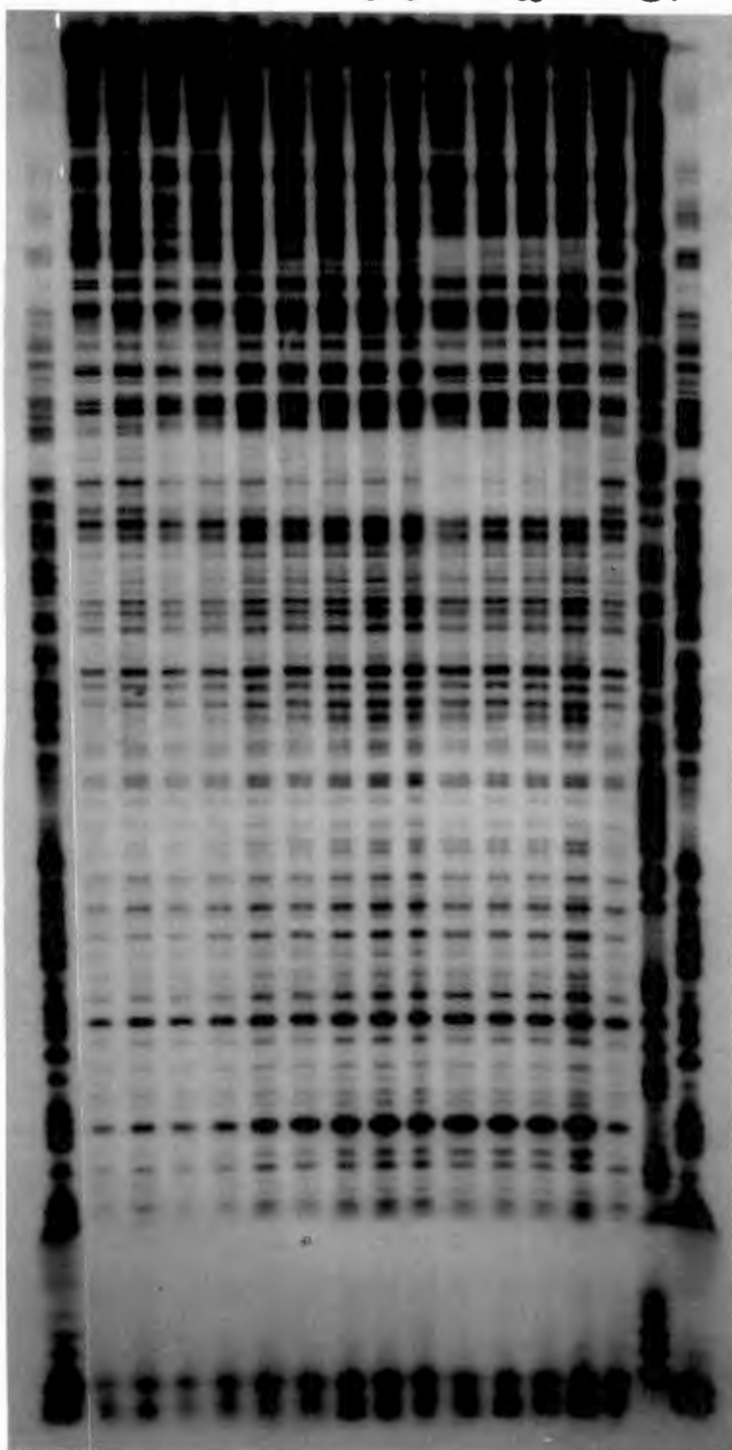
Figuur 7.39 DNase I-afskermingsanalise van die koderende string van die Cla I - Xba I-fragment met toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie.

- A: Die koderende DNA-string van die Cla I - Xba I- kollageenfragment is in die teenwoordigheid van 'n toenemende konsentrasie Ap2-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denature-rende poli-akriëlamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skandeerprofiele na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede te identifiseer.

A

fmol Ap2

TC 0 100 200 300 350 450 550 600 650 700 750 850 1050 0 GA TC



Sal I

3

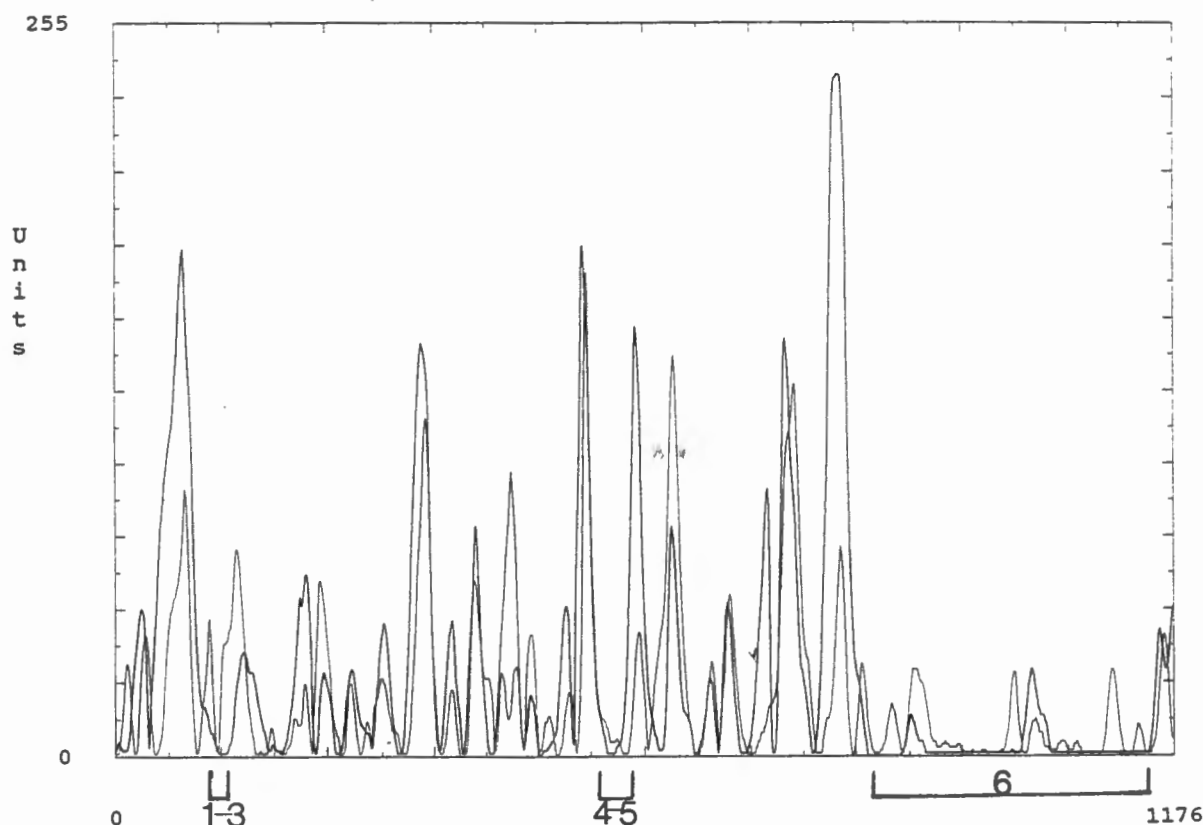
4.5

6

*

Eco RI

B



Figuur 7.40 DNase I-afskermingsanalise van die teenoorgestelde DNA-string van die Cla I - Xba I-fragment en toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Cla I - Xba I-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van toenemende konsentrasies Ap2 aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poliakriëlamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skandeerprofile na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1050 fmol baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede te identifiseer.

**TABEL 7.17 BEREKENDE K-, Kd- EN Δ G-WAARDES VAN AP2-BINDINGS-
GEBIEDE IN DIE Cla I - Xba I-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN
VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

Cla I - Xba I koderende string						
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie			
K (mol ⁻¹)		Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	Δ G (kcal/mol)
1.	3,27 x 10 ¹³	3,05 x 10 ⁻¹⁴	-16,89	1,12 x 10 ¹¹	8,93 x 10 ⁻¹²	-13,81
2.	2,18 x 10 ¹³	4,68 x 10 ⁻¹⁴	-16,67	4,34 x 10 ¹¹	2,30 x 10 ⁻¹²	-14,54
3.	2,98 x 10 ¹³	3,35 x 10 ⁻¹⁴	-16,84	6,59 x 10 ¹¹	1,51 x 10 ⁻¹²	-14,77
4.	1,85 x 10 ¹²	5,40 x 10 ⁻¹³	-15,33	3,70 x 10 ¹¹	2,69 x 10 ⁻¹²	-14,46
5.	4,11 x 10 ¹¹	2,43 x 10 ⁻¹²	-14,51	5,23 x 10 ¹¹	1,91 x 10 ⁻¹²	-14,64
6.	3,98 x 10 ¹⁰	2,51 x 10 ⁻¹¹	-13,25	8,14 x 10 ¹¹	1,22 x 10 ⁻¹²	-14,88
Cla I - Xba I teenoorgestelde string						
1-3.	1,87 x 10 ¹²	5,32 x 10 ⁻¹³	-15,33	4,04 x 10 ¹¹	2,47 x 10 ⁻¹²	-14,50
4-5.	1,05 x 10 ¹¹	9,47 x 10 ⁻¹²	-13,77	8,14 x 10 ¹¹	1,22 x 10 ⁻¹²	-14,88
6.	6,36 x 10 ¹²	1,57 x 10 ⁻¹³	-16,00	5,12 x 10 ¹²	1,95 x 10 ⁻¹³	-15,88

Kwantitatiewe bepaling van al die Ap2-bindingspunte in die verskillende Ap2-afskermingsgebiede op die teenoorgestelde string was as gevolg van die posisie van die onderskeie bindingspunte op die gel nie moontlik nie. Gevolglik is die totale afskermingsgebiede in hierdie gevalle gekwantifiseer. Ten spyte daarvan dat verval van die radioaktiefgemerkte peilers in berekening gebring is, toon waardes soos veral die wat by die vrye energiewaardes waargeneem kan word, 'n ordegrootte waarde laer by die vloeistofsintillasiespektrometrie as die waardes na densitometrie. Dit kom egter uit die verkreeë waardes voor dat Ap2-bindingsgebiede 1 tot 3 hoë affiniteitsbinding vertoon, bindingsgebiede 4-6 'n laer affiniteitsbinding vertoon en bindingsgebied 7 weer eens 'n hoë affiniteit vir Ap2 binding vertoon.

In Figuur 7.41 word die DNase I-afskermingsanalise van die koderende string van die Xba I - Sac I-kollageenfragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie vertoon en in Figuur 7.42 die teenoorgestelde string van die fragment. By beide stringe is die Ap2-proteïenkonsentrasie verhoog tot 1100 fmol en is twee afskermingsgebiede vir Ap2 waargeneem. Hierdie afskermingsgebiede

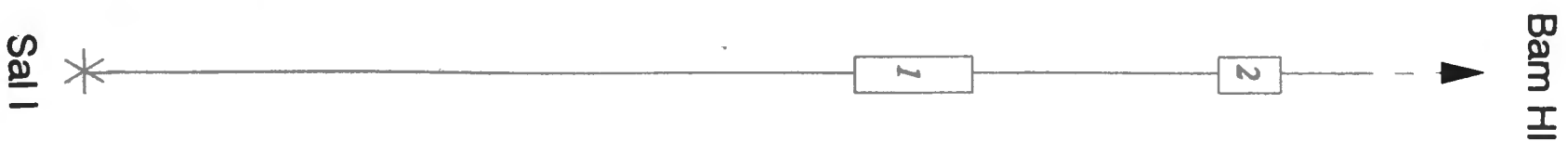
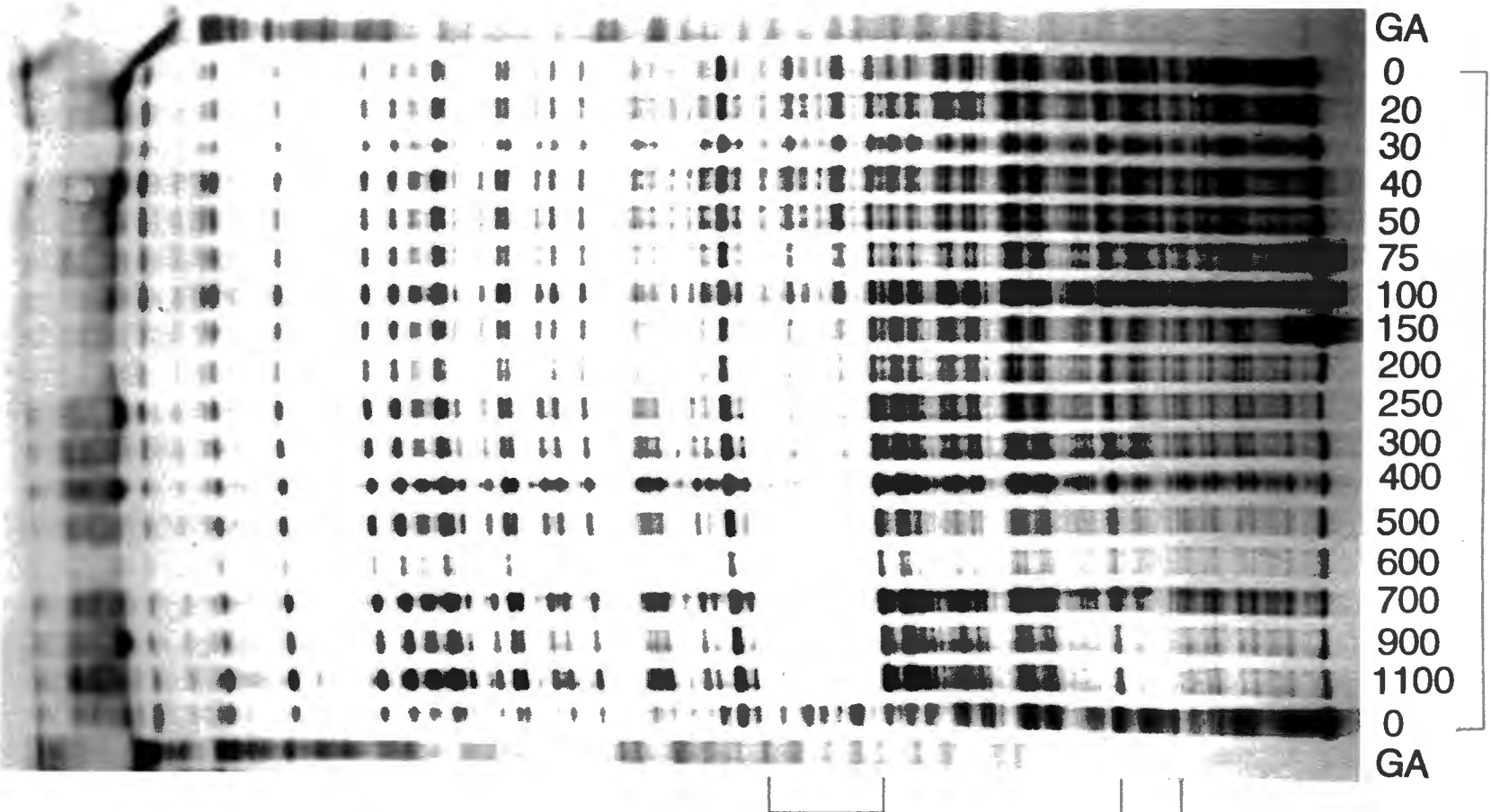
kom ooreen met dié wat in Figuur 7.6 verkry is. Afskermingsgebied 1 vertoon op beide stringe afskerming vanaf 400 fmol Ap2. Die tweede afskermingsgebied toon afskerming vanaf 250 fmol op beide stringe. Densitometrie se profiele na skandering van die geen-proteïenbaan en die 1100 fmol Ap2-baan is bo-op mekaar geprojekteer en in paneel B van die twee figure weergegee. In beide gevalle kan die afname en verdwyning van pieke duidelik waargeneem word en is die betrokke pieke gekwantifiseer. Die verkreeë K-waardes, sowel as die berekende Kd- en ΔG -waardes is in Tabel 7.18 weergegee.

**TABEL 7.18 BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG -WAARDES VAN AP2 BINDINGS-
GEBIEDE IN DIE Xba I - Sac I-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN
VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

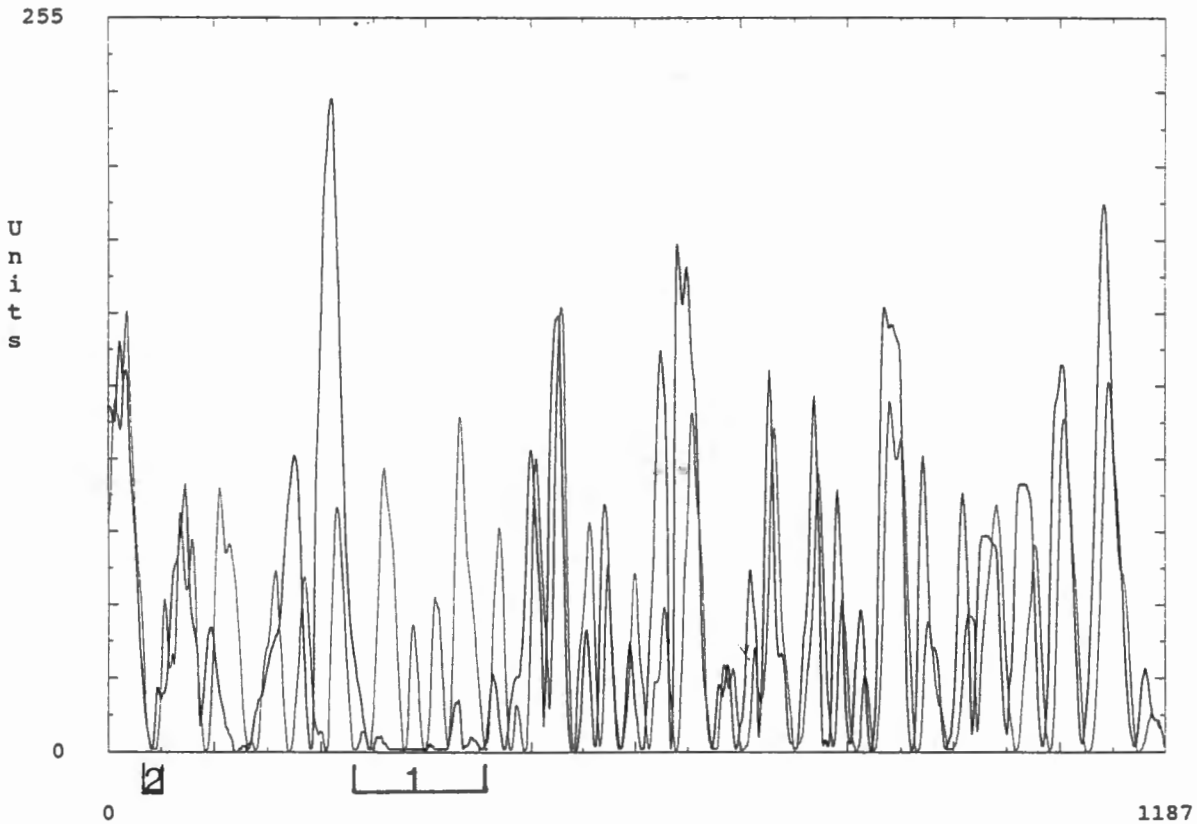
Xba I - Sac I koderende string						
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie			
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	
1. 1,78 x 10 ¹²	5,60 x 10 ⁻¹³	-15,31	3,07 x 10 ¹²	3,25 x 10 ⁻¹³	-15,60	
2. 6,53 x 10 ¹¹	2,26 x 10 ⁻¹²	-14,76	2,40 x 10 ¹²	4,16 x 10 ⁻¹³	-15,47	
Xba I - Sac I teenoorgestelde string						
1. 9,16 x 10 ¹²	1,09 x 10 ⁻¹³	-16,20	4,23 x 10 ¹²	2,36 x 10 ⁻¹³	-15,78	
2. 6,7 x 10 ¹²	1,49 x 10 ⁻¹³	-16,03	1,94 x 10 ¹²	5,15 x 10 ⁻¹³	-15,35	

Hoewel die Kd-waardes vir bindingsgebied 1 'n hoë affiniteitsbinding aantoon, is die vrye energiewaarde meer in die omgewing van medium affiniteit. Bindingsgebied 2 toon variërende waardes van laag by die koderende string tot medium affiniteit by die teenoorgestelde string. As egter na die globale prentjie gekyk word en die vrye energiewaardes in ag geneem word sowel as die feit dat die gebied by 250 fmol Ap2 tekens van afskerming toon, kan aanvaar word dat hierdie gebied 'n medium affiniteitbindingsgebied is.

A



B

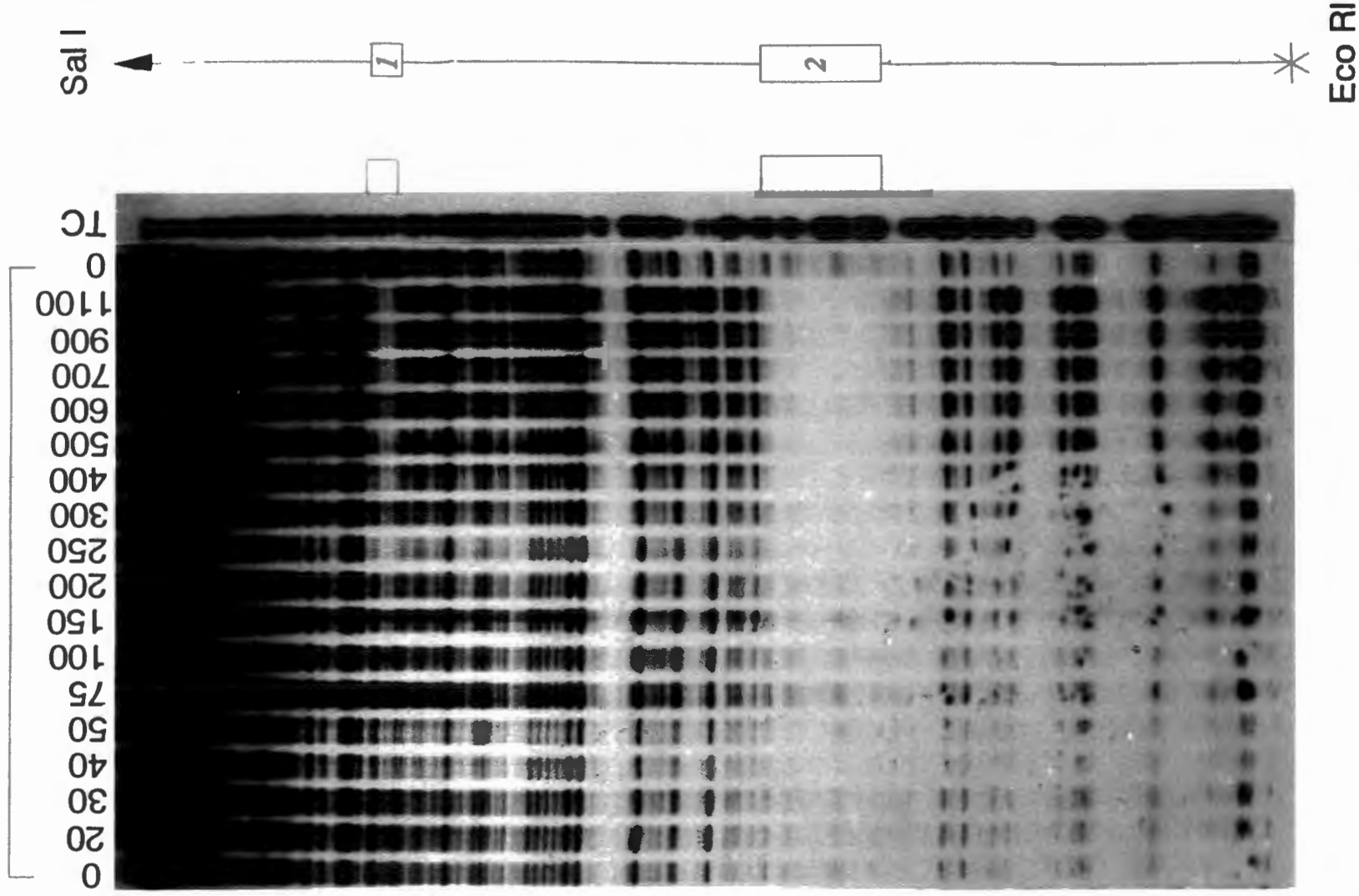


Figuur 7.41 DNase I-afskermingsanalise van die koderende string van die Xba I - Sac I-fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie.

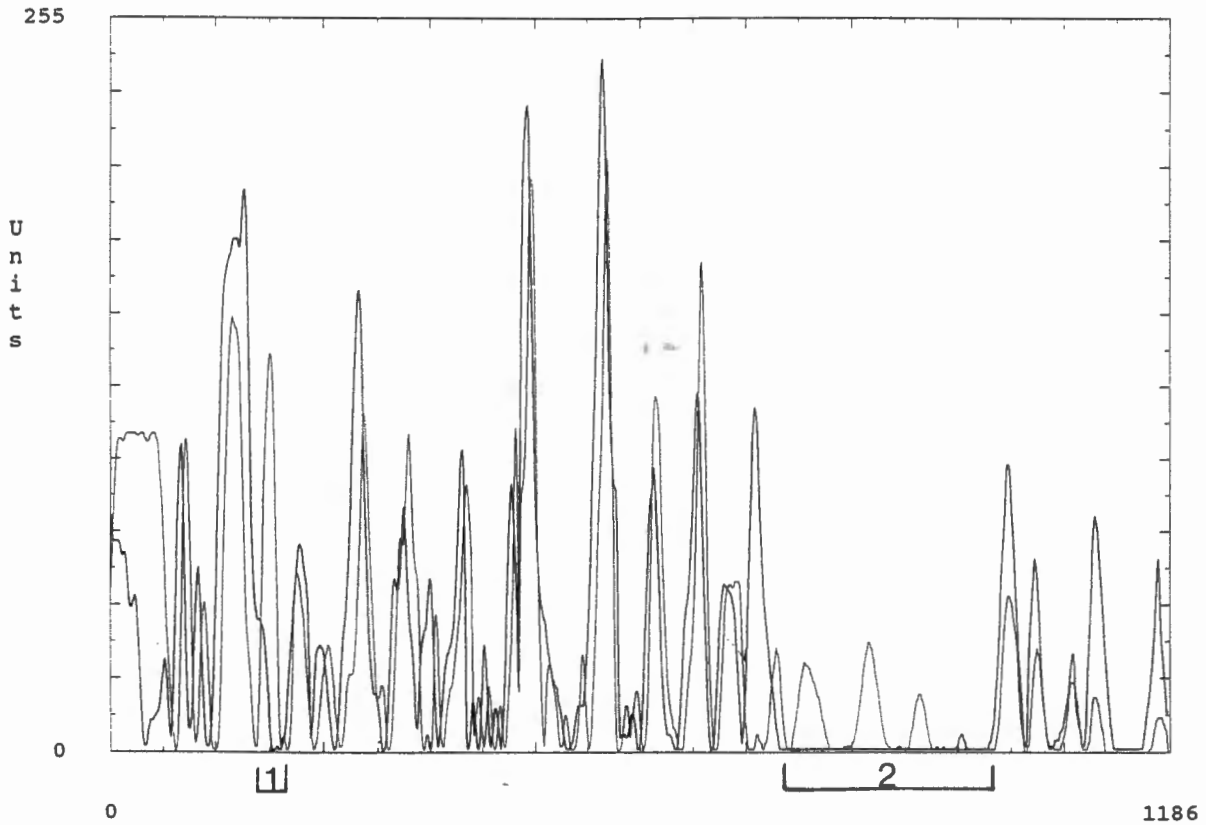
- A: Die konsensusstring van die Xba I - Sac I-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van 'n toenemende Ap2-konsentrasie van DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poli-akriëlamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skandeerprofile verkry na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede te identifiseer.

A

fmol Ap2



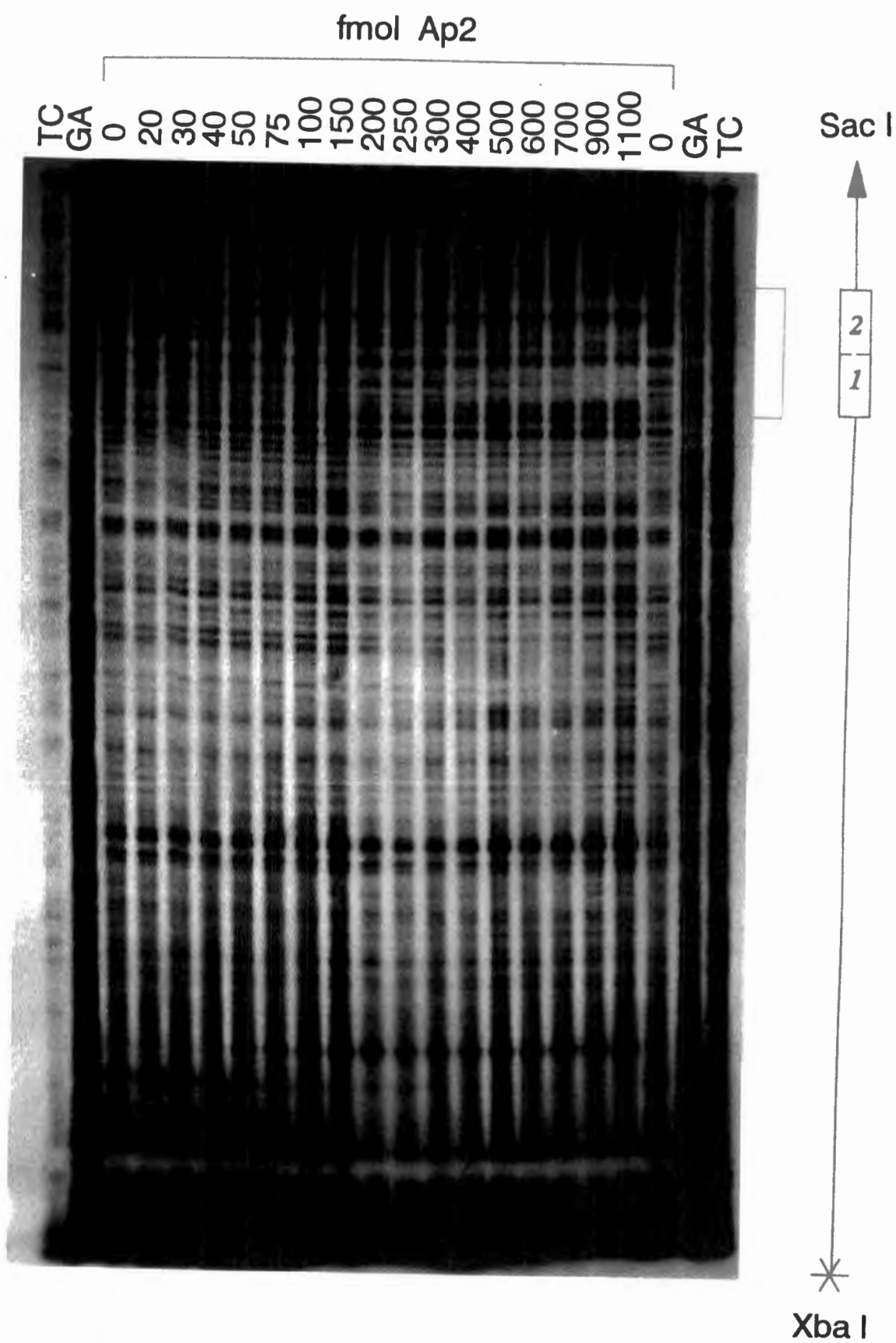
B



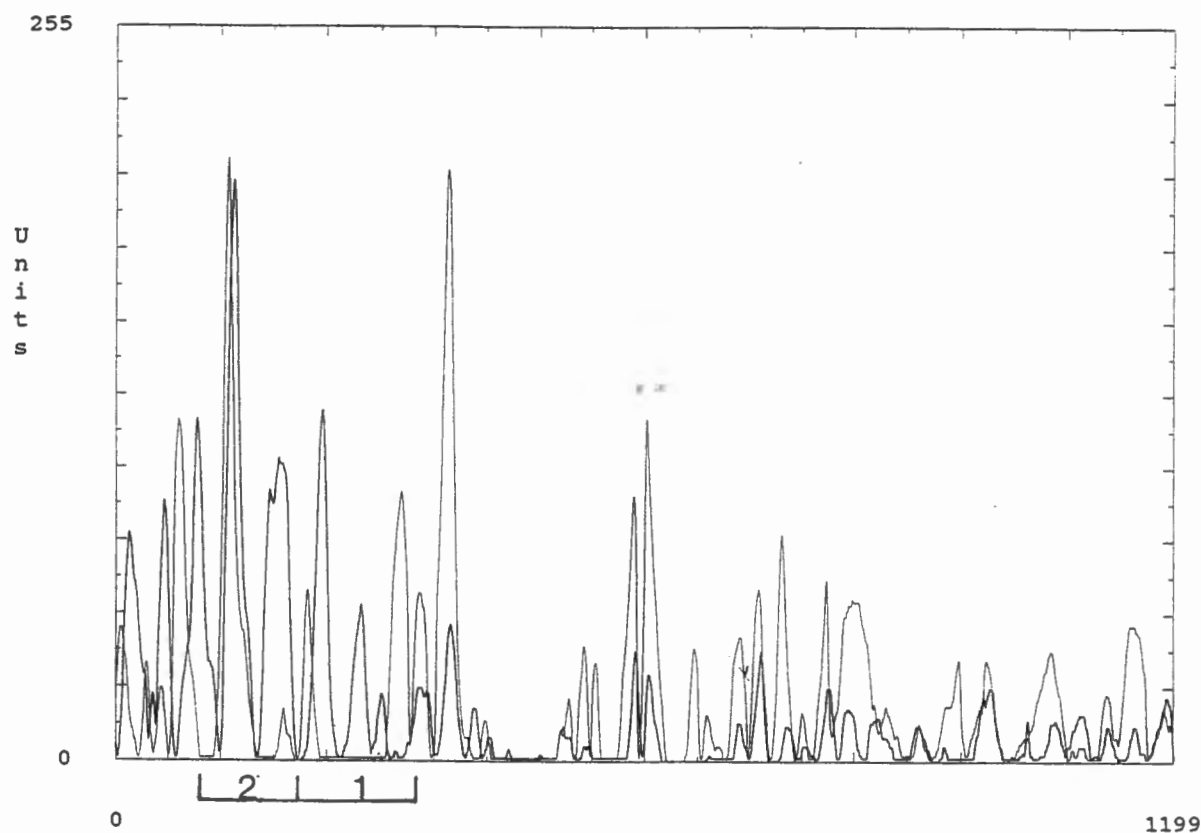
Figuur 7.42 DNase I-afskermingsanalise van die teenoorgestelde DNA-string van die Xba I - Sac I-fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie.

- A: Die teenoorgestelde string van die Xba I - Sac I-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van 'n toenemende konsentrasie Ap2 aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Die DNA is op 'n 8% denaturerende poli-akriëlamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skandeerprofile verkry na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede te identifiseer.

A



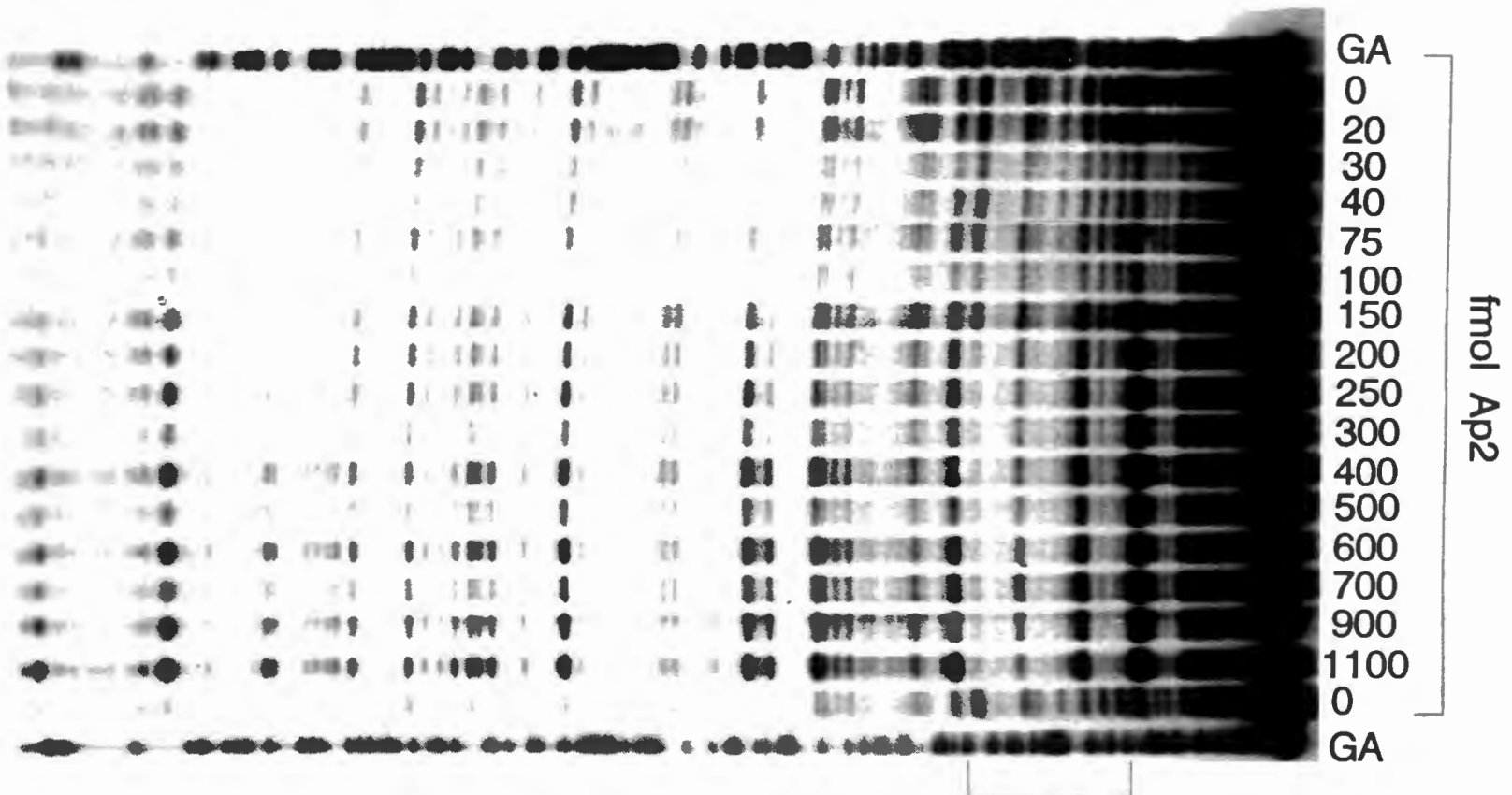
B



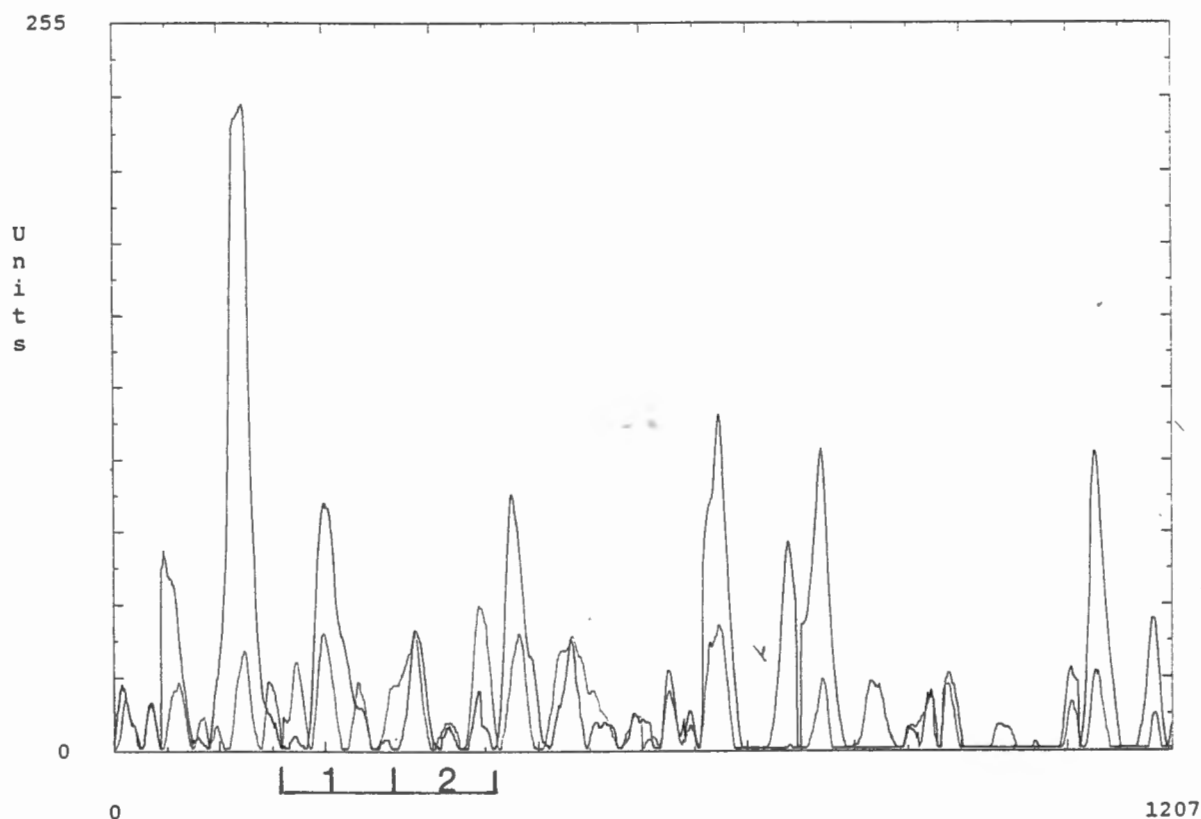
Figuur 7.43 DNase I-afskermingsanalise van die koderende string van die Sma I-fragment met toenemende Ap2-proteïene.

- A: Die koderende DNA-string van die Sma I-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van 'n toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poliakrielamiedgel geskei. Afskermingsgebied word langs die gel aange-
toon.
- B: Skanderingsprofile verkry uit densitometrie is van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede te identifiseer.

A



B



Figuur 7.44 DNase I-afskermingsanalise van die teenoorgestelde DNA-string van die Sma I-fragment met toenemende Ap2-proteïene.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Sma I-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Die afskermingsgebied word langs die DNA aangetoon.
- B: Skandeerprofile verkry uit densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om die bindingsgebiede te identifiseer.

Uit die resultate verkry in Figuur 7.7 het die Sma I-kollageenfragment een afskermingsgebied uitgewys waarin twee Ap2-bindingspunte voorkom. DNase I-afskermingsanalise van die Sma I-fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïene toon dieselfde afskermingsgebied as in Figuur 7.7 aan. 'n Geleidelike toename in afskerming word waargeneem vanaf 300 fmol Ap2 op die koderende string (Figuur 7.43) en die teenoorgestelde string (Figuur 7.44) van die Sma I-fragment. Uit die densitometriese profiele van die 1100 fmol Ap2-baan geprojekteer bo-op die geen-proteïenbaan word ook net 'n effense afname in die pieke waargeneem ooreenkomstig die geleidelike afskerming verkry tydens die DNase I-afskermingsanalise (paneel B Figuur 7.43 en 7.44). Die K-, Kd- en ΔG -waardes van beide Ap2-bindingspunte is vir albei stringe bereken en weergegee (Tabel 7.19).

**TABEL 7.19 BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG -WAARDES VAN AP2-BINDINGS-
GEBIEDE IN DIE Sma I-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN
VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

Sma I koderende string					
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie		
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)
1. -6,53 x 10 ¹¹	-1,53 x 10 ⁻¹²	-	3,26 x 10 ¹²	3,06 x 10 ⁻¹³	-15,64
2. -1,11 x 10 ¹¹	-9,00 x 10 ⁻¹²	-	8,65 x 10 ¹¹	1,15 x 10 ⁻¹²	-14,92
Sma I teenoorgestelde string					
1. 2,39 x 10 ¹²	4,18 x 10 ⁻¹³	-15,47	4,84 x 10 ¹¹	2,06 x 10 ⁻¹²	-14,60
2. 1,87 x 10 ¹²	5,34 x 10 ⁻¹³	-15,34	7,29 x 10 ¹¹	1,37 x 10 ⁻¹²	-14,82

Soos uit die skandeerprofile waargeneem kan word, is pieke wat afskerming op die koderende string verteenwoordig, moeilik identifiseerbaar. As gevolg hiervan is negatiewe waardes tydens densitometriese berekeninge by die koderende DNA-string verkry en kon die ΔG -waardes nie bepaal word nie. Deur gebruik te maak van die verkreeë waardes by die teenoorgestelde DNA-string en ook die waardes van die vloeistofsintillasiespektrometrie in ag te neem, kan beide punte egter as medium Ap2 bindingsaffiniteitsgebiede beskou word.

In die volgende eksperiment is die Sma I - Rsa I-kollageenfragment aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp in die teenwoordigheid van 'n toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie. Soos in die geval van Figuur 7.8, is twee afskermingsgebiede op beide stringe van die fragment waargeneem. Drie Ap2-bindingspunte word in hierdie twee afskermingsgebiede aangetref. Op die koderende DNA-string (Figuur 7.45) is die DNA aan die teenwoordigheid van tot 1100 fmol Ap2 blootgestel. Beide afskermingsgebiede vertoon afskerming vanaf 250 fmol Ap2. Daarteenoor is op die teenoorgestelde DNA-string (Figuur 7.46) afskerming in gebied 1 vanaf 150 fmol en gebied 2 vanaf 50 fmol Ap2 waarneembaar. Hierdie verskil in afskerming tussen die twee stringe kan waarskynlik weer eens te wyte wees aan die DNA-konsentrasies van die twee stringe wat nie ekwivalent is nie.

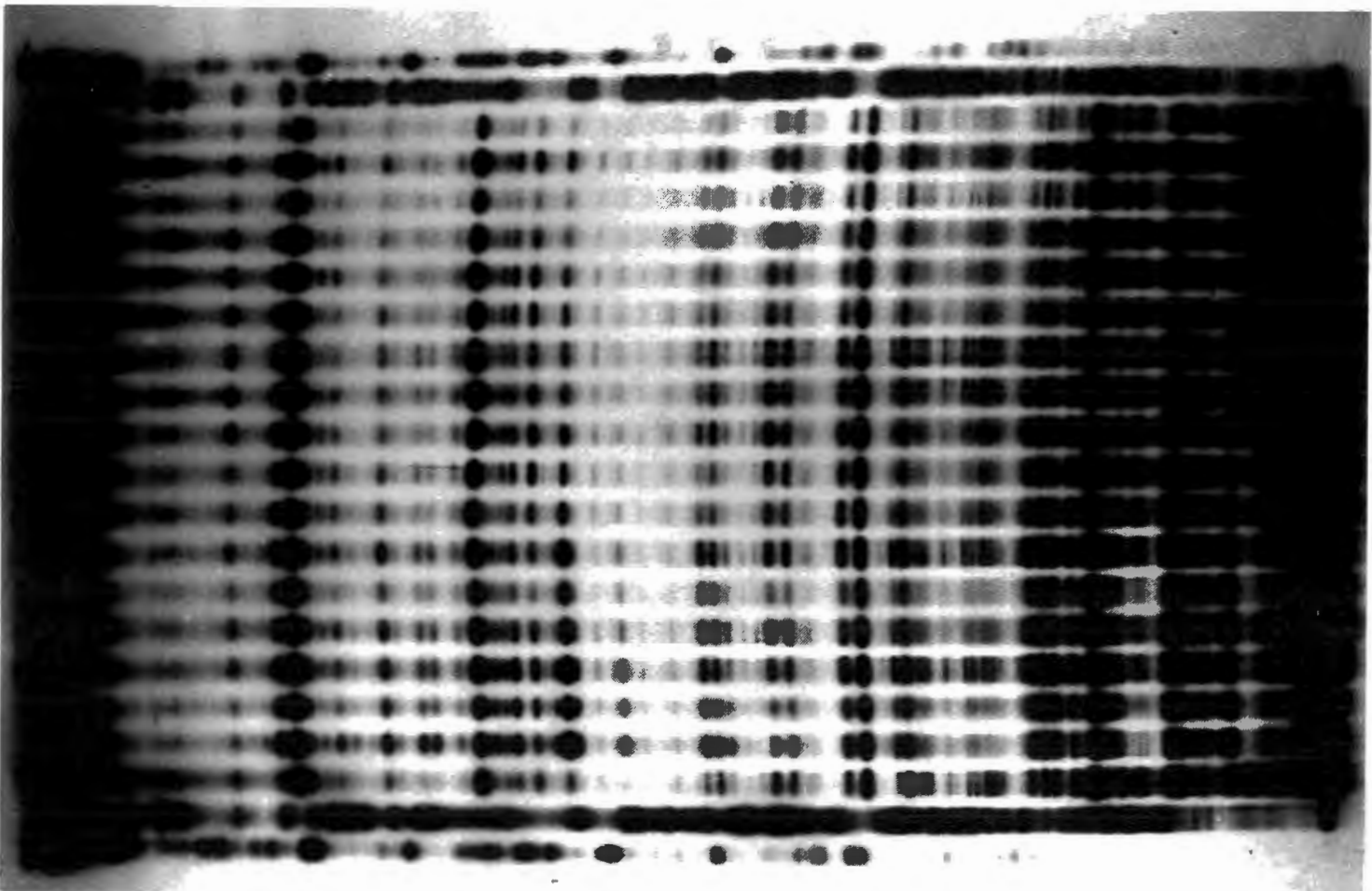
Densitometriese skanderingsprofile van die geen-proteïenbaan en die 1100 fmol Ap2-baan by die koderende DNA-string en die 900 fmol Ap2-baan by die teenoorgestelde string is bo-op mekaar geprojekteer. Hierdie profile wat in paneel B van Figuur 7.45 en 7.46 aangetoon word, help om die pieke te identifiseer wat by die bindingsgebied betrokke is. Kwantifisering van die pieke is uitgevoer volgens die metode beskryf. Berekende waardes wat uit die kwantitatiewe bepaling verkry is na densitometrie sowel as vloeistofsintillasiespektrometrie, word in Tabel 7.20 hieronder weergegee.

Geen goeie skanderingsprofile kon vir die eerste afskermingsgebied met die twee Ap2-bindingspunte op die koderende string verkry word nie en die vrye energie-waardes kon dus nie bereken word nie. Die moeilike kwantitatiewe bepaling vir hierdie gebied is daaraan te wyte dat die oppervlak van afskerming op die gel te klein is, sodat te min piek-waardes tydens berekening gebruik is. Uit die verkreeë waardes na vloeistofspektrometrie en uit die waardes van die teenoorgestelde DNA-string kan die twee gebiede as medium affiniteitsgebiede beskou word. Uit die ander waardes wat verkry is, wil dit voorkom of bindingsgebied 3 'n hoër bindingsaffiniteit het vir Ap2 teenoor die medium bindingsaffiniteit van die eerste twee bindingsgebiede.

A

fmol Ap2

TC
GA
0
20
30
40
50
75
100
150
200
250
300
400
500
600
700
900
1100
0
GA
TC



Xba I

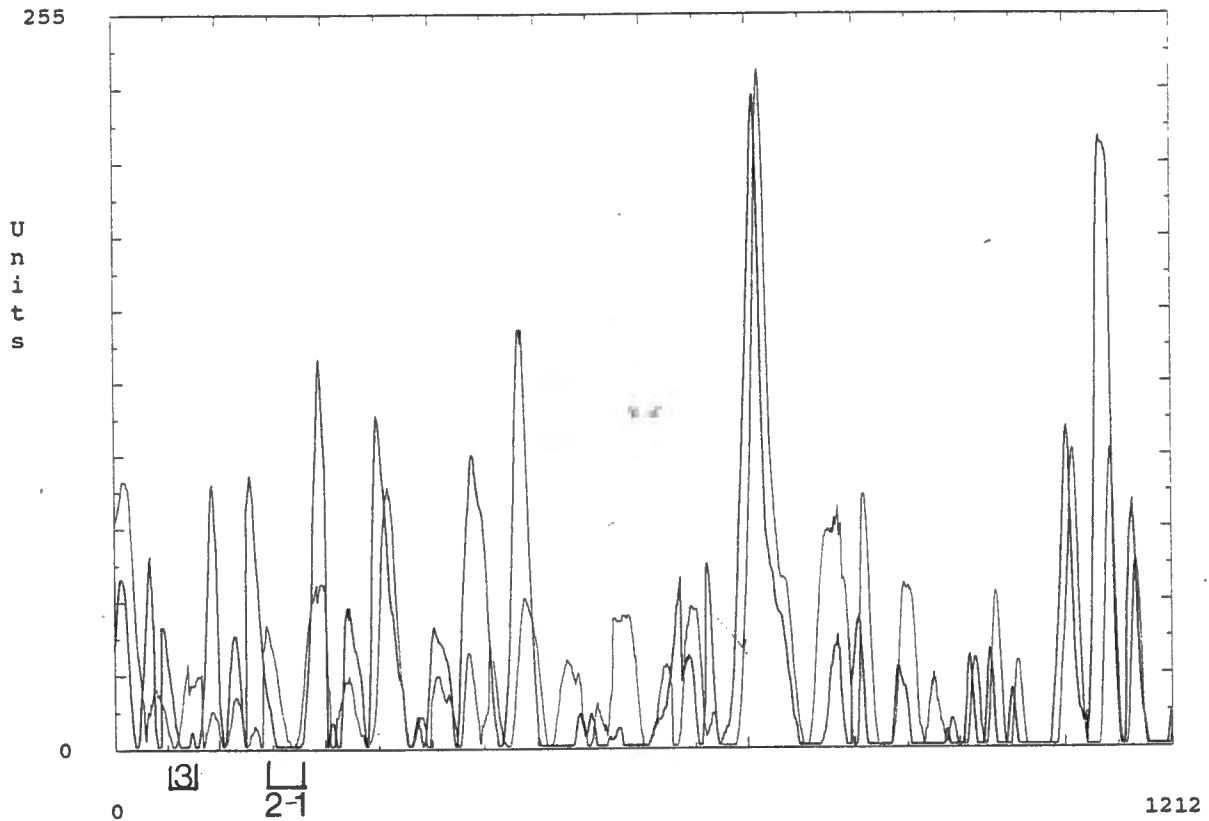
1

3

Eco RI



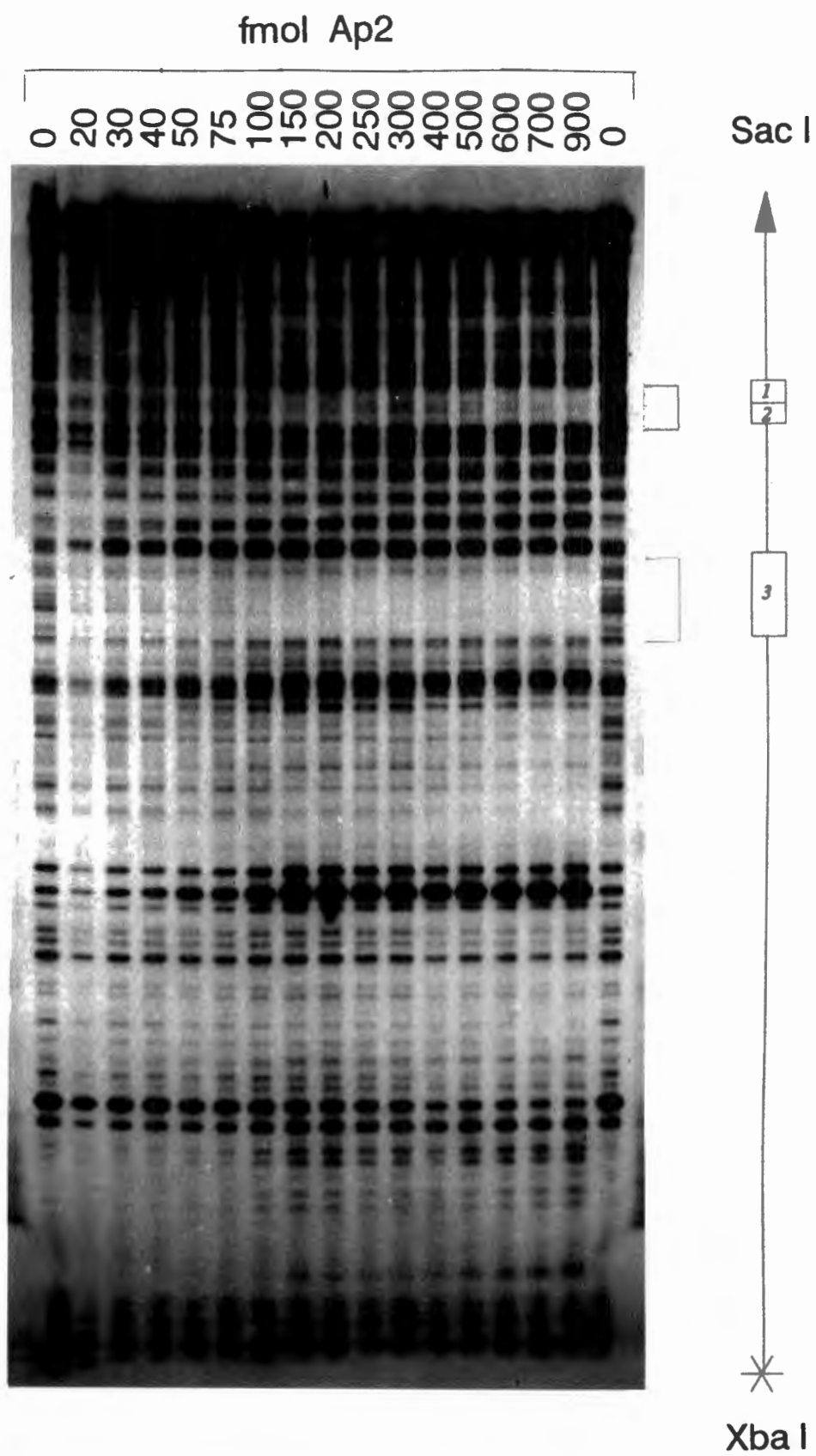
B



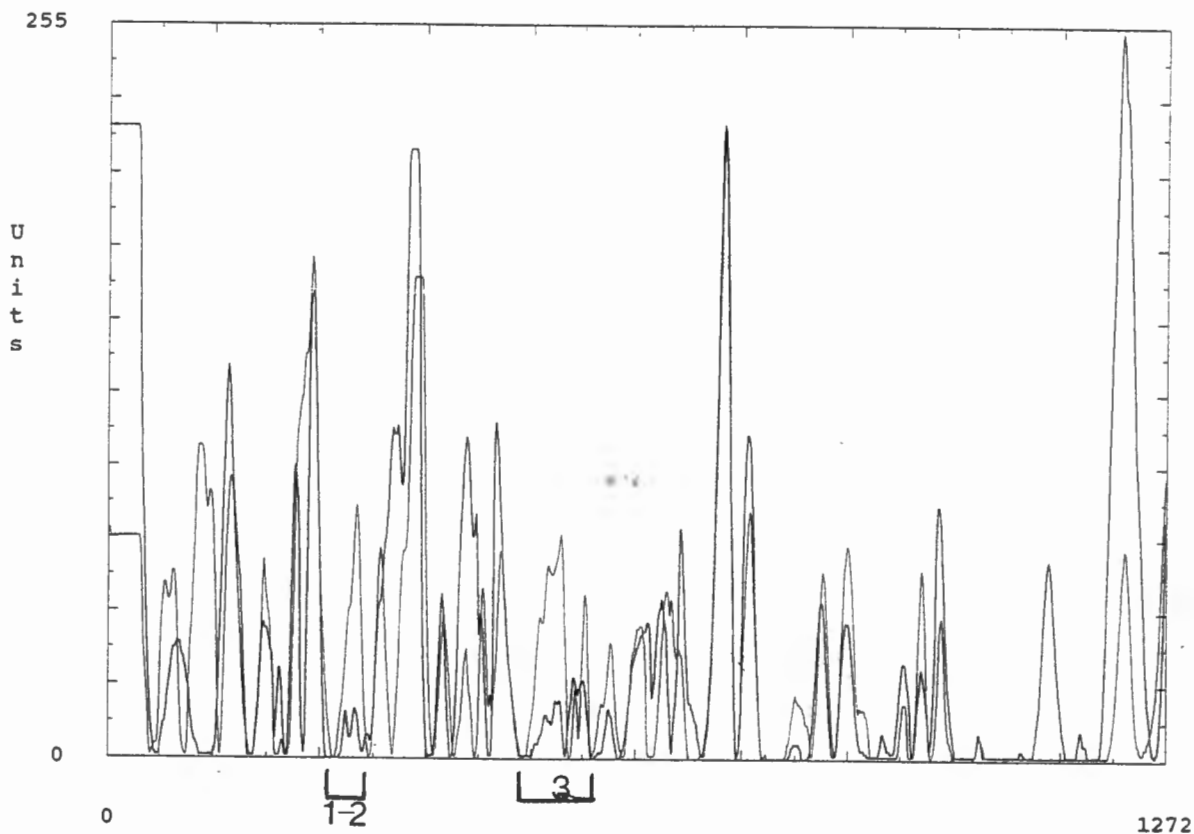
Figuur 7.45 DNase I-afskermingsanalise van die koderende string van die Sma I - Rsa I-fragment met toenemende Ap2-konsentrasies.

- A: Die koderende DNA-string van die Sma I - Rsa I-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van 'n toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skanderingsprofile verkry uit densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede te identifiseer.

A



B



Figuur 7.46 DNase I-afskermingsanalyse met die teenoorgestelde DNA-string van die Sma I - Rsa I-fragment en toenemende Ap2-konsentrasies.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Sma I - Rsa I-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïene aan DNase I-afskermingsanalyse onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Die afskermingsgebied word langs die DNA aangetoon.
- B: Skandeerprofile verkry uit densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede te identifiseer.

**TABEL 7.20 BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG -WAARDES VAN AP2-BINDINGSGE-
BIEDE IN DIE Sma I - Rsa I-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE EN
VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

Sma I - Rsa I koderende string					
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie		
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)
1. -9,25 x 10 ¹¹	-1,08 x 10 ⁻¹²	-	2,11 x 10 ¹²	4,73 x 10 ⁻¹³	-15,40
2. -5,87 x 10 ¹²	-1,70 x 10 ⁻¹³	-	1,07 x 10 ¹²	9,29 x 10 ⁻¹³	-15,03
3. 8,97 x 10 ¹¹	1,11 x 10 ⁻¹²	-14,94	7,16 x 10 ¹²	1,39 x 10 ⁻¹³	-16,06
Sma I - Rsa I teenoorgestelde string					
1. 5,5 x 10 ¹²	1,81 x 10 ⁻¹³	-15,92	2,24 x 10 ¹²	4,46 x 10 ⁻¹³	-15,43
2. 1,87 x 10 ¹²	5,33 x 10 ⁻¹³	-15,33	1,83 x 10 ¹²	5,46 x 10 ⁻¹³	-15,32
3. 2,12 x 10 ¹³	4,71 x 10 ⁻¹⁴	-16,65	8,00 x 10 ¹³	1,25 x 10 ⁻¹⁴	-17,37

Die Rsa I - Hind III-kollageenfragment is soos die vorige fragmente ook aan 'n DNase I-afskermingsanalise met 'n Ap2-konsentrasiereeks onderwerp. In Figuur 7.9 is waargeneem dat Ap2 buiten een afskermingsgebied in die teenoorgestelde string slegs aan die koderende string bind. By die DNase I-afskermingsanalise van hierdie fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap2 is 'n soortgelyke resultate verkry. Noukeurige bestudering van die teenoorgestelde string wys in bindingsgebied 5 'n baie ligte mate van afskerming aan.

Vier verskillende Ap2-afskermingsgebiede word dus op die koderende string (Figuur 7.47) waargeneem, terwyl slegs twee afskermingsgebiede op die teenoorgestelde string (Figuur 7.48) waargeneem word. Afskermingsgebied 1 op die koderende string vertoon totale afskerming vanaf 400 fmol Ap2. Die tweede afskermingsgebied vertoon slegs gedeeltelike afskerming en tekens van dié afskerming is waarneembaar vanaf 400 fmol Ap2. Afskermingsgebied 3 bevat twee oorvleuelende Ap2-bindingspunte soos aangetoon in Figuur 7.9. Weens die posisie van die afskermingsgebied op die gel in Figuur 7.47, is dit moeilik om die twee bindingspunte te onderskei en is hulle as een gekwantifiseer. Afskerming vir hierdie gebied is waargeneem vanaf 500 fmol Ap2.

2 Afskermingsgebied 4, wat ook op die teenoorgestelde string afskerm word, toon op die koderende string afskerming vanaf 200 fmol Ap2, terwyl op die teenoorgestelde string (Figuur 7.48) afskerming reeds vanaf 100 fmol Ap2 sigbaar is.

Densitometriese skandeerprofiele van die geen-proteïenbaan en die 1100 fmol Ap2-baan is bo-op mekaar geprojekteer om bindingsgebiede te kan identifiseer. Hierdie profiele word in paneel B van Figuur 7.47 en Figuur 7.48 weergegee. Verandering en in sommige gevalle verdwyning van pieke na toevoeging van proteïene is duidelik in die profiele sigbaar. Die kwantifisering van hierdie bindingsgebiede om die bindingsaffiniteit van Ap2 te bepaal, is soos reeds beskryf is, uitgevoer. Die verkreeë waardes word in Tabel 7.21 gegee:

**TABEL 7.21 BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG-WAARDES VAN AP2-BINDINGS-
GEBIEDE IN DIE Rsa I - Hind III-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE
EN VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

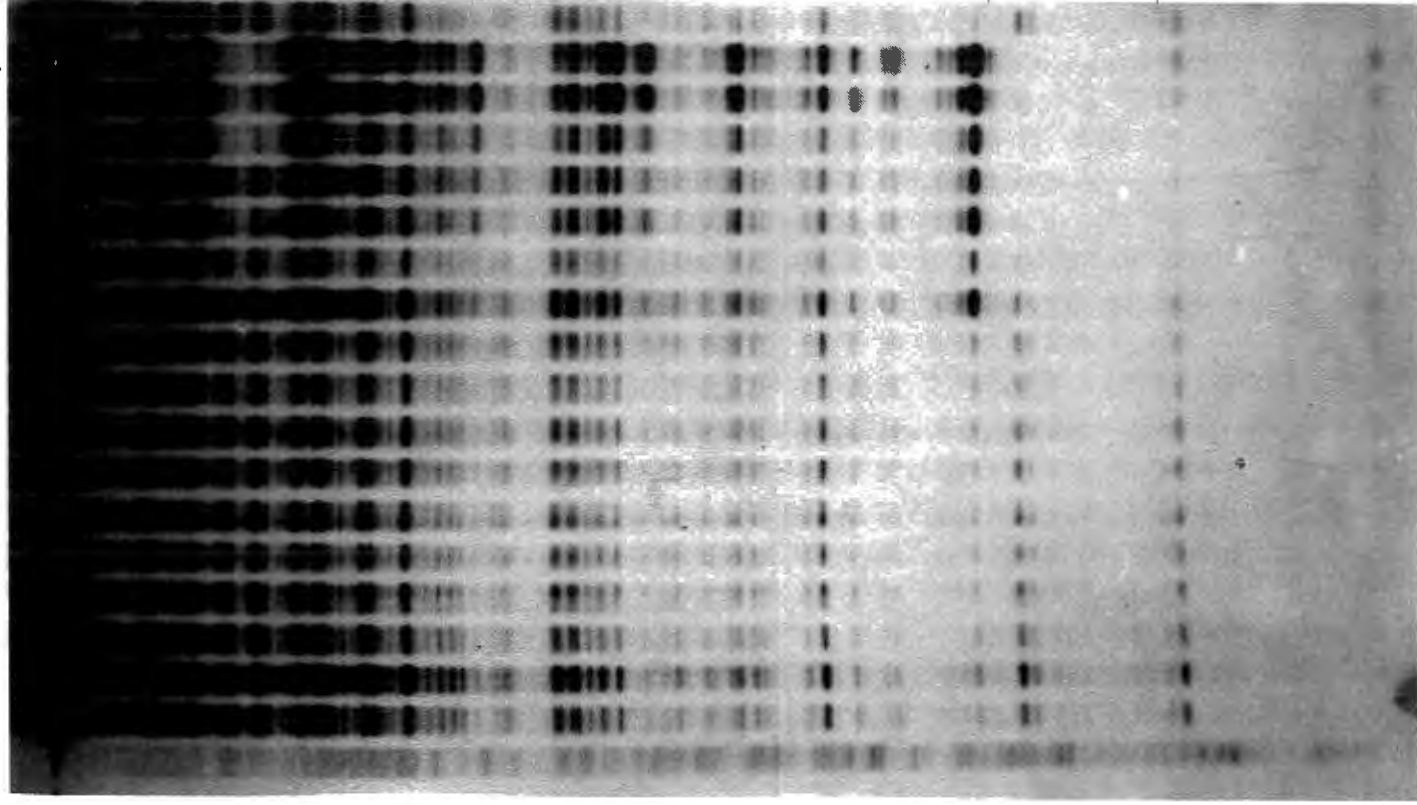
Rsa I - Hind III koderende string					
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie		
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)
1. 1,01 x 10 ¹²	9,92 x 10 ⁻¹³	-15,00	6,13 x 10 ¹¹	1,63 x 10 ⁻¹²	-14,73
2. 4,33 x 10 ¹¹	2,31 x 10 ⁻¹²	-14,54	2,41 x 10 ¹¹	4,15 x 10 ⁻¹²	-14,22
3. 1,99 x 10 ¹¹	5,02 x 10 ⁻¹²	-14,12	5,77 x 10 ¹¹	1,73 x 10 ⁻¹²	-14,69
4. 2,40 x 10 ¹³	4,16 x 10 ⁻¹⁴	-16,72	2,00 x 10 ¹²	5,00 x 10 ⁻¹³	-15,37
Rsa I - Hind III teenoorgestelde string					
4. 6,05 x 10 ¹²	1,65 x 10 ⁻¹³	-15,97	4,32 x 10 ¹²	2,31 x 10 ⁻¹³	-15,79

Uit die berekende waardes wil dit voorkom of bindingsgebied 4 'n medium tot hoë bindingsaffiniteit vir Ap2 het, terwyl die ander drie bindingsgebiede 'n laer bindingsaffiniteit vertoon. Moontlik speel hierdie lae bindingsaffiniteit 'n rol waarom Ap2 slegs in hierdie gevalle aan die koderende string bind en nie ook aan die teenoorgestelde string nie.

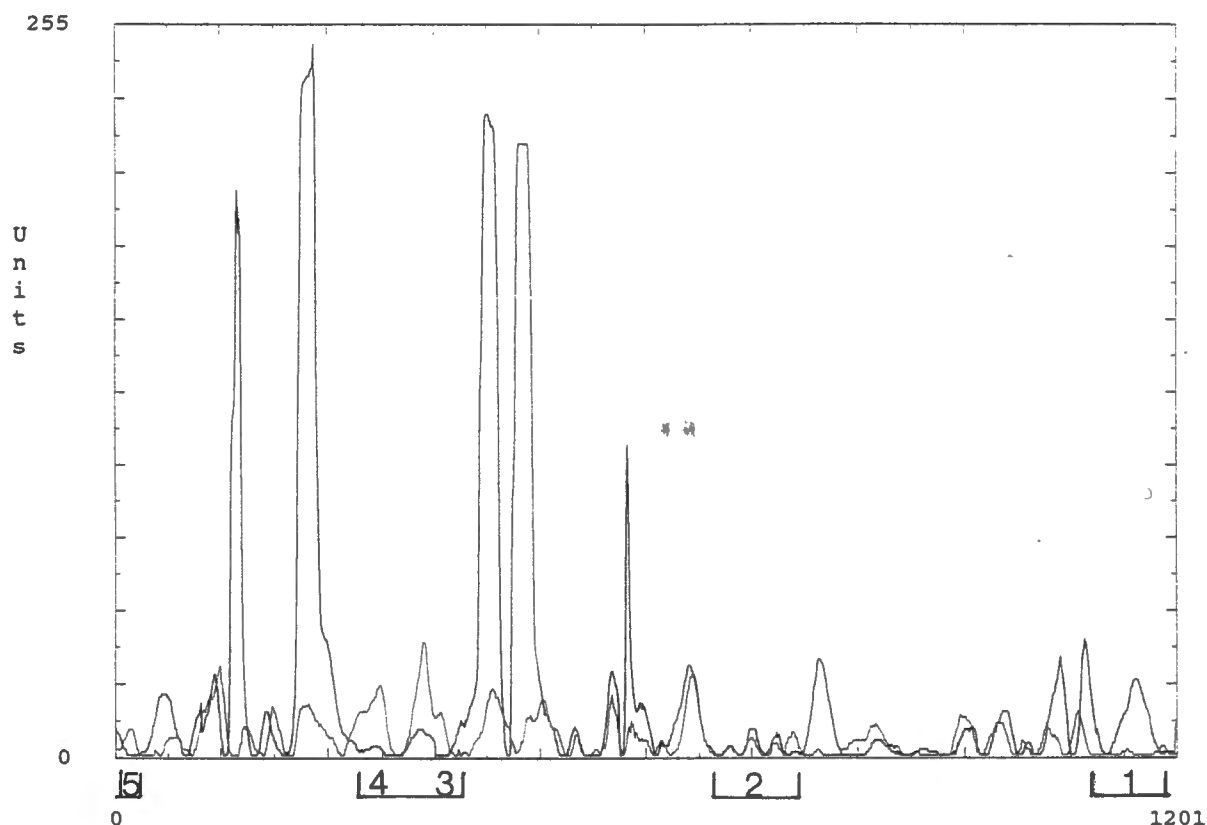
A

fmol Ap2

TC 0 20 30 40 50 75 100 150 200 250 300 400 500 600 700 900 1100 0



B



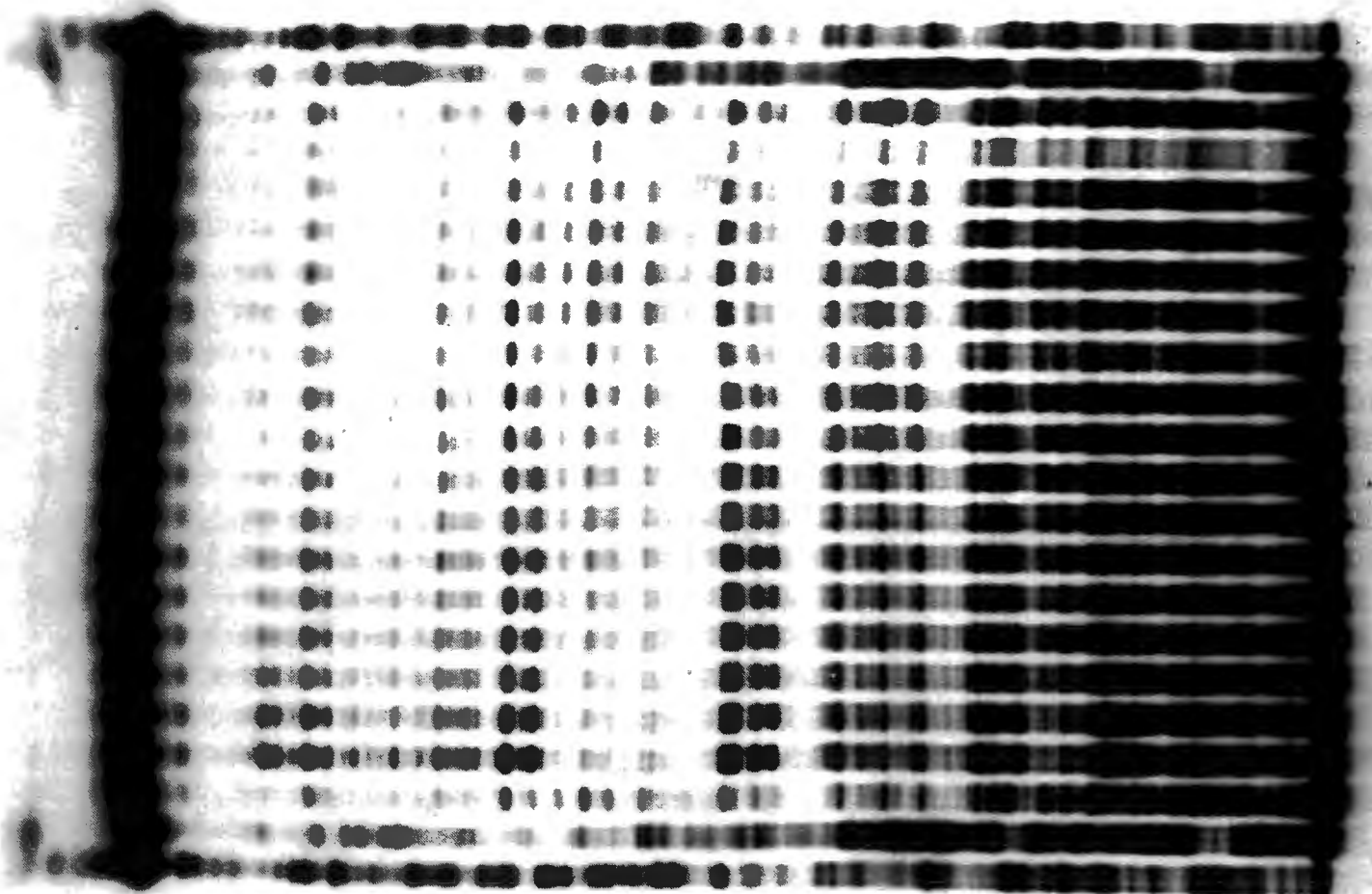
Figuur 7.47 DNase I-afskermingsanalise van die koderende DNA-string van die Rsa I - Hind III-fragment met toenemende Ap2-konsentrasies.

- A: Die koderende DNA-string van die Rsa I - Hind III-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van 'n toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poli-akriëlamiedgel geskei. Afskermingsgebiede word langs die gel aangetoon.
- B: Skanderingsprofile verkry uit densitometrie is van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) bo-op mekaar geprojekteer vir identifisering van bindingsgebiede.

A

TC
GA
0
20
30
40
50
75
100
150
200
250
300
400
500
600
700
900
1100
0
GA
TC

fmol Ap2



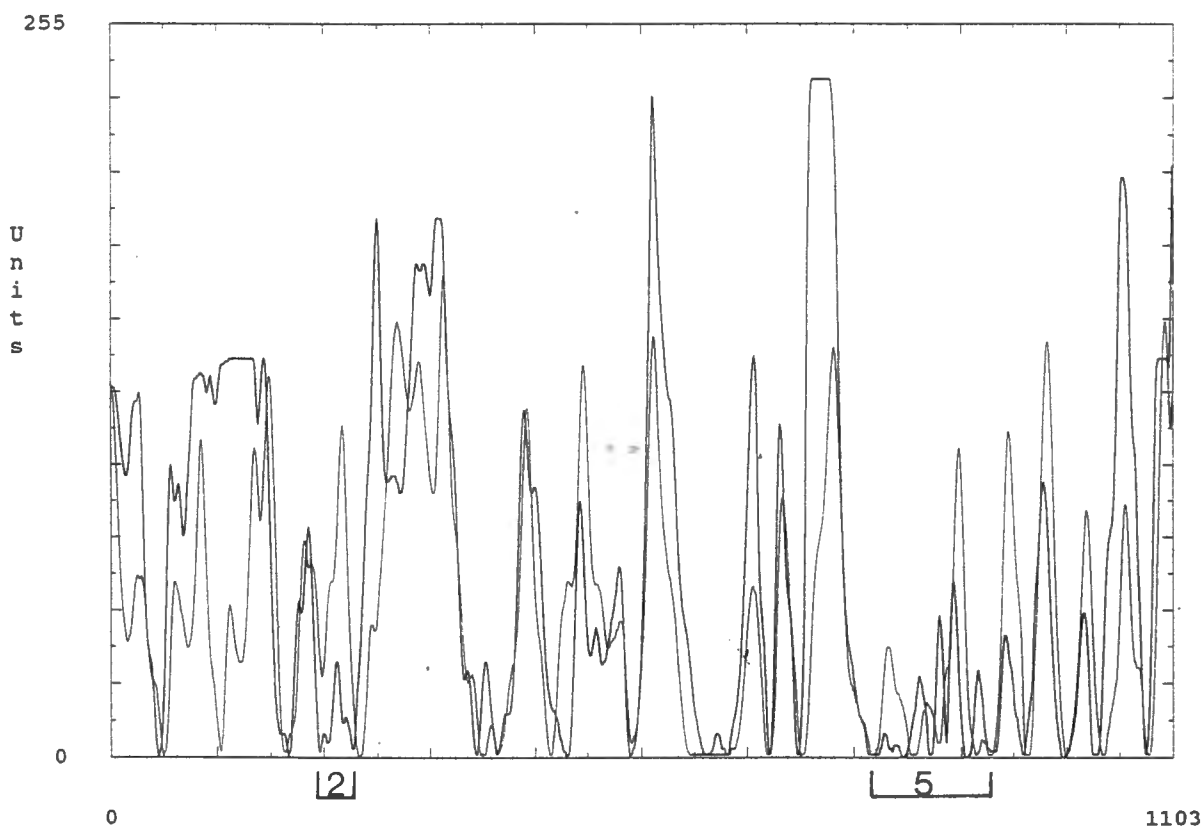
300

Xba I



Sac I

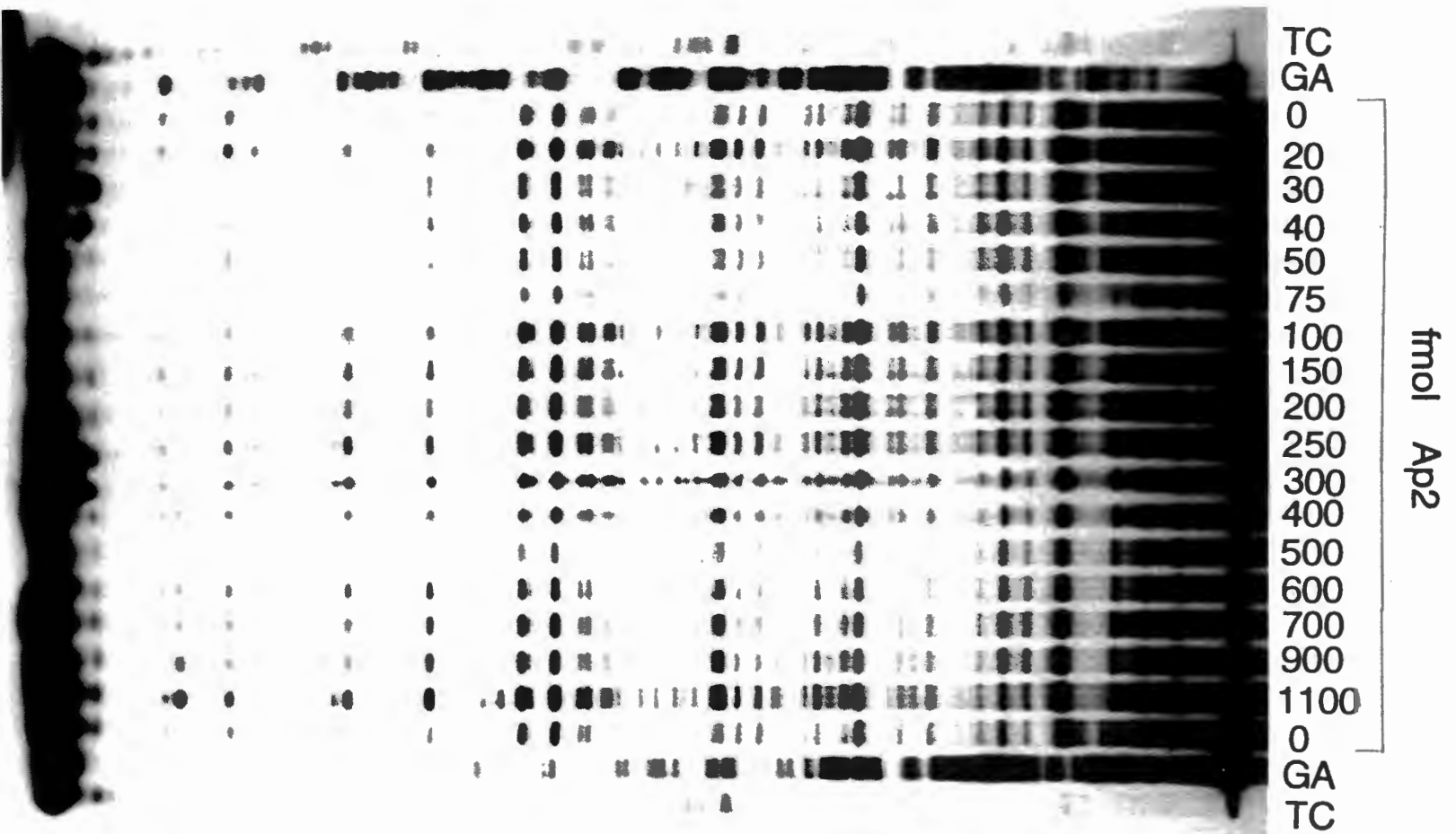
B



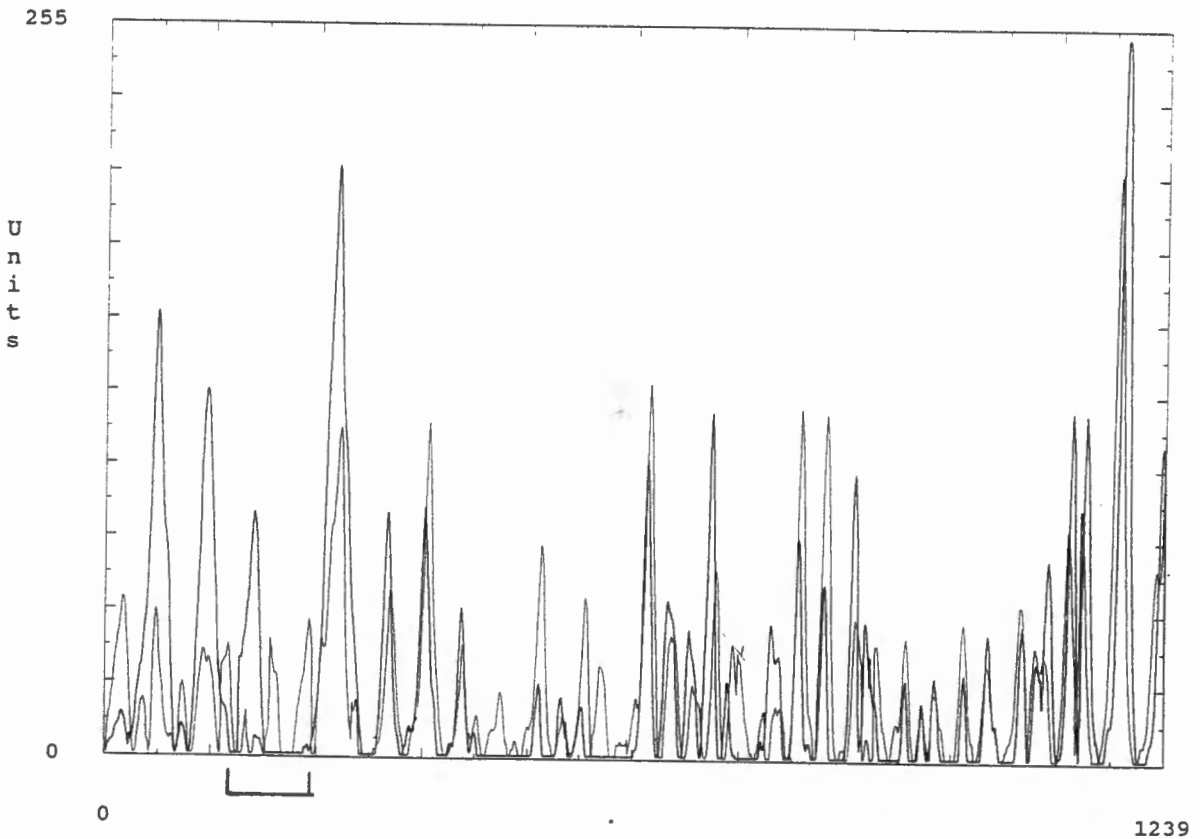
Figuur 7.48 DNase I-afskermingsanalise met die teenoorgestelde DNA-string van die Rsa I - Hind III-fragment en toenemende Ap2-konsentrasies.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Rsa I - Hind III-kollageen-fragment is in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Die afskermingsgebied word langs die DNA aangetoon.
- B: Skandeerprofile verkry uit densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker), is bo-op mekaar geprojekteer om die bindingsgebied te identifiseer.

A



B

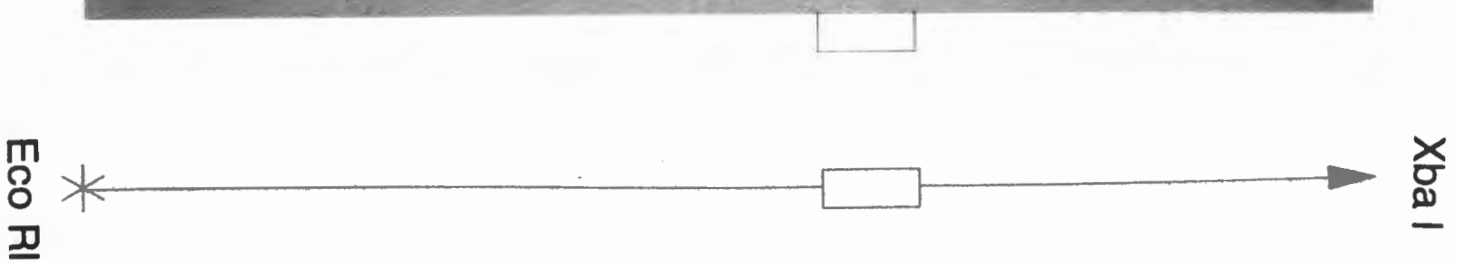
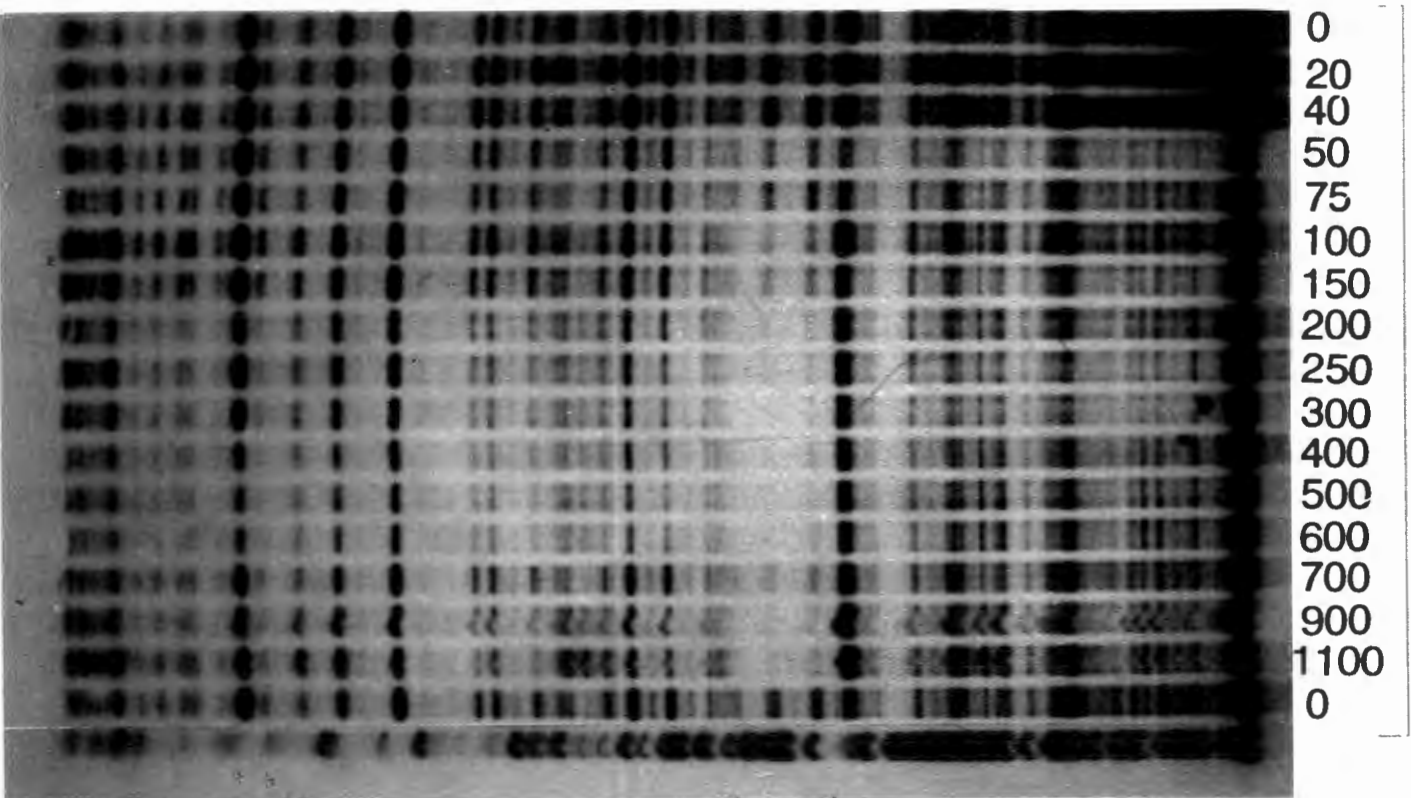


Figuur 7.49 DNase I-afskermingsanalise van die koderende DNA-string van die Hind III - Rsa I-fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-konsentrasies.

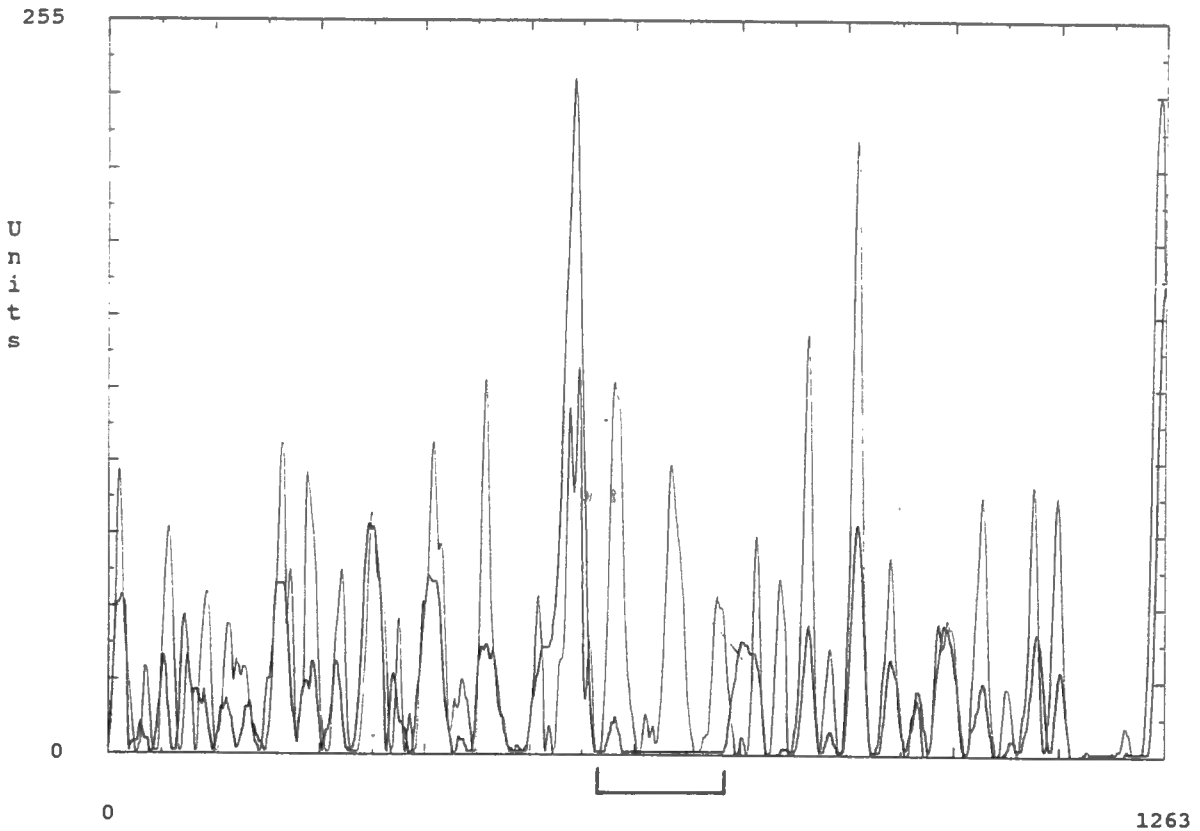
- A: Die koderende DNA-string van die Hind III - Rsa I-kollageenfragment is in die teenwoordigheid van 'n toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poli-akriëlamiedgel geskei. Die afskermingsgebied word langs die gel aangetoon.
- B: Skanderingsprofile verkry na densitometrie is van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker) bo-op mekaar geprojekteer om die bindingsgebied te identifiseer.

A

fmol Ap2



B



Figuur 7.50 DNase I-afskermingsanalise met die teenoorgestelde DNA-string van die Hind III - Rsa I-fragment in die teenwoordigheid van toenemende Ap2 konsentrasies.

- A: Die teenoorgestelde DNA-string van die Hind III - Rsa I-kollageen-fragment is in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïene aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp. Maxam en Gilbert-volgordebepalings is tesame met die DNA op 'n 8% denaturerende poliakrielamiedgel geskei. Die afskermingsgebied word langs die gel aangetoon.
- B: Skandeerprofiele verkry na densitometrie van die "0"-baan (lig) en die 1100 fmol Ap2-baan (donker), is bo-op mekaar geprojekteer om die bindingsgebied te identifiseer.

DNase I-afskermingsanalise is ook op die Hind III - Rsa I-kollageenfragment uitgevoer in die teenwoordigheid van toenemende Ap2-proteïenkonsentrasie. Soos in Figuur 7.10 is hier ook net een afskermingsgebied vir Ap2 waargeneem. Vir beide stringe van die fragment is die Ap2-proteïenkonsentrasie tot 1100 fmol verhoog. Op die koderende string (Figuur 7.49) word afskerming vanaf 300 fmol Ap2 waargeneem. Daarteenoor vind afskerming op die teenoorgestelde string (Figuur 7.50) reeds vanaf 200 fmol Ap2 plaas. Soos reeds genoem, lê die verskille in afskerming dikwels in die feit dat die DNA-konsentrasies nie altyd ekwivalent is nie. Densitometriese skandeerprofiele van die "0"-baan en die 1100 fmol Ap2-baan is bo-op mekaar geprojekteer om pieke betrokke by die bindingsgebied, te identifiseer. Die geïdentifiseerde pieke is dan gekwantifiseer. Die berekende waardes wat na kwantifisering deur densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie verkry is, word in Tabel 7.22 weergegee:

**TABEL 7.22 BEREKENDE K-, Kd- EN ΔG-WAARDES VAN DIE AP2-BINDINGS-
GEBIEDE IN DIE Hind III - Rsa I-FRAGMENT NA DENSITOMETRIE
EN VLOEISTOFSINTILLASIESPEKTROMETRIE**

Hind III - Rsa I koderende string					
Densitometrie			Vloeistofsintillasiespektrometrie		
K (mol ⁻¹)	Kd (M)	ΔG (kcal/mol)	K (mol ⁻¹)	Kd (M)	Δ G (kcal/mol)
1. 3,11 x 10 ¹²	3,21 x 10 ⁻¹³	-15,61	2,89 x 10 ¹¹	3,46 x 10 ⁻¹²	-14,32
Hind III - Rsa I teenoorgestelde string					
1. 1,54 x 10 ¹³	6,49 x 10 ⁻¹⁴	-16,48	2,51 x 10 ¹³	3,98 x 10 ⁻¹⁴	-16,74

Uit die verkreeë waardes wil dit voorkom of hierdie Ap2-bindingsgebied ’n medium tot hoë bindingsaffiniteit vir Ap2 vertoon.

7.3.3.1 SAMEVATTING

Om 'n geheelbeeld van al die geïdentifiseerde Ap2-bindingsgebiede met hul verskillende bindingsaffiniteite te verkry, word al die waardes in Tabel 7.23 saamgevat. Hoewel die verkreeë affiniteit van Ap2 vir die SV40-DNA nie met dié in die literatuur (Mitchell *et al.*, 1987) korreleer nie, is van die standpunt uitgegaan dat die verkreeë waardes vir die kollageenfragmente met die SV40-waardes, verkry in hierdie studie, vergelyk moet word aangesien dieselfde eksperimentele metodes en kondisies sowel as kwantitatiewe metings vir al die DNA-fragmente gebruik is.

Indien die vrye energiewaardes van Ap2-binding aan die SV40-DNA as kriteria geneem word, kan hoë affiniteitbindingsgebiede beskou word as dié met 'n vrye energiewaarde vanaf -16,00 kcal/mol. Medium affiniteitbindingsgebiede word dan beskou as die tussen -15,00 en -16,00 kcal/mol, terwyl lae bindingsgebiede as dié met 'n energiewaarde van minder as -15,00 kcal/mol beskou kan word. Uit die berekende vrye energiewaardes van die verskillende kollageengeenfragmente kan dan gestel word dat daar drie hoë affiniteitsbindingsgebiede voorkom, naamlik een elk in die Eco RV - Pvu II-, Cla I - Xba I- en Sma I - Rsa I-fragmente en twee medium tot hoë bindingsgebiede wat waargeneem word in die Rsa I - Hind III- en Hind III - Rsa I-fragmente. Vier lae affiniteitsbindingsgebiede, waarvan een in die Cla I - Xba I-fragment voorkom en die ander drie in die Rsa I - Hind III-fragment voorkom, word ook waargeneem. Al die ander Ap2-bindingsgebiede kan dan as medium affiniteitsgebiede beskou word.

7.4 PROTEÏEN-PROTEÏENINTERAKSIES

Sp1 en Ap2-binding is beide in die 21 bp-herhalingsgebied in SV40 waargeneem. Gelyktydige byvoeging van beide proteïene tydens DNase I-afskermingsanalise het aangetoon dat die afgeskermde gebied na weerskante uitbrei ten opsigte van die individuele afgeskermde gebiede. Individuele bandpatrone in die afgeskermde gebiede is ook tydens gesamentlike binding opgehef (Mitchell *et al.*, 1987).

Tabel 7.23 Berekende K-, Kd- en ΔG-waardes van Ap2-binding in die SV40-DNA en kollageengeenfragmente na densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie

SV40		EcoRV - Pvu II		Cla I - Xba I		Xba I - Sac I	
K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol
Densitometer							
1. 4,86 x 10 ¹² 2. 6,34 x 10 ¹² 3. 4,30 x 10 ¹¹ 4. 2,89 x 10 ¹² 1 - K = Kd (M)	-15,85 -16,00 -14,54 -15,57	1. 1,73 x 10 ¹² 2. 9,87 x 10 ¹² 3. 1,81 x 10 ¹¹ 1 - K = Kd (M)	-15,29 -16,24 -14,07	1. 3,27 x 10 ¹³ 2. 2,18 x 10 ¹³ 3. 2,98 x 10 ¹³ 4. 1,85 x 10 ¹² 5. 4,11 x 10 ¹¹ 6. 3,98 x 10 ¹⁰ 1 - K = Kd (M)	-15,33 -13,77 -16,00	1. 1,78 x 10 ¹² 2. 6,53 x 10 ¹¹ 1 - K = Kd (M)	-15,31 -14,76
1. 2,05 x 10 ⁻¹³ 2. 1,57 x 10 ⁻¹³ 3. 2,32 x 10 ⁻¹² 4. 3,45 x 10 ⁻¹³		1. 5,78 x 10 ⁻¹³ 2. 1,01 x 10 ⁻¹³ 3. 5,52 x 10 ⁻¹²		1. 3,05 x 10 ⁻¹⁴ 2. 4,68 x 10 ⁻¹⁴ 3. 3,35 x 10 ⁻¹⁴ 4. 5,40 x 10 ⁻¹³ 5. 2,43 x 10 ⁻¹² 6. 2,51 x 10 ⁻¹¹		1. 5,60 x 10 ⁻¹³ 2. 2,26 x 10 ⁻¹³	
SINTILLASIE TELLER							
K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol
1. 3,12 x 10 ¹² 2. 4,63 x 10 ¹² 3. 1,36 x 10 ¹² 4. 3,00 x 10 ¹² 1 - K = Kd (M)	-15,61 -15,83 -15,16 -15,59	1. 2,91 x 10 ¹² 2. 2,91 x 10 ¹² 3. 2,24 x 10 ¹² 1 - K = Kd (M)	-15,57 -15,57 -15,43	1. 1,12 x 10 ¹¹ 2. 4,34 x 10 ¹¹ 3. 6,59 x 10 ¹¹ 4. 3,70 x 10 ¹¹ 5. 5,23 x 10 ¹¹ 6. 8,14 x 10 ¹¹ 1 - K = Kd (M)	-13,81 -14,54 -14,77 -14,46 -14,64 -14,88	1. 3,07 x 10 ¹² 2. 2,40 x 10 ¹² 1 - K = Kd (M)	-15,60 -15,47

1. $3,20 \times 10^{-13}$ 2. $2,15 \times 10^{-13}$ 3. $7,35 \times 10^{-13}$ 4. $3,33 \times 10^{-13}$		1. $3,43 \times 10^{-13}$ 2. $3,43 \times 10^{-13}$ 3. $4,46 \times 10^{-13}$		1. $8,93 \times 10^{-12}$ 2. $2,30 \times 10^{-12}$ 3. $1,51 \times 10^{-12}$ 4. $2,69 \times 10^{-12}$ 5. $1,91 \times 10^{-12}$ 6. $1,22 \times 10^{-12}$		1. $3,25 \times 10^{-11}$ 2. $4,16 \times 10^{-13}$	
DENSITOMETER t/o							
K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol
1. $3,33 \times 10^{13}$ 2. $1,40 \times 10^{11}$ 3. $2,43 \times 10^{13}$	-16,90 -13,93 -16,72	2. $2,08 \times 10^{13}$ 3. $1,52 \times 10^{12}$	-16,66 -15,23	1. $1,87 \times 10^{12}$ 4. $1,05 \times 10^{11}$ 6. $6,36 \times 10^{12}$	-16,89 -16,67 -16,84 -15,33 -14,51 -13,25	1. $9,16 \times 10^{12}$ 2. $6,70 \times 10^{12}$	-16,20 -16,03
$\frac{1}{K} = K_d (M)$		$\frac{1}{K} = K_d (M)$		$\frac{1}{K} = K_d (M)$		$\frac{1}{K} = K_d (M)$	
1. $2,99 \times 10^{-14}$ 2. $7,10 \times 10^{-12}$ 3. $4,10 \times 10^{-14}$		2. $4,80 \times 10^{-14}$ 3. $6,57 \times 10^{-13}$		1. $5,32 \times 10^{-13}$ 4. $9,47 \times 10^{-12}$ 6. $1,57 \times 10^{-13}$		1. $1,09 \times 10^{-13}$ 2. $1,49 \times 10^{-13}$	
SINTILLASIE TELLER t/o							
K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol	K (mol ⁻¹)	ΔG kcal/mol
1. $1,14 \times 10^{13}$ 2. $1,36 \times 10^{12}$ 3. $2,70 \times 10^{12}$	-16,32 -15,16 -15,53	2. $5,75 \times 10^{12}$ 3. $9,03 \times 10^{11}$	-15,96 -14,95	1. $4,04 \times 10^{11}$ 4. $8,14 \times 10^{11}$ 6. $5,12 \times 10^{12}$	-14,50 -14,88 -15,88	1. $4,23 \times 10^{12}$ 2. $1,94 \times 10^{12}$	-15,78 -15,35
$\frac{1}{K} = K_d (M)$		$\frac{1}{K} = K_d (M)$		$\frac{1}{K} = K_d (M)$			
1. $8,77 \times 10^{-14}$ 2. $7,35 \times 10^{-13}$ 3. $3,70 \times 10^{-13}$		2. $1,74 \times 10^{-13}$ 3. $1,10 \times 10^{-12}$		1. $2,47 \times 10^{-12}$ 4. $1,22 \times 10^{-12}$ 6. $1,95 \times 10^{-13}$		1. $2,36 \times 10^{-13}$ 2. $5,15 \times 10^{-13}$	

Sma I - Sma I		Sma I - Rsa I		Rsa I - Hind III		Hind III - Rsa I	
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
Densitometer							
1. $-6,53 \times 10^{11}$ 2. $-1,11 \times 10^{11}$	- -	1. $5,50 \times 10^{12}$ 2. $1,87 \times 10^{12}$ 3. $2,12 \times 10^{13}$	-15,92 -15,33 -16,65	1. $1,01 \times 10^{12}$ 2. $4,33 \times 10^{11}$ 3. $1,99 \times 10^{11}$ 4. $2,40 \times 10^{13}$	-15,00 -14,54 -14,12 -16,72	1. $3,11 \times 10^{12}$	-15,61
$\frac{1}{K} = K_d (M)$		$\frac{1}{K} = K_d (M)$		$\frac{1}{K} = K_d (M)$		$\frac{1}{K} = K_d (M)$	
1. $-1,53 \times 10^{-12}$ 2. $-9,00 \times 10^{-12}$		1. $1,81 \times 10^{-13}$ 2. $5,33 \times 10^{-13}$ 3. $4,71 \times 10^{-14}$		1. $9,92 \times 10^{-13}$ 2. $2,31 \times 10^{-12}$ 3. $5,02 \times 10^{-12}$ 4. $4,15 \times 10^{-14}$		1. $3,21 \times 10^{-13}$	
SINTILLASIE TELLER							
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
1. $3,26 \times 10^{12}$ 2. $8,65 \times 10^{11}$	-15,64 -14,92	1. $2,24 \times 10^{12}$ 2. $1,83 \times 10^{12}$ 3. $8,00 \times 10^{13}$	-15,43 -15,32 -17,37	1. $6,13 \times 10^{11}$ 2. $2,41 \times 10^{11}$ 3. $5,77 \times 10^{11}$ 4. $1,99 \times 10^{11}$	-14,73 -14,22 -14,69 -15,37	1. $2,89 \times 10^{11}$	-14,32
$\frac{1}{K} = K_d (M)$		$\frac{1}{K} = K_d (M)$		$\frac{1}{K} = K_d (M)$		$\frac{1}{K} = K_d (M)$	
1. $3,06 \times 10^{-13}$ 2. $1,15 \times 10^{-12}$		1. $4,46 \times 10^{-13}$ 2. $5,46 \times 10^{-13}$ 3. $1,25 \times 10^{-14}$		1. $1,63 \times 10^{-12}$ 2. $4,15 \times 10^{-12}$ 3. $1,73 \times 10^{-12}$ 4. $5,00 \times 10^{-12}$		1. $3,46 \times 10^{-12}$	

DENSITOMETER t/o							
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
1. 2,39 x 10 ¹² 2. 1,87 x 10 ¹² 1 - = Kd (M) K	-15,47 -15,34	1. -9,25 x 10 ¹¹ 2. -5,87 x 10 ¹² 3. 8,97 x 10 ¹¹ 1 - = Kd (M) K	- - -14,94	4. 6,05 x 10 ¹² 1 - = Kd (M) K	-15,97	1. 1,54 x 10 ¹³ 1 - = Kd (M) K	-16,48
1. 4,18 x 10 ⁻¹³ 2. 5,34 x 10 ⁻¹³		1. -1,08 x 10 ⁻¹² 2. -1,70 x 10 ⁻¹³ 3. 1,11 x 10 ⁻¹²		4. 1,65 x 10 ⁻¹³		1. 6,49 x 10 ⁻¹⁴	
SINTILLASIE TELLER t/o							
K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol	K(mol ⁻¹)	ΔG Kcal/mol
1. 4,84 x 10 ¹¹ 2. 7,29 x 10 ¹¹ 1 - = Kd (M) K	-14,60 -14,82	1. 2,11 x 10 ¹² 2. 1,07 x 10 ¹² 3. 7,16 x 10 ¹² 1 - = Kd (M) K	-15,40 -15,03 -16,06	4. 4,32 x 10 ¹² 1 - = Kd (M) K	-15,79	1. 2,51 x 10 ¹³ 1 - = Kd (M) K	-16,74
1. 2,06 x 10 ⁻¹² 2. 1,37 x 10 ⁻¹²		1. 4,73 x 10 ⁻¹³ 2. 9,29 x 10 ⁻¹³ 3. 1,39 x 10 ⁻¹³		4. 2,31 x 10 ⁻¹³		1. 3,98 x 10 ⁻¹⁴	

'n Soortgelyke eksperiment as wat Mitchell *et al.* uitgevoer het, is op die koderende en teenoorgestelde string van die Rsa I - Hind III-kollageenfragment uitgevoer. Hierdie fragment is spesifiek gekies omdat daar ook 'n gebied in hierdie fragment voorkom waar Sp1 en Ap2 in dieselfde gebied bind (Figuur 7.9). Die eksperiment is uitgevoer volgens die metode wat in Afdeling 7.2. beskryf is. Benewens die kontrolebane, is proteïene afsonderlik en tesame bygevoeg. In die baan met Sp1 is 1 μ l (1 fpu) Sp1 (30 ng/ μ l) en in die baan met Ap2 is 2 μ l (1,5 fpu) Ap2 (10-25 ng/ μ l) by die DNA gevoeg om interaksie met die DNA te ondergaan. In die gesamentlike Sp1 en Ap2-baan is dieselfde hoeveelhede proteïene gelyktydig by die DNA gevoeg om interaksie met die DNA te ondergaan. Figuur 7.51 toon die resultate van hierdie eksperiment. Soos uit die figuur waargeneem kan word, is daar egter by hierdie fragment geen vergroting van die afgeskermdde gebied of opheffing van bandpatrone anders as die verkry by die individuele bane, waargeneem nie. Die Sp1 en Ap2-gebiede in die Rsa I - Hind III-fragment tree dus nie op soortgelyke wyse as in die 21 bp SV40-gebied op nie. 'n Tweede kollageenfragment, naamlik die Sma I - Rsa I-fragment beskik ook oor 'n Ap2/Sp1 oorvleuende gebied. Weens 'n gebrek aan die beskikbaarheid van die Ap2-proteïene kon geen eksperimente egter uitgevoer word nie.

'n Tweede kollageenfragment naamlik die Sma I - Rsa I-fragment beskik ook oor 'n Ap2/Sp1 oorvleuelende gebied. Dieselfde eksperimentele kondisies as vir die Rsa I - Hind III-fragment is op hierdie fragment toegepas. Soos in die geval van laasgenoemde fragment is ook by die Sma I - Rsa I-fragment geen verandering waargeneem nie. Die bandpatrone vir Sp1 en Ap2, verkry tydens DNase I-afskermingsanalise toon dieselfde patrone in die gesamentlike Ap2/Sp1 baan. Geen vergroting van afskerming of opheffing van enige bandpatrone word waargeneem nie (resultate nie getoon nie). Hoewel van die ander kollageenfragmente ook oor Sp1 en Ap2-beskik wat naby mekaar geleë is, oorvleuel hierdie gebiede nie met mekaar nie. Die invloed wat naasliggende en naby geleë Sp1- en Ap2-bindingsgebiede op mekaar het is as gevolg van 'n tekort in die verkrygbaarheid van Ap2 nie verder in hierdie studie ondersoek nie.

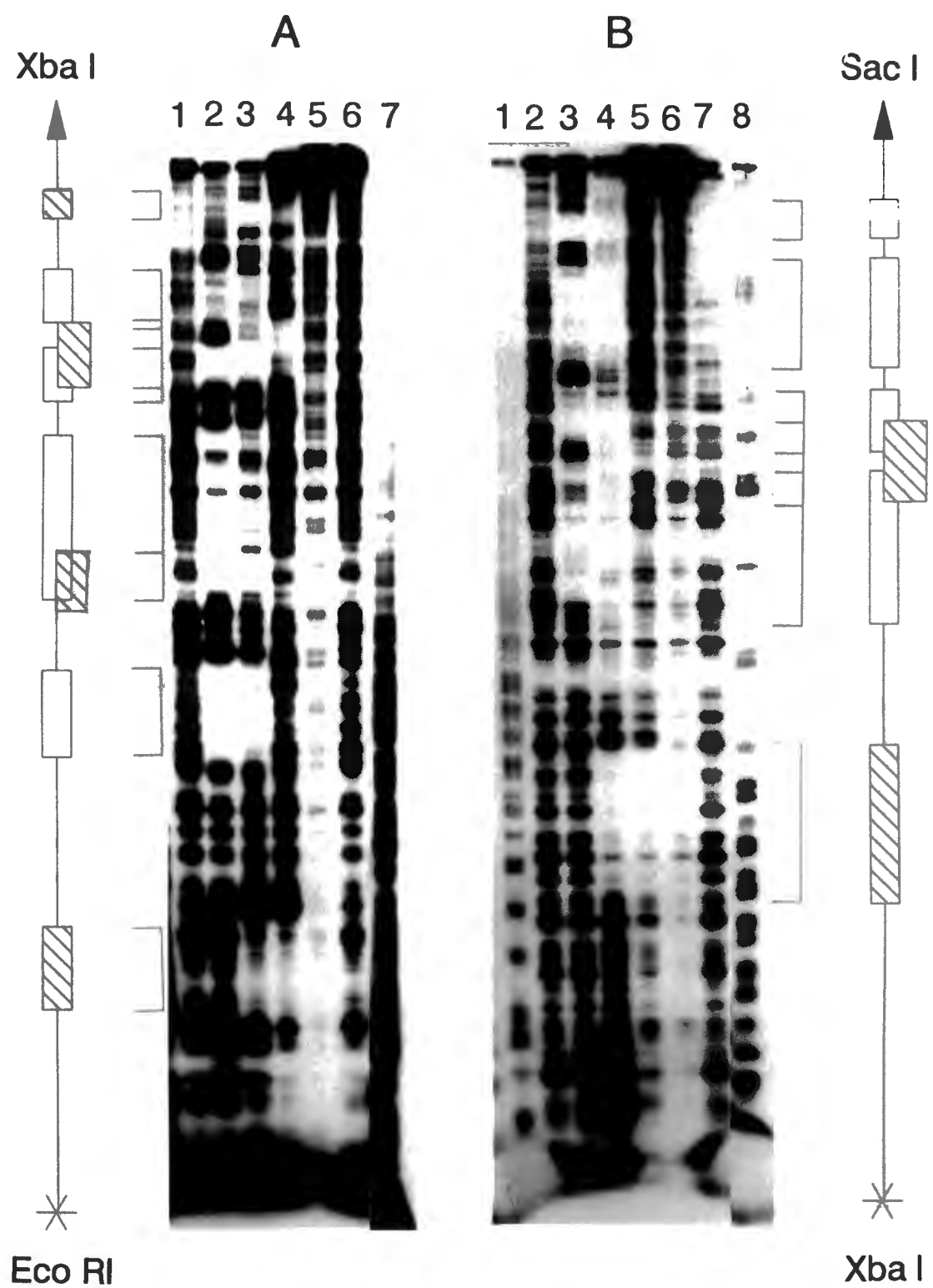
7.5 BESPREKING

Die doelwit van die eksperimente in hierdie hoofstuk, naamlik om die verskillende Sp1-, Ap1- en Ap2-bindingsgebiede op die kollageenfragment onder bestudering te identifiseer en die bindingsaffiniteit van elke bindingspunt te bereken, is bereik. In totaal is sestien Sp1-, een Ap1- en twee-en-twintig Ap2 bindingsgebiede geïdentifiseer. Heelwat van die geïdentifiseerde bindingsgebiede stem met reeds bekende bindingsvolgordes ooreen, maar verskeie unieke bindingsgebiede vir die proteïene is ook in die kollageen-DNA geïdentifiseer.

Berekening van die bindingsaffiniteite van die verskillende bindingspunte is met behulp van twee metodes, naamlik densitometrie en vloeistofsintillasiespektrometrie, uitgevoer. Van hierdie twee metodes wil dit voorkom of die densitometriese bepaling meer akkuraat is. Die nadele van die vloeistofsintillasiespektrometrie metode is dat blokkies van die poli-akrielamiedgel wat geanaliseer word, nie altyd akkuraat uit die gel gesny word nie. Ander faktore wat die berekeninge verder beïnvloed is blussing deur die gedroogde gel tydens sintillasietelling asook die verval van die radioaktief gemerkte peilers.

Die berekende bindingsaffiniteitswaardes wat vir die onderskeie bindingsgebiede bepaal is, moet slegs as 'n tendens van die bindingsaffiniteit beskou word. Baie van die bindingsgebiede is aanliggend tot mekaar geleë en die invloed wat die verskillende bindingsproteïene op mekaar se bindingsaffiniteit het, is nie in ag geneem nie. Die berekende waardes is verkry deur elke bindingsgebied as 'n enkele afsonderlike bindingspunt te beskou wat nie-koöperatief met aanliggende bindingsgebiede reageer nie. Berekening van koöperatiewe binding was nie binne die vermoë van die rekenaarprogram wat gebruik is om die bindingsaffiniteit te bereken nie.

In 'n oorsigfiguur (Figuur 7.52) word die verskillende geïdentifiseerde bindingsgebiede op die kollageenfragment onder bestudering met elkeen se bindingsaffiniteit tendens van hoë, medium of lae bindingsaffiniteit diagrammaties weergegee.



Figuur 7.51 DNase I-afskermingsanalise van die Rsa I - Hind III-kollageenfragment in die teenwoordigheid van Sp1- en Ap2-proteïene.

Die 323 bp Eco RI - Xba I en 320 bp Xba I - Sac I-fragmente van die Rsa I - Hind III-gebied, is geïsoleer en 5'-radioaktief gemerk. Die DNA is met suiwer Sp1- en Ap2-proteïene afsonderlik of gesamentlik asook met Ap1 aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp en op 'n 6% denaturerende poli-akrielamiedgel geskei. Posisies van afskerming word langs die gele aangetoon.

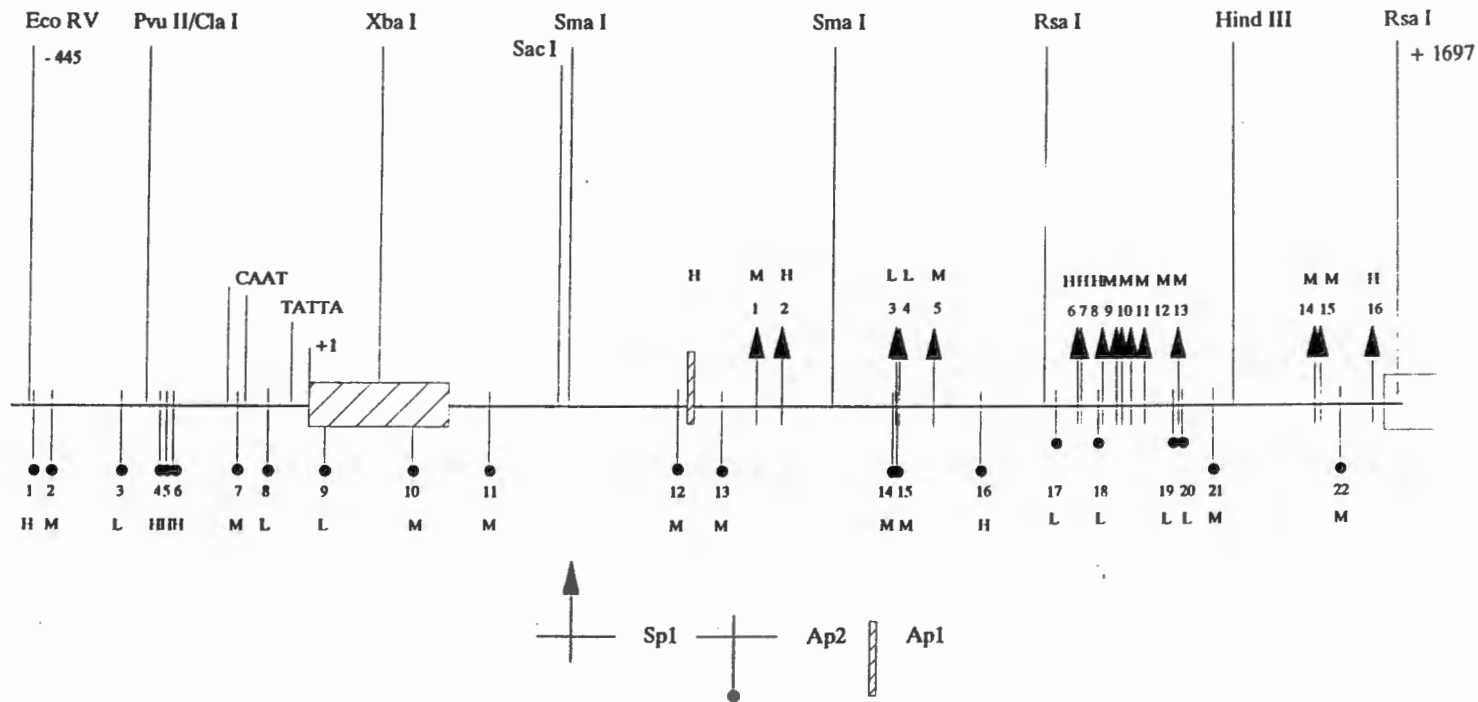
A: Koderende string

- Baan 1 en 6: Geen-proteïenkontrole
- Baan 2: DNA + 1 μ l Sp1 (30 ng/ μ l)
- Baan 3: DNA + 1 μ l Sp1 (30 ng/ μ l) + 2 μ l Ap2 (10-25 ng/ μ l)
- Baan 4: DNA + 2 μ l Ap2 (10-25 ng/ μ l)
- Baan 5: DNA + 1 μ l Ap1 (1 μ g/ μ l)
- Baan 6: TC-volgordes soos verkry na Maxam en Gilbert-volgordebepaling

B: Teenoorgestelde DNA-string

- Baan 1: GA-volgordes soos verkry na Maxam en Gilbert-volgordebepaling
- Baan 2 en 7: Geen-proteïenkontrole
- Baan 3: DNA + 1 μ l Sp1 (30 ng/ μ l)
- Baan 4: DNA + 1 μ l Sp1 (30 ng/ μ l) + 2 μ l Ap2 (10-25 ng/ μ l)
- Baan 5: DNA + 2 μ l Ap2 (10-25 ng/ μ l)
- Baan 6: DNA + 1 μ l Ap1 (1 μ g/ μ l)
- Baan 8: TC-volgordes soos verkry na Maxam en Gilbert volgordebepaling

Pro- α 1(I) kollageengeen



Figuur 7.52 Diagrammatiese voorstelling van die binding van die Sp1-, Ap1- en Ap2-proteïene met ooreenkomstige bindingsaffiniteite aan die pro- α 1(I)-kollageengeen.

H = hoë bindingsaffiniteit
 M = medium bindingsaffiniteit
 L = lae bindingsaffiniteit

Numering kom ooreen met dié in Tabel 7.4

HOOFSTUK 8

ELEKTRONMIKROSKOPIESE ANALISE VAN DNA-PROTEÏENINTERAKSIES

8.1 INLEIDING

Die identifisering van aktiveringsvolgorde, eers in SV40 (Banerji *et al.*, 1981) en later in 'n verskeidenheid virale en sellulêre gene, het aanleiding gegee tot die daarstel van verskillende modelle om te dien as moontlike verklaringsbasis vir die interaksie tussen promotors en aktiveringsvolgordes. Een van hierdie voorgestelde modelle deur Ptashne (1986), die lusvormingmodel, gee die mees waarskynlike verklaring vir hierdie interaksie tussen promotors en aktiveringsvolgordes.

Verskeie onlangse elektronmikroskopiese ondersoeke het data opgelewer wat die lusvormingmodel ondersteun. Théveny *et al.* (1987) het in 'n elektronmikroskopiese ondersoek van die progesteronreseptor lusvorming waargeneem en bevind dat die lus deur die assosiasie van twee reseptore met mekaar oor 'n afstand, plaasvind en dat die DNA tussenin dan as 'n lus uitgestulp word. Selfassosiasie is by Sp1-proteïene waargeneem, selfs oor afstande van so groot as 1,8 kb, soos byvoorbeeld by die tk-promotor. By SV40, waar ses Sp1-bindingsgebiede voorkom, is benewens selfassosiasie tussen die Sp1-proteïene, ook assosiasie waargeneem van twee of meer DNA-molekules aan dieselfde Sp1-molekule (Su *et al.*, 1991). Verdere ondersteuning van die lusvormingmodel is deur Mastrangelo *et al.* (1991) gedemonstreer. Hierdie groep het met behulp van die skandeerelektronmikroskoop vasgestel dat Sp1 aanvanklik 'n tetrameer vorm, waarna verskeie van hierdie gevormde tetramere by die kruispunt van die DNA-lus bymekaarkom en met mekaar assosieer. Hierdie waarneming gee verder ook 'n moontlike verklaring vir die proses wat tot die verhoogde konsentrasie van aktiveerderproteïene by die promotor lei.

Nie net is selfassosiasie tussen proteïene waargeneem nie, maar word ook proteïen-proteïeninteraksie tussen twee verskillende proteïene waargeneem. So het Li *et al.* (1991) gevind dat Sp1 deur lusvorming aan die E2-proteïene van BPV bind. Daar is verder ook gevind dat 10 tot 15% van die gebiede wat by lusvorming betrokke is, nie

met die herkenningselemente ooreenkom nie. Sp1 is egter daarvoor bekend dat dit 'n meetbare affiniteit vir nie-spesifieke DNA het, met die gevolg dat laasgenoemde lusvorming aan hierdie homoloë interaksie toegeskryf kan word. Bykans geen of baie min elektronmikroskopiese ondersoeke van die binding van Ap1 of Ap2 aan DNA is al uitgevoer. Geen literatuurverwysings van elektronmikroskopiese ondersoeke met Sp1-, Ap1- of Ap2-proteïene en die mens pro- α 1(I)-kollageengeen kon opgespoor word nie. In hierdie hoofstuk word die elektronmikroskopiese ondersoek van die binding van Sp1, Ap1 en Ap2-proteïene aan die DNA van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen beskryf.

Die doelwitte van die elektronmikroskopiese ondersoek van die binding van Sp1, Ap1 en Ap2 aan die DNA van die mens pro- α 1(I)-geen is:

- * Om te bepaal of binding van die proteïene aan die DNA in dieselfde gebiede op die DNA waargeneem word as die gebiede wat na DNase I-afskermings-analise waargeneem is;
- * om te bepaal of hierdie tegniek bruikbaar is om langer lengtes DNA vir binding van suiwer proteïene af te tas; en
- * om te bepaal of die moontlike vorming van groot funksionele komplekse tussen die verskillende reguleringsgebiede waargeneem kan word.

8.2 STANDAARDISERING VAN TEGNIEK

Elektronmikroskopie kan op 'n vinnige wyse maar met 'n betreklik lae resolusie bindingspunte op DNA lokaliseer, terwyl biologiese metodes 'n hoë resolusie het, maar tot kort DNA-fragmente beperk is. Aangesien daar egter tydens die elektronmikroskopiese analise na individuele DNA-molekules gekyk word en nie na die globale beeld soos in biologiese metodes nie, kan hierdie tegniek grootliks bydra tot die kennis van die struktuur en funksie van nukleïensure.

Aanvanklik is die vorming van sitochroom C-DNA-komplekse gebruik om enkelstring en dubbelstring RNA en DNA sowel as DNA:RNA-komplekse te bestudeer. Byvoeging van sitochroom C het gehelp om die DNA-molekules minder buigsaam te maak sodat die DNA minder buigings vertoon en verstrengeling, wat dit moontlik gemaak het om die DNA-kontoerlengtes te meet. Vir die bestudering van die interaksie tussen proteïene en die DNA by spesifieke punte is hierdie tegniek egter nie geskik nie. Die sitochroom C-DNA-kompleks het 'n deursnee van 7 tot 10 nm, wat dit moeilik maak om bindingspunte op die DNA te lokaliseer. Die bindingsproteïene het dikwels 'n klein deursnee, wat veroorsaak dat die proteïene in 'n sitochroom C-DNA-kompleks wegraak. Die sitochroom C veroorsaak verder ook 'n hoë agtergrond wat dit moeilik maak om die proteïene wat met die DNA-molekule geassosieer is, te onderskei (Koller *et al.*, 1974).

Verskeie nuwe tegnieke is ontwikkel waar DNA direk op 'n koolstoffilm geadsorbeer word sonder die hulp van 'n proteïenmonolaag soos byvoorbeeld sitochroom C. Een van hierdie tegnieke wat ontwikkel is, is die mika-tegniek wat in hierdie studie gebruik is en deur die groep van Theodor Koller ontwikkel is (Koller *et al.*, 1978). Die elektronmikroskopiese ondersoek wat in hierdie hoofstuk bespreek word, is in die laboratorium van en onder leiding van dr. José Sogo in Zürich, Switzerland, uitgevoer.

Standaardisering van die DNA en proteïenkonsentrasies sowel as die tydsduur van die interaksie is weer eens met die "standaard" SV40-DNA uitgevoer. Die SV40 plasmied (Figuur 4.2) wat die vroeë promotorgebied van SV40 bevat, is deur vertering met die restriksie-ensiem Sca I lineêr gemaak. Die gebruik van hierdie unieke restriksie-ensiem lei daartoe dat die ses naasliggende Sp1-bindingspunte asimmetries in die SV40-fragment geleë is, aangrensend deur onderskeidelik die SP6- en T7-polimerasegene. Hierdie twee gene dien as merkerogene. Die gebruik van merkerogene tydens elektronmikroskopiese ondersoeke vergemaklik die oriëntering van DNA-molekules, veral tydens die lokalisering en kartering van proteïenbindingspunte op die molekule (Koller *et al.*, 1974).

In 'n eerste stap tydens standaardisering is van dieselfde proteïene en DNA-konsentrasies as tydens DNase I-afskermingsanalise gebruik gemaak. Die totale samestelling van die reaksiemengsel is uitgevoer soos in Afdeling 3.4 beskryf is. Om die tydsduur van die interaksie te bepaal, is die helfte van die reaksiemengsel soos vir DNase I-afskermingsanalise vir 15 minute op ys geïnkubeer, terwyl die ander helfte vir 40 minute by kamertemperatuur geïnkubeer is volgens die beskrywing van Su *et al.* (1991). Na die inkubasieperiode waartydens die DNA-proteïeninteraksie plaasvind, is elk van die twee mengsels weer in twee verdeel. 'n Vyfde volume 0,5% glutaraldehyd (Merck 5239) wat vooraf in 1 x bindingsbuffer (25 mM Tris [pH 8,0]; 0,05 M KCl; 6,25 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA; 10 % gliserol; 0,5 mM DTT) voorberei is, is by een deel van die 15 minuut en 40 minuut inkubasie-eksperiment gevoeg. Hierna is die reaksiemengsels beide vir 'n verdere 20 minute by kamertemperatuur geïnkubeer. Die glutaraldehyd tree as fikseerder op deurdat dit die gebonde proteïene aan die DNA vashou. Voorbereidende stappe vir die elektronmikroskopiese ondersoeke kan soms tot konformasieveranderinge of verplasing van proteïene lei en vooraf fiksering deur byvoorbeeld glutaraldehyd kan hierdie probleme verhoed. Glutaraldehyd is egter nie altyd 'n geskikte fikseerder nie. Gevalle waar glutaraldehyd drastiese strukturele afwykings veroorsaak het, is al waargeneem (Sogo *et al.*, 1987). 'n Vergelykende analise tussen preparate met en sonder glutaraldehyd is dus noodsaaklik om te bepaal of die glutaraldehyd in hierdie ondersoek strukturele afwykings sal veroorsaak.

Oor die algemeen is DNA-konsentrasies van tussen 0,1 en 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 'n geskikte hoeveelheid vir goeie verspreiding en analise van die DNA-molekules tydens die mika-tegniek (persoonlike kommunikasie José Sogo). Twee verskillende DNA-konsentrasies, naamlik 0,2 $\mu\text{g/ml}$ en 0,4 $\mu\text{g/ml}$, is vir hierdie doeleindes ondersoek. Voorafbereide 100 mM magnesiumasetaat is verdun na 5 mM en gebruik vir die DNA-verdunningstap. Die voorafberekende volume magnesiumasetaat, noodsaaklik om die DNA na 0,2 en 0,4 $\mu\text{g/ml}$ te verdun, is dan op skoon parafilm geplaas. Vir hierdie ondersoek is twee druppels van die berekende volume magnesiumasetaat vir elke eksperiment op die parafilm geplaas. 'n Duplikaat van elke eksperiment word so uitgevoer en is dan beskikbaar, aangesien mika soms oor gedeeltes beskik wat nie

van goeie kwaliteit is nie met gevolglike verlies van die preparaat. Beskikbare duplikate van die eksperiment, uitgevoer onder dieselfde kondisies is dan reeds beskikbaar. By elke druppel magnesiumasetaat is 2 μ l van die DNA-reaksiemengsel gevoeg en versigtig op en af gepipetteer om te vermeng. Die parafilm is dan met 'n skoon petribakkie bedek om verdamping van die reaksiemengsels te voorkom tydens die 10 minute inkubasiestap. Byvoeging van magnesiumasetaat help met die adsorpsie van die DNA aan die mika, aangesien DNA en mika beide oor 'n negatiewe lading beskik. Byvoeging van die magnesiumasetaat neutraliseer die lading van die fosfaatgroepe in die DNA sodat die DNA dan aan die mika kan adsorbeer (Sogo *et al.*, 1987).

Tydens die inkubasieproses is die mika (Baltzers, Rugby B) in blokke met groottes van 2,5 x 3,0 cm gesny. Hierdie grootte is geskik vir die absorbering van volumes van 30-40 μ l. Elke mika-blok is met behulp van 'n tangetjie in die helfte gesplyt en met die skoon kant na bo, op filtreerpapier neergelê. Na die inkubasieproses is die mika met behulp van 'n tangetjie aan die bopunt geneem en met die skoon kant na onder, skuins teen die DNA-druppel op die parafilm geplaas, sodanig dat die totale mika-oppervlak met die DNA-oplossing kontak maak en oor die mika-oppervlak vloei. Dit is belangrik om daarop te let dat die mika nie kontak met die parafilm mag maak nie, om moontlike kontaminasie deur stofdeeltjies of ander vuilhede uit te skakel. Om van die oormaat DNA en enige soute wat in die DNA kan voorkom en tydens droging kan presipiteer, ontslae te raak, is die mika met die DNA-kant na bo in 'n petribakkie met skoon dubbel-gedistilleerde water geplaas. Hierdie wasstap moet ten minste vier uur duur, maar is gewoonlik oornag gelaat. Die preparaat is hierna in etanol gedehidreer deur dit vier tot vyf keer in 'n beker met 100% etanol te dompel, waarna die mika met die DNA-kant na bo, op 'n skoon filtreerpapier geplaas is om lugdroog te word. Dit is belangrik dat die preparaat in die etanol gedompel word, aangesien water die DNA-stringe tydens lugdroging kan breek (persoonlike kommunikasie José Sogo).

Om replikas te maak, is 'n 1,5 cm² mikablokkie uit die mika van elke eksperiment gesny en met die DNA-kant na bo, deur magnete op 'n ronde skyf geplaas. Hierdie

skyf word dan vertikaal teen 'n hoek van 2° in die verdamper geplaas. Die preparate is dan onder vakuum met platinum/koolstof by 750 Hz en 2000 V beskadu. Tydens hierdie beskaduing is die skyf ook stadig geroteer. Dieselfde skyf met preparate is hierna horisontaal geplaas en verder met koolstof by 60 Hz en 2000 V onder vakuum beskadu. Die beskaduing is telkens onder 'n vakuum van 10^{-4} Torr in 'n Balzers BAE 300 verdamper uitgevoer. Na beskaduing vertoon die preparate 'n swart/bruin kleur.

Replikas gevorm deur die beskaduing word dan van elke preparaat afsonderlik vanaf sy mikablokkie op die oppervlak van kwarts dubbel-gedistilleerde water afgefloteer. Deur die water versigting af te suig, word die replika op sewe 3 mm koper roostertjies met 'n maas van 400 opgevang, waarna die roosterjies onder die elektronmikroskoop ondersoek word. Die flottering van die replikas vanaf die mika is 'n baie kritiese stap en moet uiters versigtig uitgevoer word om te voorkom dat die replika breek en disintegreer. Ondersoek van die replikas is in 'n Philips 420 elektronmikroskoop uitgevoer by 'n vergroting van 13 500 x en 100 kV. DNA-molekules waaraan proteïene gebind het, is gefotografeer by 'n vergroting van 36000 x by 100 kV. Die negatiewe is ontwikkel en is verder vyf keer vergroot tydens die maak van fotografiese afdrukke. Die fotografiese afdrukke is gemaak op hoëkontras fotografiese papier van Tetenal. 'n Voorbeeld van SV40 DNA met Sp1-binding na inkubasie by 0° met en sonder gluteraldehyd (paneel A en B) en na inkubasie by kamertemperatuur met en sonder gluteraldehyd (paneel C en D) word in Figuur 8.1 weergegee.

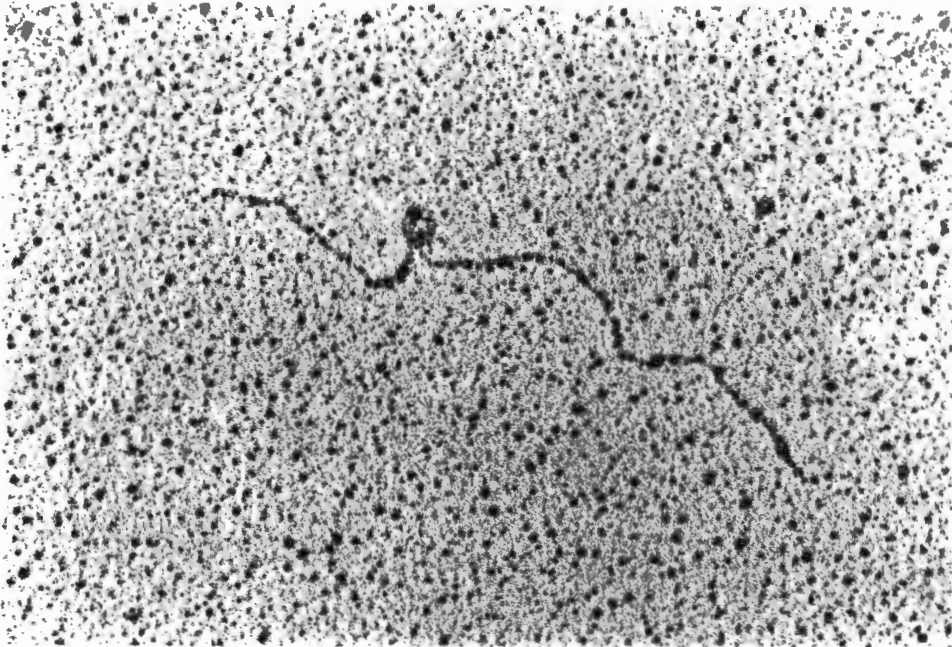
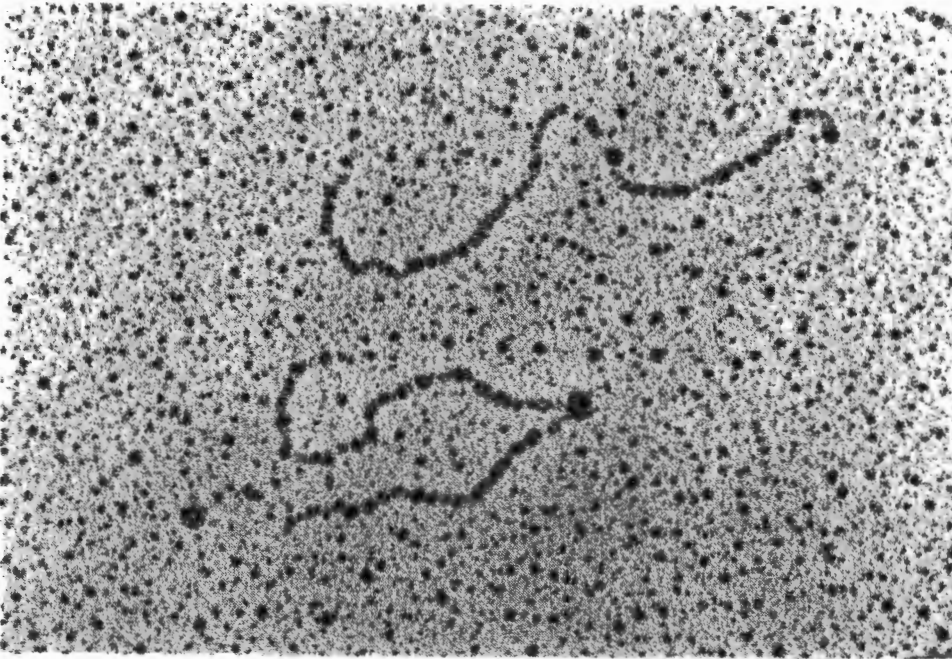
Bepalings van die proteïenbindingspunte op die DNA-molekule is uitgevoer deur die DNA-kontoerlengte van die molekule met behulp van 'n Hewlett Packard-versyferaar te meet (Engels: digitizer). In alle gevalle is die totale kontoerlengte van 'n DNA-molekule met en sonder gebonde proteïene gemeet om die lengte van die molekule te bereken sowel as die kontoerlengte vanaf die kortste punt van die molekule tot die middel van die proteïenkompleks. Faktore wat hierdie metings egter onafhanklik kan beïnvloed, is:

- * Die grootte van die platinumkorrels, want te groot korrels maak dit moeilik om die proteïene te onderskei en te fyn korrels veroorsaak slegte kontras en moeilike visualisering van die DNA-molekules en proteïene;
- * die onakkurate bepaling van die middel van die proteïenkompleks; en
- * die bepaalde lengte-inkremente by 'n gegewe vergroting.

Faktore wat die meting verder kan beïnvloed maar wat soveel moontlik uitgeskakel moet word, is:

- * Vergrotingsfluktuasies;
- * swak fokussering van die beeld; en
- * die metingstegniek van die persoon wat die meting doen (Koller *et al.*, 1978)

'n Interne standaard, gewoonlik 'n DNA van 'n bekende lengte, is noodsaaklik om te bepaal of die metings korrek uitgevoer is. In hierdie studie is dieselfde DNA-molekules as wat gemeet word, maar sonder proteïene as interne standaard gebruik soos ook in Figuur 8.2 (paneel A) waargeneem kan word. 'n Verdere interne standaard waarvan die metings gebruik is om te bepaal of die metingsprosedure korrek is, is die sirkulêre DNA van plasmied pSS. 'n Voorbeeld van die sirkulêre DNA word in Figuur 8.2 (paneel B) getoon. Hoewel die eksperimente van mekaar verskil, is die verskille nie so groot dat hierdie sirkulêre DNA nie ook as interne standaard by die ander eksperimente gebruik kan word nie (persoonlike kommunikasie José Sogo). Kontouerlengtemetings van die totale molekule sowel as metings tot die middel van die proteïenkompleks op die DNA-molekule, word tesame in 'n histogram voorgestel (byvoorbeeld Figuur 8.3). Om 'n goeie histogram te verkry, is dit verkieslik om ten minste 'n honderd molekules se metings bymekaar te voeg, hoewel metings van twintig molekules ook al 'n aanduiding van voorkeurbindingsgebiede sal gee. Die kortste deel van die molekule, dit is die kortste afstand van die begin van die molekule tot en met die middelpunt van 'n proteïenkompleks op die molekule, word links in die histogram aangetoon.

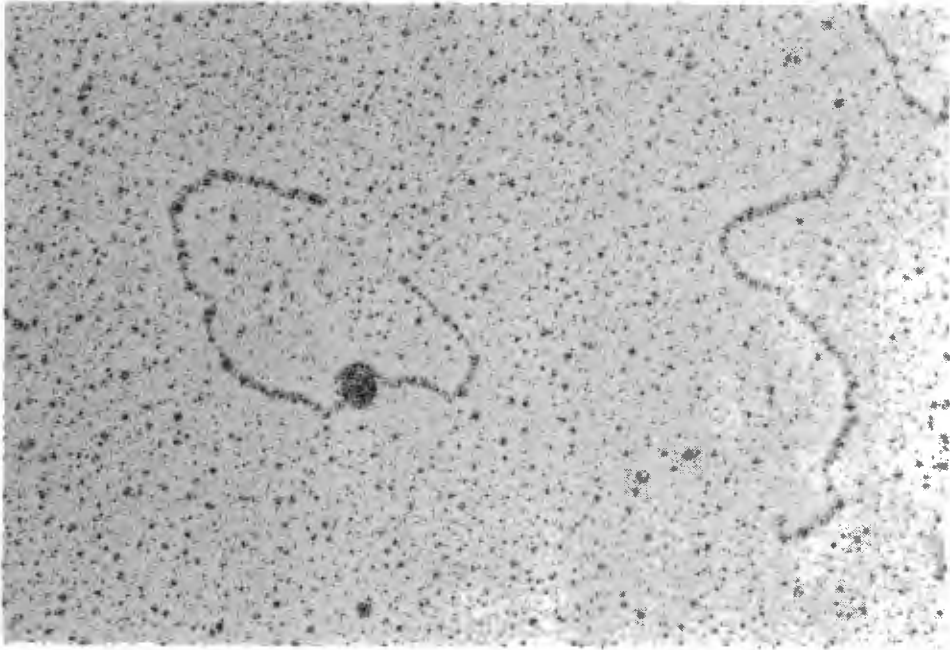
A**B**

Figuur 8.1: Elektronmikroskopie van Sp1-SV40 DNA-komplekse.

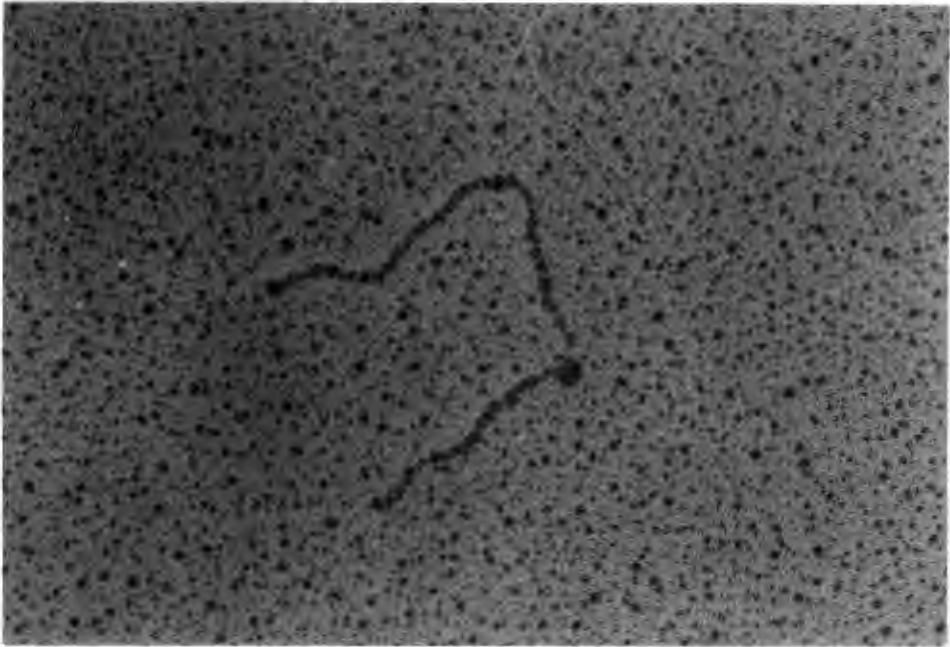
0,4 $\mu\text{g/ml}$ SV40 DNA is vir 15 minute by 0°C in die teenwoordigheid van 30 ng Sp1 geïnkubeer.

- A: Proteïene is aan DNA gefikseer met behulp van 0,5% gluteraldehyd vir 20 minute by kamertemperatuur.
B: Geen toevoeging van gluteraldehyd nie.

C



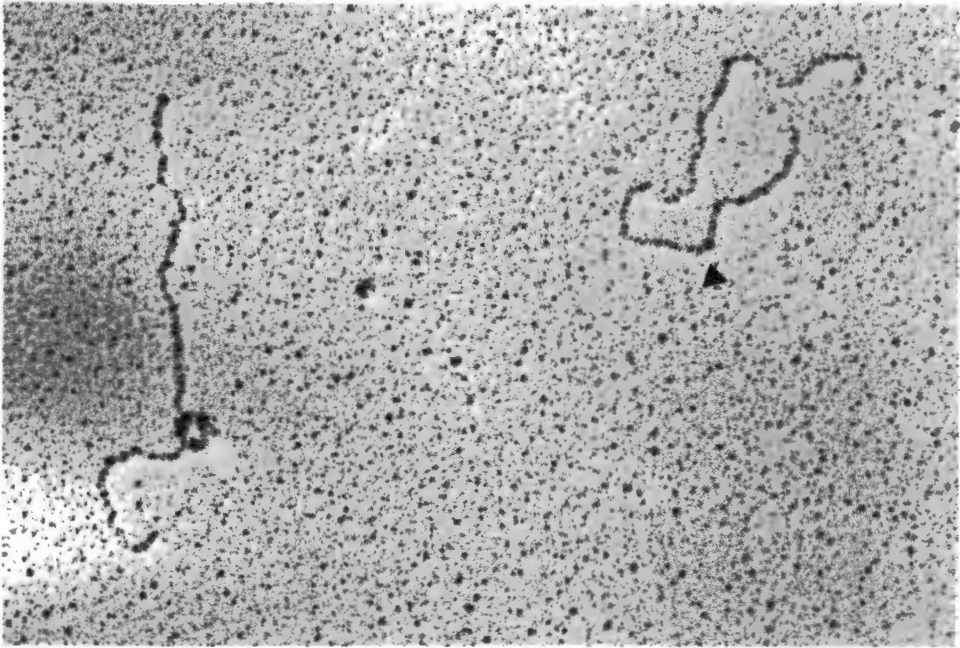
D



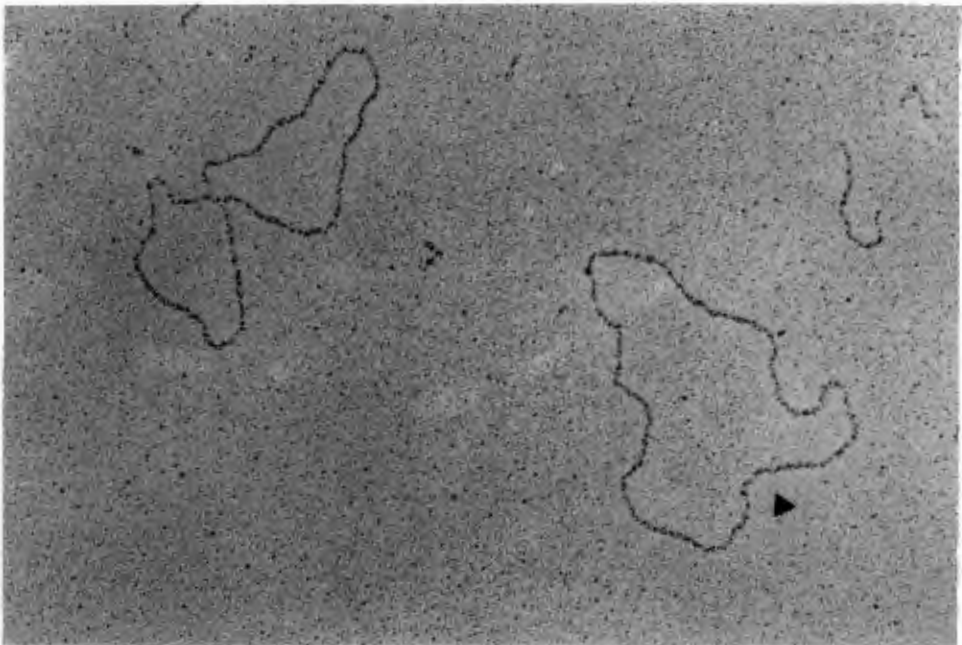
0,4 $\mu\text{g/ml}$ SV40-DNA is vir 40 minute by kamertemperatuur in die teenwoordigheid van 30 ng Sp1 geïnkubeer.

- C: Proteïene is aan DNA gefikseer met behulp van 0,5% gluteraldehyd vir 20 minute by kamertemperatuur.
D: Geen toevoeging van gluteraldehyd nie.

A



B



Figuur 8.2: Interne standaarde gebruik tydens elektronmikroskopiese ondersoek.

- A: 'n Lineêre DNA-molekule sonder gebonde proteïene, soortgelyk aan die DNA-molekule met gebonde proteïene.
B: 'n Sirkulêre DNA-molekule verkry van plasmied pSS.

(Interne standaarde word as (▲) aangetoon)

Uit die standaardiseringseksperimente met SV40-DNA en Sp1 is die volgende waarnemings gemaak:

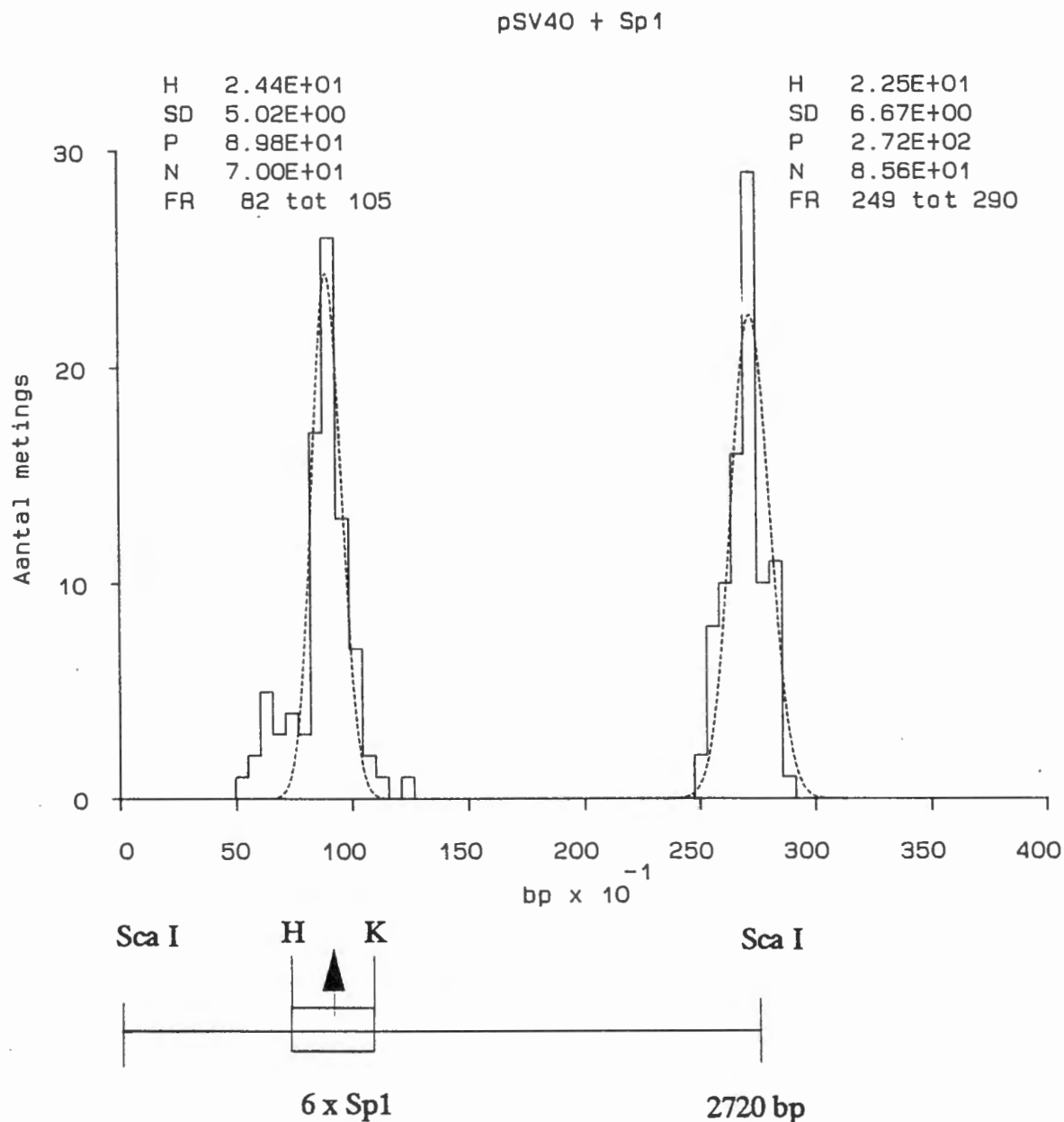
- * 0,4 $\mu\text{g/ml}$ DNA toon 'n beter verspreiding van molekules as 0,2 $\mu\text{g/ml}$ DNA en is makliker analiseerbaar onder die elektronmikroskoop;
- * die gebruik van gluteraldehyd het geen nadelige strukturele effek nie (vergelyk Figuur 8.1);
- * die Sp1-konsentrasie van 1 fpu (30 ng) in die reaksiemengsel van 25 μl is te laag, aangesien min DNA-Sp1 komplekse by hierdie hoeveelheid proteïene waargeneem word; en
- * DNA-Sp1-komplekse toon meer spesifieke binding na interaksie van 40 minute by kamertemperatuur as na 15 minute op ys. Die vlak van nie-spesifieke binding is heelwat hoër by laasgenoemde inkubasietyd.

Uit die gevolgtrekkings van die eerste standaardiseringseksperimente is 'n volgende eksperiment met SV40-DNA en Sp1 saamgestel en uitgevoer met inagneming van die genoemde waarnemings. Hierdie eksperiment is vir 40 minute by kamertemperatuur uitgevoer in die teenwoordigheid van vyf keer meer Sp1-proteïene. Die totale reaksievolume is van 25 μl tot 10 μl afgeskaal om DNA en proteïene te bespaar. Die 10 μl - reaksiemengsel is saamgestel uit 5 μl 2 x bindingsbuffer; 2,5 μl DNA (30 ng/ μl) en 1 μl Sp1 (30 ng/ μl). Na die aanvanklike inkubasieproses is gluteraldehyd bygevoeg en is die reaksiemengsels 'n verdere 20 minute geïnkubeer. Die res van die eksperiment is uitgevoer soos reeds by die eerste standaardiseringseksperimente beskryf is.

In Figuur 8.3 word die histogram van interaksie van Sp1 met die SV40-DNA by kamertemperatuur in die teenwoordigheid van gluteraldehyd weergegee. Op die X-as word die lengte van die metings in basepare aangetoon en op die Y-as die aantal molekules wat in dieselfde interval gemeet is. 'n Gaus-kromme is met behulp van die

rekenaar vir elke voorkeurbindingspunt bepaal. Die rekenaarprogram Digit.2d is spesiaal vir hierdie doel deur dr. David Sargent (Zürich, Switserland) ontwikkel. Die betekenis van die afkortings in al die histogramme van hierdie ondersoek is soos volg: H = hoogte van piek; SD = standaardafwyking van piekposisie; P = posisie van piek; N = aantal metings gebruik by die bepaling van die piekposisie en FR = aantal fraksies wat gebruik is om piekposisie te bepaal. Soos in Figuur 8.3 waargeneem kan word, kom twee voorkeurpieke voor. Die regterkantste piek stel die totale lengte van die DNA-molekule voor en vertoon 'n piek van 2720 bp $\pm$ 67 soos verkry is uit die Gaus-verspreiding. Hierdie metingswaarde kom ooreen met die teoretiese grootte van die SV40-plasmied van 2720 bp. Die piek wat die proteïenbindingspunte op die DNA-molekule verteenwoordig, toon uit die Gaus-verspreiding 'n piek by 898 bp $\pm$ 50. Die Hind III - Kpn I-fragment in plasmied pSV40 is geleë tussen basepare 790 en 1090. Ekstrapolering van hierdie gebied op die histogram na die lyndiagram onder die histogram toon aan dat die grootste gedeelte van die piek waaroor die Gaus-kromme geleë is, in hierdie gebied val. Op grond van die teoretiese, die literatuur en eie DNase I-afskermingsdata, is bevind dat die ses Sp1-bindingspunte geleë is tussen die gebied 904 tot 958 bp. Indien die standaardafwyking in ag geneem word, kan gestel word dat die Sp1-bindingskompleks op die DNA-molekules ooreenkom met die verwagte bindingsgebied. Aangesien elektronmikroskopie 'n lae-resolusie tegniek is en die resolusie in hierdie geval oor ongeveer 80 tot 100 bp strek, kan die ses verskillende naasliggende Sp1-bindingspunte nie individueel onderskei word nie, (persoonlike kommunikasie dr José Sogo). Die ses bindingspunte word dus as een groot kompleks waargeneem.

Die gebrek aan resolusie, waar afsonderlike binding van die onderskeie proteïene nie binne 80 tot 100 bp onderskei kan word nie, is ook ervaar ten opsigte van die merkergene. Die bindingspunte vir Sp6 en T7 lê beide te naby aan die Sp1-kompleks en kan nie van die Sp1-kompleks onderskei word nie. Afsonderlike eksperimente waar slegs T7 RNA-polimerase of slegs Sp6 RNA-polimerase of T7 en Sp6 RNA-polimerase tesame by die SV40-DNA gevoeg is, is op soortgelyke eksperimentele wyse as vir SV40 met Sp1 uitgevoer. In gevalle waar die polimerases afsonderlik aan DNA gebind is, is binding in ongeveer 40% van die molekules waargeneem.



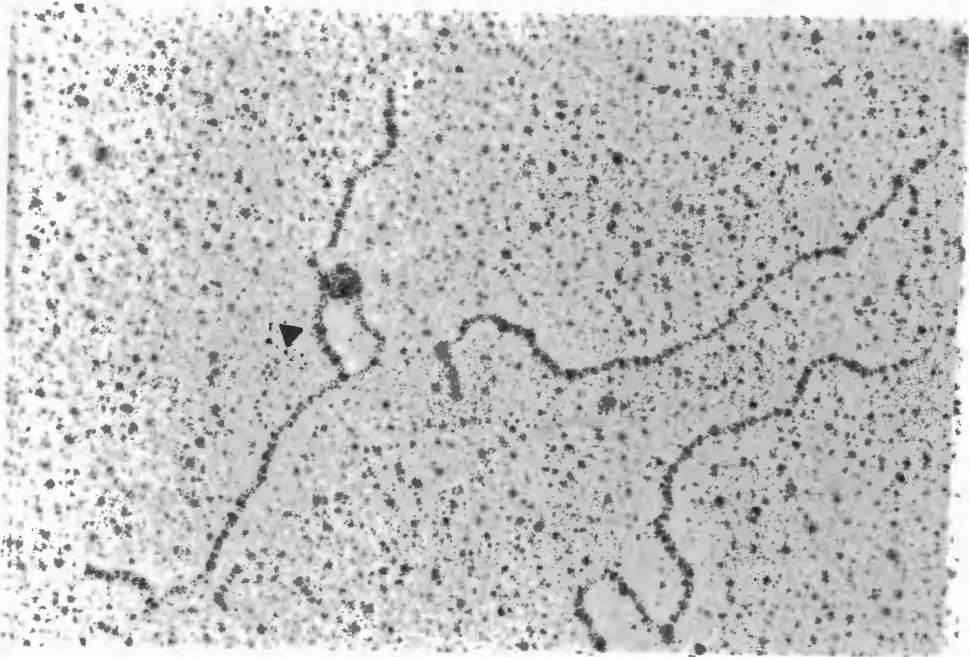
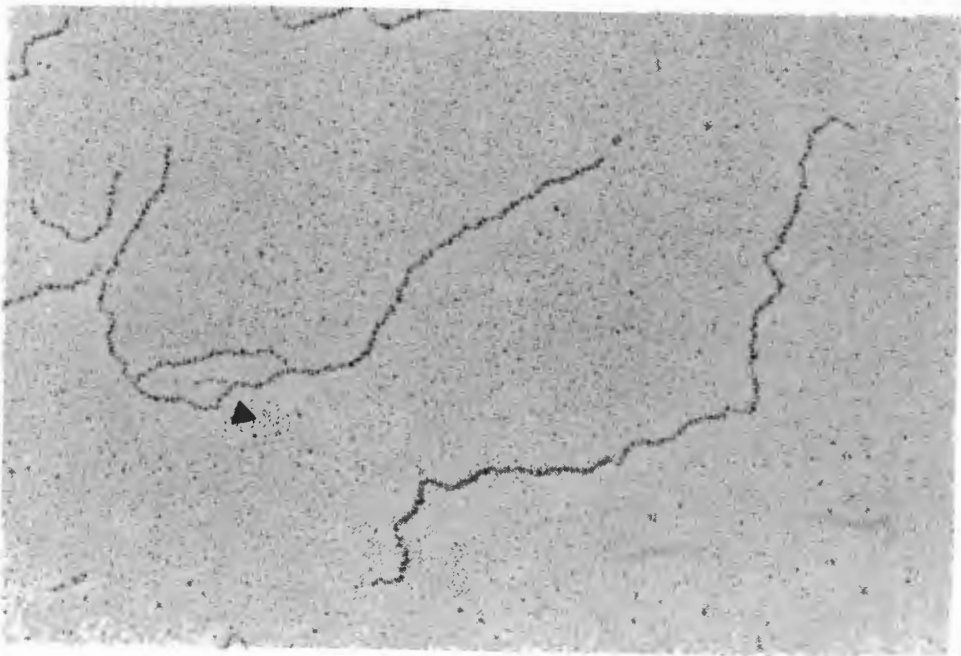
Figuur 8.3: Histogram van de metings van de SV40-DNA-molekules in de teenwoordigheid van Sp1.

Die linker piek toon metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die Sp1-proteïene gebonde aan die DNA. Die regterpiek toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules aan. Die lyndiagram toon die totale 2720 bp SV40-fragment met die 300 bp Hind III - Kpn I gedeelte aan. Die ses Sp1-bindingspunte word as (↑) aangetoon.

(H = Hind III; K = Kpn I)

Beide die polimerasemolekules vorm elk ook 'n baie klein bindingskompleks. Waar beide polimerases by die DNA gevoeg is, is twee bindingskomplekse wat bykans langs mekaar geleë is, waargeneem. Geen proteïen-proteïeninteraksies is egter tussen die Sp6 en T7-molekules waargeneem nie (resultate nie getoon nie). Eksperimente waar Sp1 sowel as T7 en Sp6 RNA-polimerase by die SV40-DNA gevoeg is, vorm dieselfde enkele kompleks as wanneer slegs Sp1 aan die SV40-DNA gebind het, soos in Figuur 8.1 getoon is. Die kleiner T7 en Sp6 RNA-polimerases word waarskynlik onder die groter Sp1-kompleks verberg. Oriëntasie van die molekules was dus nie moontlik deur van die Sp6 en/of T7-merker gene gebruik te maak nie. Heelwat van die molekules vertoon egter replisering, sodat molekules op grond van die oorsprong vir replisering waarvan die posisie bekend is, georiënteer kon word. In Figuur 8.4 word twee voorbeelde van SV40-repliserende molekules met en sonder 'n gebonde proteïen aan die DNA gegee. Soos waargeneem kan word uit die histogram in Figuur 8.3, waar Sp1-bindingsgebiede met die verwagte resultate ooreenstem, blyk dit dat die gebruik van die *ori* geskik is om die orientasie van die molekules vas te stel.

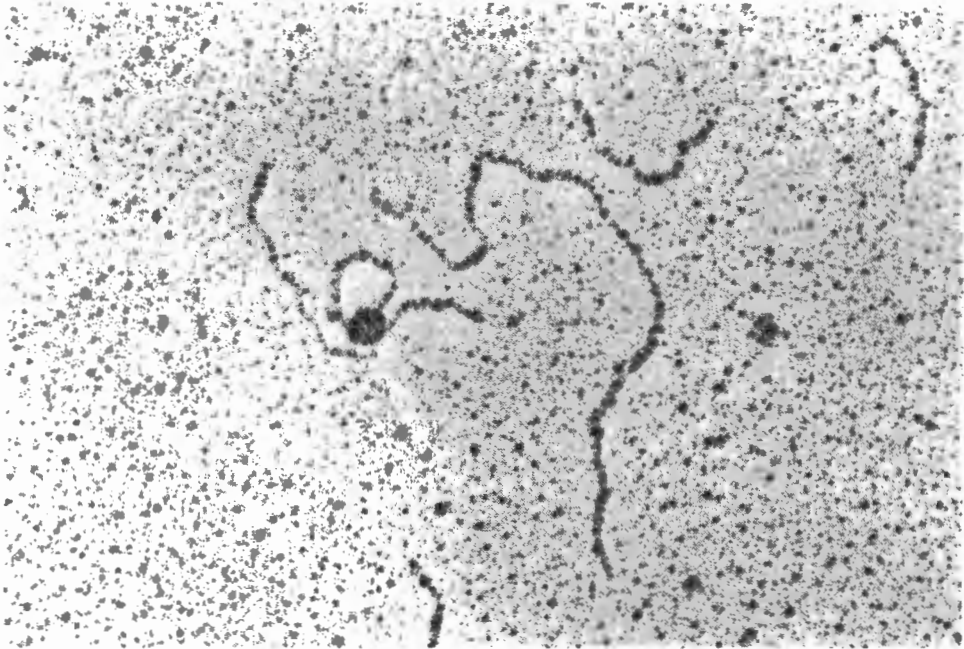
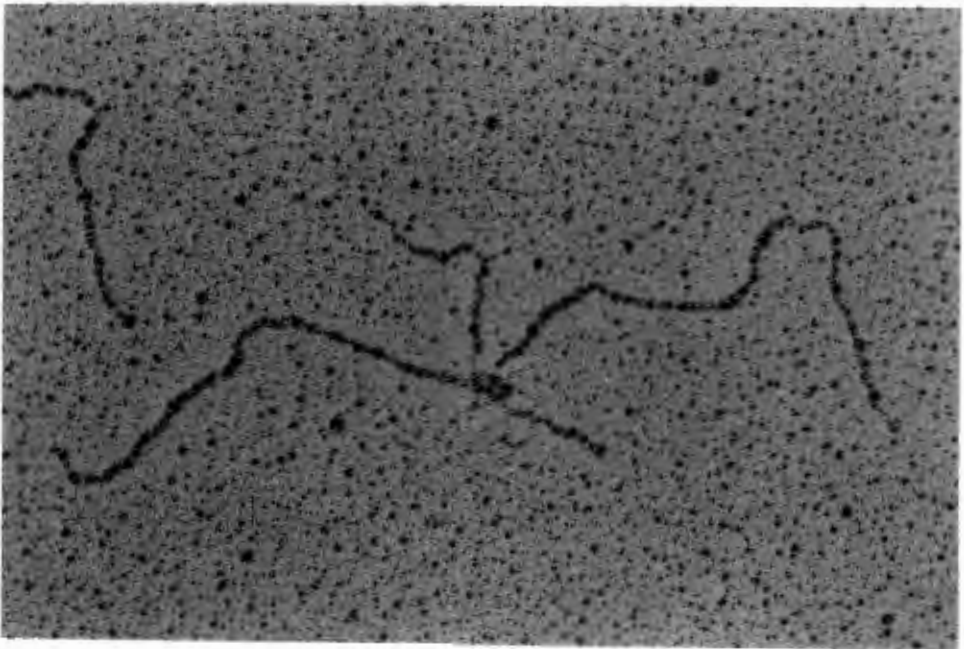
In 'n volgende stap is die frekwensie van Sp1-kompleksvorming op SV40 DNA bepaal. Waar daar tydens die kontoerlengtemetings van die DNA-molekules van foto's gebruik gemaak word waarop voorafgeselekteerde DNA-molekules met die regte grootte en goeie kwaliteit bindingskomplekse voorkom, word vir die bepaling van die frekwensie van kompleksvorming al die DNA-molekules binne 'n bepaalde mikroskoopveld getel en geanaliseer, sonder dat die molekules vooraf geselekteer is. Vir die SV40-DNA is 1021 nie-geselekteerde molekules direk onder die elektron-mikroskoop ondersoek, waarvan agt molekules (0,8%) as gevolg van molekules wat verstrengel is of as gevolg van molekules wat sodanig bo-op mekaar geleë is dat kontoerlengtes nie vir meting onderskeibaar is nie, nie analiseerbaar is nie. By slegs 163 (16%) van die orige 1013 DNA-molekules is kompleksvorming waargeneem, by 151 molekules (92,6%) is enkel proteïenkomplekse waargeneem terwyl, by twaalf molekules (7,4%) lusvorming of twee afsonderlike proteïenkomplekse waargeneem is. 'n Voorbeeld van lusvorming word in Figuur 8.5 (paneel A) gegee. Molekules soortgelyk aan die wat beskryf is deur Su *et al.* (1991), naamlik die binding van meer as een molekule aan 'n bepaalde proteïenkompleks, is ook dikwels waargeneem. 'n Voorbeeld hiervan word in paneel B van Figuur 8.5 gegee.

A**B**

Figuur 8.4: Voorbeelde van repliserende DNA-molekules.

- A: Repliserende SV40 DNA-molekule in kompleks met Sp1-proteïene
- B: Repliserende SV40 DNA-molekule sonder gebonde proteïene.

Die oorsprong van replisering word gebruik om DNA-molekules te oriënteer.

A**B**

Figuur 8.5: Kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en SV40 DNA.

- A: Lusvorming van DNA-molekule as gevolg van proteïen-proteïeninteraksie.
- B: Interaksie van twee verschillende DNA-molekules met dieselfde proteïene.

Elektronmikroskopiese analise is onder dieselfde eksperimentele toestande as vir SV40-DNA met Sp1 op die kontroleplasmied van pSV40, naamlik pSP72, uitgevoer. Hierdie plasmied is ook vooraf deur middel van die Sca I restriksie-ensiem lineêr gemaak. Statistiese analise van 1035 molekules toon dat by slegs 35 molekules (3,3%) kompleksvorming voorgekom het, waarvan slegs twee lusvormings as gevolg van selfassosiasie vertoon. Die ander 33 molekules toon slegs 'n enkel proteïenkompleks.

Op grond van die SV40 kontroleplasmied pSP72 waar kompleksvorming teen 'n frekwensie van 3,3% voorkom, kan gestel word dat die frekwensie van kompleksvorming van 16% by SV40-DNA met Sp1 daarop dui dat spesifieke binding van Sp1 aan die SV40-DNA plaasvind.

8.3 ANALISE VAN KOLLAGEENFRAGMENTE

Die sewe kollageenfragmente (Figuur 4.1) wat in hierdie studie ondersoek is, sowel as die HS-ex1 en HS-int1-fragmente, is almal in vektor pSP64 ingebou soos beskryf in Hoofstuk 4. Verder is die totale kollageenfragment uit plasmied pBB5 geïsoleer en in pGEM-11zf(+) ingevoeg (Afdeling 4.8). Hierdie plasmied is gebruik omdat plasmied pGEM-11zf(+) oor die Sp6 en T7-polimerasegene beskik wat as merkerogene gebruik kan word, terwyl pSP64 ook oor die Sp6 polimerasegene beskik wat as merkergeen kan optree. Elk van die plasmiede sowel as die kontrole vir SV40, naamlik pSP72, die kontrole vir die kollageenplasmiede, naamlik pSP64, en die kontrole vir pGEM-BB5, naamlik pGEM-11zf(+), is met die restriksie-ensiem Sca I verteer om lineêre DNA-fragmente te verkry. Die konsentrasie van elke DNA is daaropvolgend met behulp van 'n konsentrasiegel bepaal.

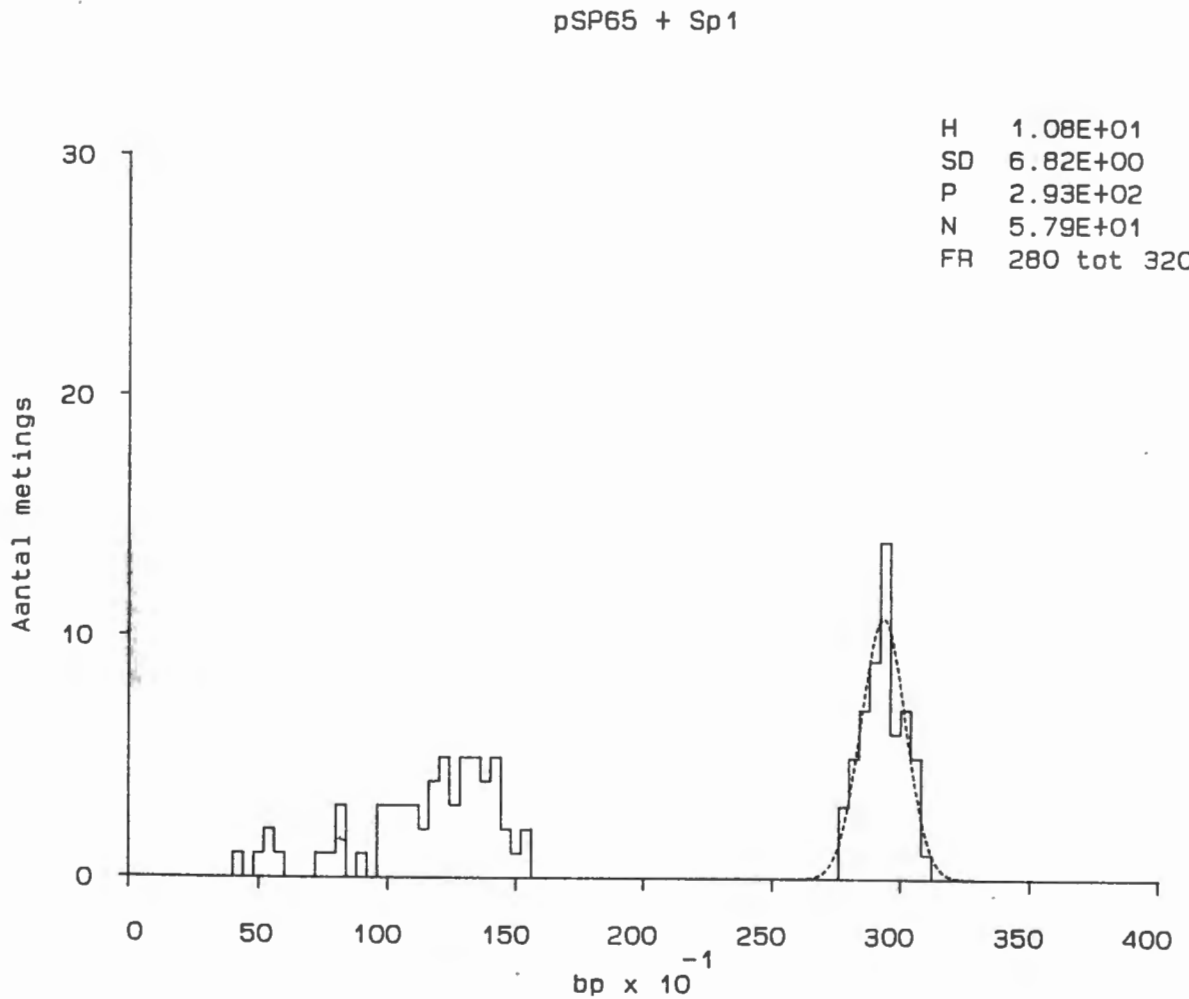
8.3.1 ELEKTRONMIKROSKOPIESE ANALISE VAN DNA MET SP1

Elektronmikroskopiese analise van die sewe kollageenplasmiede sowel as plasmiede pGEM-BB5, pHS-ex1, pHS-int1 en die verskillende kontroles is almal in die

teenwoordigheid van Sp1 uitgevoer, presies soos beskryf is vir die tweede standaardiseringseksperiment met SV40 en Sp1. In alle gevalle is DNA-proteïeninteraksie vir 40 minute by kamertemperatuur uitgevoer, waarna die DNA-preparate tot 0,4 $\mu\text{g/ml}$ verdun is deur die byvoeging van magnesiumasetaat in die teenwoordigheid van 'n vyfde volume gluteraldehyd.

In Figuur 8.6 word die histogram van pSP65 met Sp1 gegee. Hierdie plasmied dien as kontrole vir die verskillende kollageenplasmiede. Hoewel die kollageenfragmente in pSP64 ingevoeg is, verskil pSP64 en pSP65 van mekaar slegs ten opsigte van die oriëntasie van die meervoudige kloneringsgebied. Die kwaliteit van die pSP65 DNA was beter vir analisedoeleindes as die DNA van pSP64 en om hierdie rede is pSP65-DNA dan as kontrole-DNA in hierdie studie gebruik. Vir die samestelling van die histogram is metings van 118 molekules gebruik. Die grootte van die pSP65-plasmied is 3005 bp. Die waarde wat uit die Gaus-kromme van die totale lengte van die DNA-molekules verkry is, is $2930 \text{ bp} \pm 68$, wat goed met die werklike waarde ooreenkom. Soos uit die histogram in Figuur 8.6 waargeneem kan word, is geen duidelike voorkeurpieke ten opsigte van Sp1-binding aan die pSP65-DNA waargeneem nie. Pieke wat wel in die histogram waargeneem word, is op grond van die afwesigheid van spesifieke voorkeurpieke waarskynlik te wyte aan nie-spesifieke binding van die Sp1-proteïene aan die DNA. Rekenaaranalise van die pSP65 DNA-volgorde toon egter wel potensiële Sp1-bindingsvolgordes wat tussen 1257 en 1474 bp geleë is. Hierdie potensiële Sp1-bindingsgebiede kan 'n verklaring wees vir die effens hoër piekhoogtes in daardie gebied.

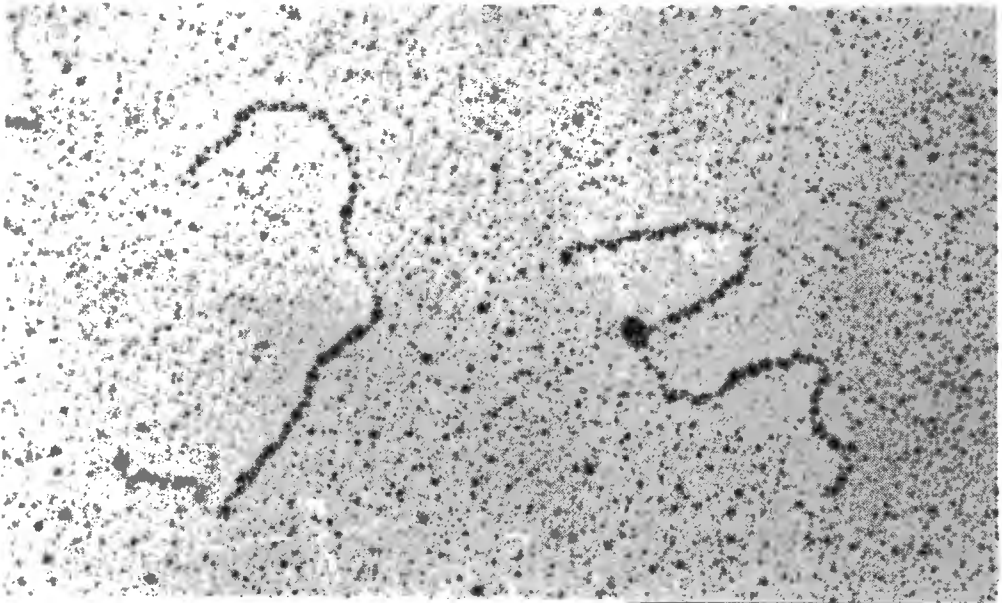
Statistiese analise op 1039 nie-geselekteerde pSP65-molekules om die frekwensie van Sp1 kompleksvorming te bereken, is direk onder die elektronmikroskoop uitgevoer. Van die 1039 molekules was slegs een nie analiseerbaar nie, terwyl 'n duisend molekules (96,2%) geen proteïenbinding getoon het nie. Slegs 3,7% (38 molekules) van die molekules is dus by kompleksvorming betrokke. Van die 38 molekules toon 34 (89,5%) enkel proteïenbinding aan en vier (10,5%) twee proteïenkomplekse of is by lusvorming betrokke. 'n Voorbeeld van die kompleksvorming by pSP65 word in Figuur 8.7 weergegee.



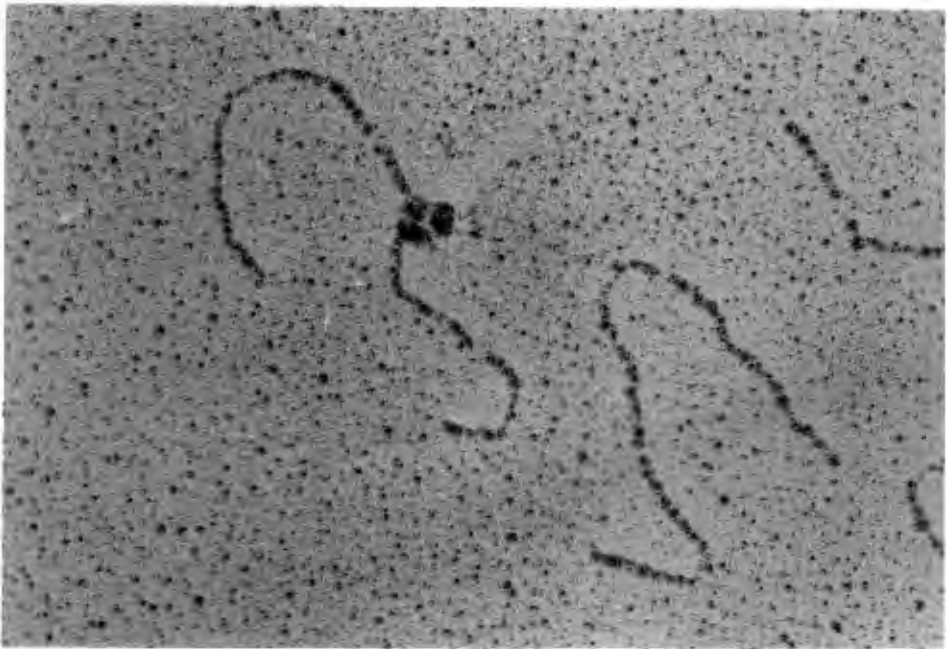
Figuur 8.6: Histogram van die metings van die pSP65 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene.

Die linker piek toon metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekule na die middelpunt van die gebonde proteïene. Die regter piek toon die metings van die totale lengte van die DNA-molekules aan.

A



B



Figuur 8.7: Elektronmikroskopie van Sp1-pSP65-komplekse.

A: 'n Enkel proteïenkompleks.

B: Twee Sp1-proteïen komplekse langs mekaar geleë op dieselfde DNA-molekule met 'n derde Sp1-proteïen gebonde aan beide proteïene deur proteïen-proteïeninteraksie.

In paneel A word 'n enkelkompleks aangetoon en in paneel B twee komplekse langs mekaar met 'n derde proteïen wat bo-op die ander twee komplekse bind. Die frekwensie van 3,7% van kompleksvorming vergelyk goed met dié van die kontrole plasmied van pSV40, naamlik pSP72, wat 'n kompleksvormingfrekwensie van 3,3% gee.

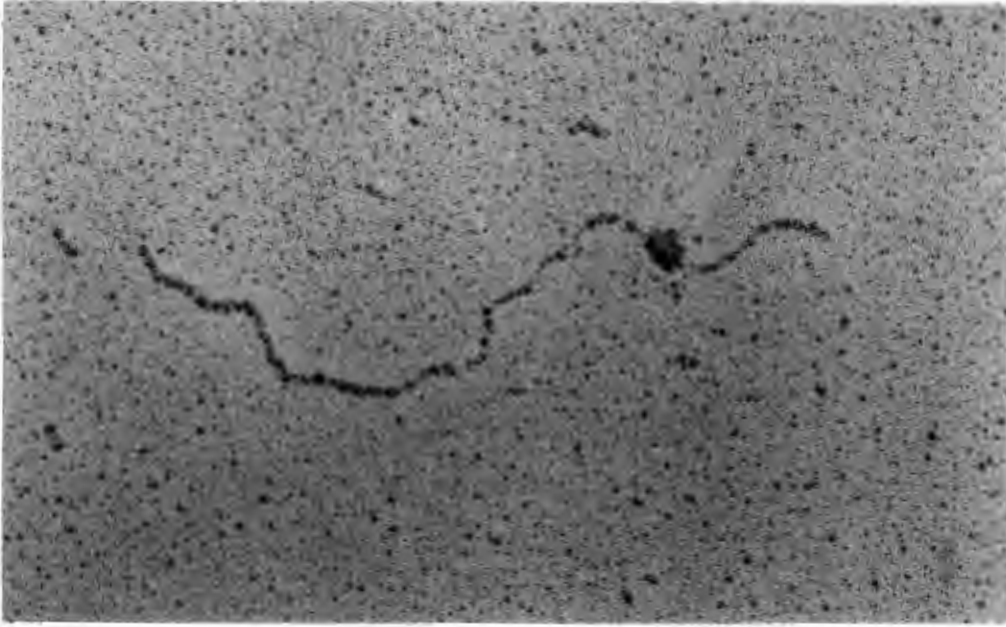
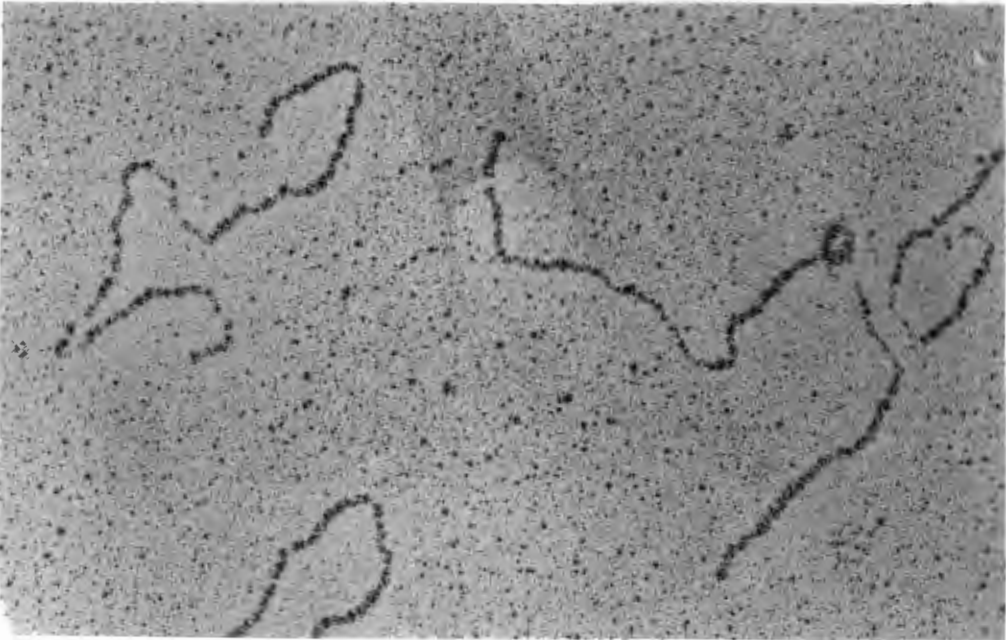
Elektronmikroskoopfoto's van plasmied pCX wat 'n grootte van 3369 bp het en wat onder meer die promotorfragment insluit, word in Figuur 8.8 weergegee. Paneel A en paneel B van Figuur 8.8 toon twee verskillende posisies van proteïenbinding op die DNA-molekule aan. Die histogram van die DNA-molekules verkry na kontoerlengtemeting van die totale DNA-molekule en die meting vanaf die naaste eindpunt van die DNA-molekule tot die middel van die proteïenkompleks word in Figuur 8.9 (paneel A) weergegee. Ongeveer 191 metings is vir hierdie histogram gebruik. Die regterkantste piek verteenwoordig weer eens die totale lengte van die DNA-molekules. Gaus-krommebepaling toon dat hierdie piek by $3460 \text{ bp} \pm 69$ voorkom in vergelyking met die teoretiese waarde van 3369 bp. Weens die agtergrond wat deur die pSP64/65-volgordes veroorsaak word (Figuur 8.9, paneel B), is dit moeilik om die pieke wat spesifieke proteïenbinding aan die DNA verteenwoordig, te analiseer. Hoewel DNase I-afskermingsanalise van die Cla I - Xba I-kollageenfragment met Sp1 geen Sp1-binding getoon het nie (Figuur 7.5) kom 'n voorkeur bindingspiek effens hoër as die ander pieke wel voor, wat ooreenkom met 'n gebied in die DNA wat die DNA-volgorde 5'-GGGCGG-3' bevat (Figuur 7.5, paneel C). Hierdie DNA-volgorde kom ooreen met die konsensusvolgorde vir Sp1. Uit hierdie elektronmikroskopiese analise wil dit dus voorkom of Sp1 wel bind aan die Sp1 geleë langs die proksimale CCAAT-motief.

Statistiese analise van 1003 nie-geselekteerde molekules om die frekwensie van kompleksvorming te bepaal, is direk onder die elektronmikroskoop uitgevoer. Van die 1003 molekules wat ondersoek is, was slegs een molekule nie analiseerbaar nie. Kompleksvorming is by slegs 45 molekules (4.5%) waargeneem. Hiervan het 39 molekules (86,7%) enkel proteïenkomplekse gevorm en ses molekules (13,3%) twee komplekse of lusvorming. 'n Opvallende kenmerk van die analise was dat die gebied

waar kompleksvorming voorgekom het, van molekule tot molekule wissel. Hierdie tendens kan waargeneem word in Figuur 8.8. Ook in die histogram van Figuur 8.9 (paneel A) word hierdie tendens weerspieël.

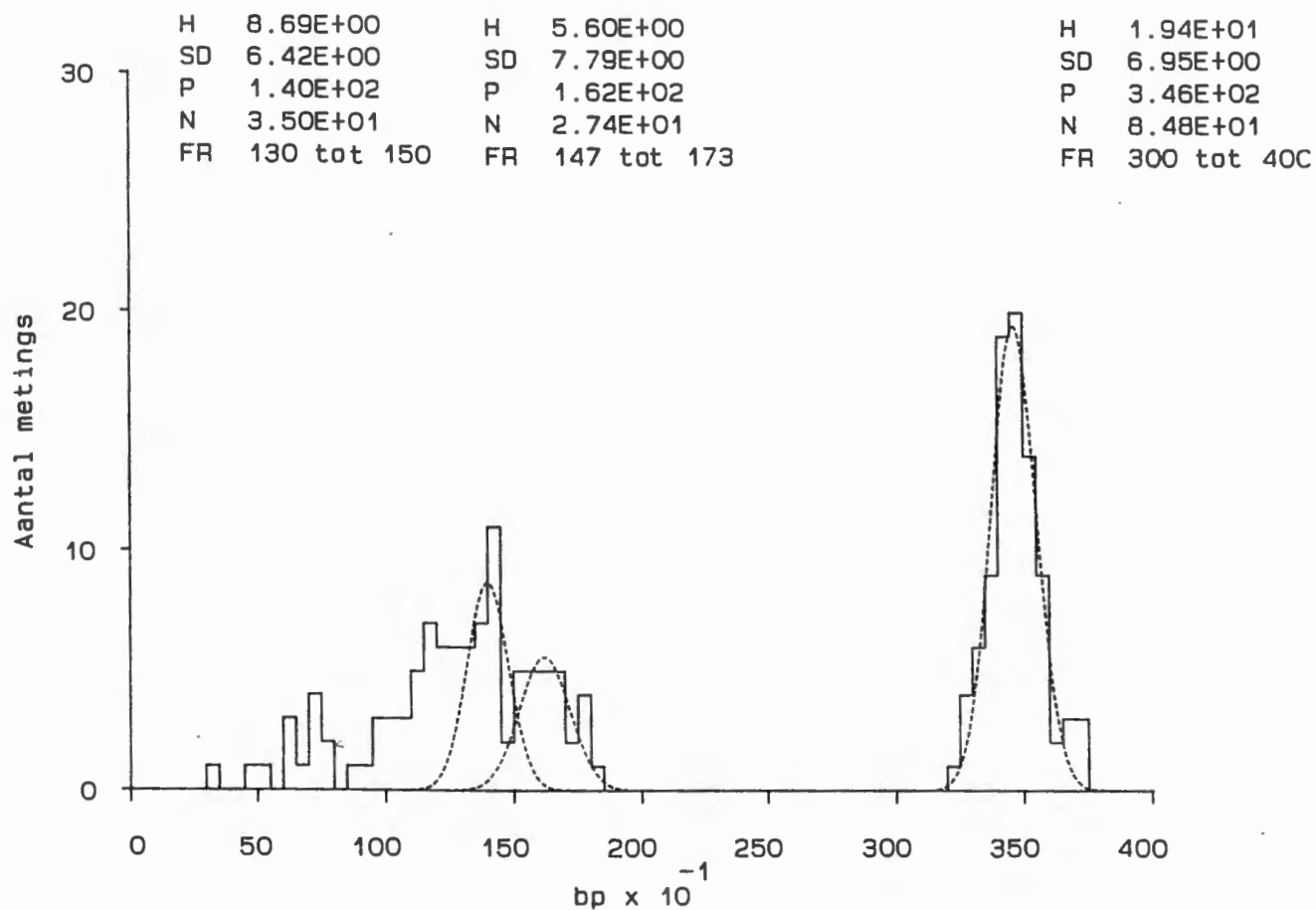
Die twee ander kollageenfragmente wat in plasmiede pEP en pXS gekloneer is en wat geen Sp1-binding tydens DNase I-afskermingsanalises (Figuur 7.4 en Figuur 7.6) ondergaan nie, wys ook geen voorkeurpiekvorming vir Sp1 tydens elektronmikroskopiese analise uit nie. Die totale lengte van die pEP DNA-molekules is uit die kontoermetings bereken op 3170 bp $\pm$ 45 en dié van die pXS DNA-molekules op 3350 bp $\pm$ 38 teenoor die werklike waardes van 3187 bp en 3369 bp onderskeidelik. Kompleksvorming wat voorkom, kan toegeskryf word aan nie-spesifieke Sp1-binding en agtergrondbinding van Sp1 aan pSP 64/65 DNA-volgordes. Die frekwensie van kompleksvorming by pEP plus Sp1 toon dat van die 1044 molekules wat geanaliseer is nege molekules (0,8%) nie analiseerbaar was nie. Slegs 35 molekules (3,4%) neem aan kompleksvorming deel. Van hierdie 35 molekules is 27 molekules (77,1%) betrokke by enkel bindingskomplekse en agt molekules (22,9%) betrokke by twee proteïenbindingskomplekse of lusvorming. 'n Voorbeeld van 'n enkel Sp1-proteïenkompleks op 'n pEP-DNA-molekule word in Figuur 8.10 (paneel A) gegee.

Analise van die frekwensie van kompleksvorming by pXS toon dat slegs 26 molekules (2,5%) van die 1030 molekules wat geanaliseer is, betrokke is by kompleksvorming. Van hierdie 26 molekules het 22 (84,6%) een proteïenkompleks getoon en vier (15,4%) twee komplekse of lusvorming. Vier molekules (0,4%) van die 1030 molekules was nie analiseerbaar nie. In Figuur 8.10 (paneel B) word 'n voorbeeld van 'n enkel Sp1-proteïenkompleks op 'n pXS DNA-molekule gegee. Die frekwensie van kompleksvorming by pEP en pXS is vergelykbaar met dié van die kontrole-DNA, pSP65 en ondersteun die waarneming dat geen Sp1-spesifieke bindingspunte op die kollageenfragmente Eco RV - Pvu II en Xba I - Sac I voorkom nie.

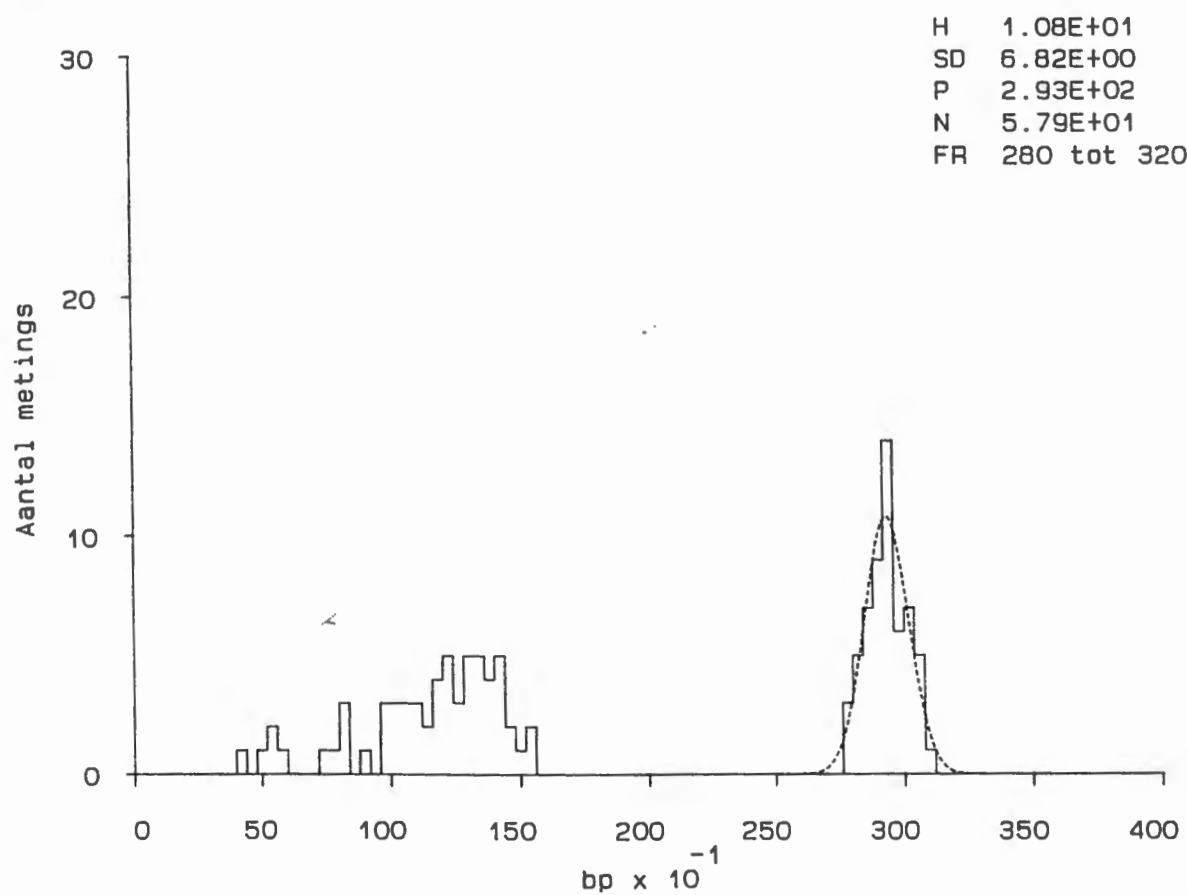
A**B**

Figuur 8.8: Twee verschillende posities van gebonde Sp1-proteïene aan die 3369 bp pCX DNA-molekules.

A



B



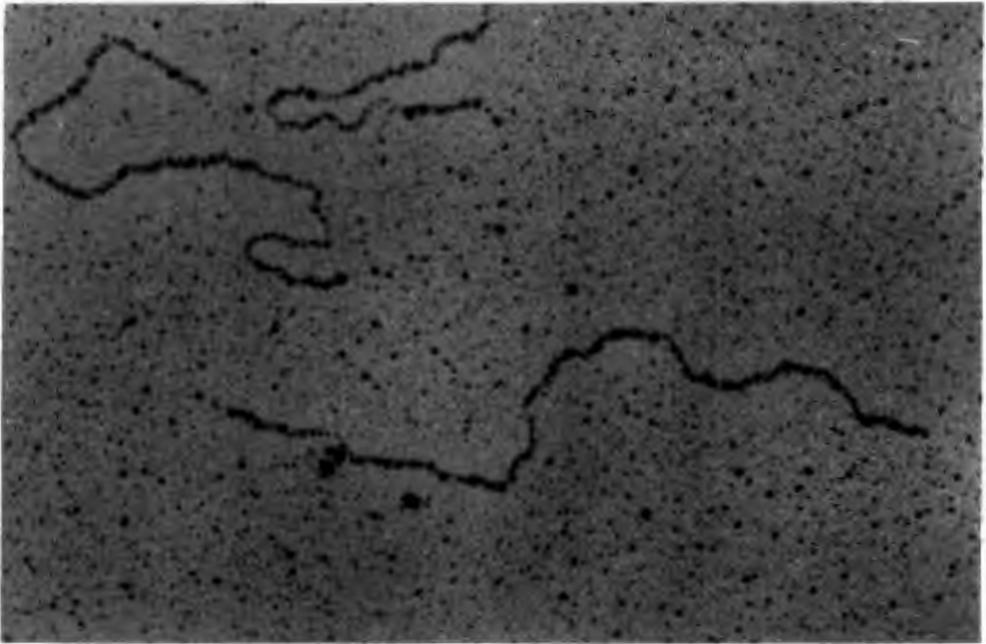
Figuur 8.9: Histogram van die metings van die eindpunte van die DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene.

- A: Metings van die 3369 bp pCX DNA-molekules.
B: Metings van die 3005 bp pSP65 DNA-molekules.

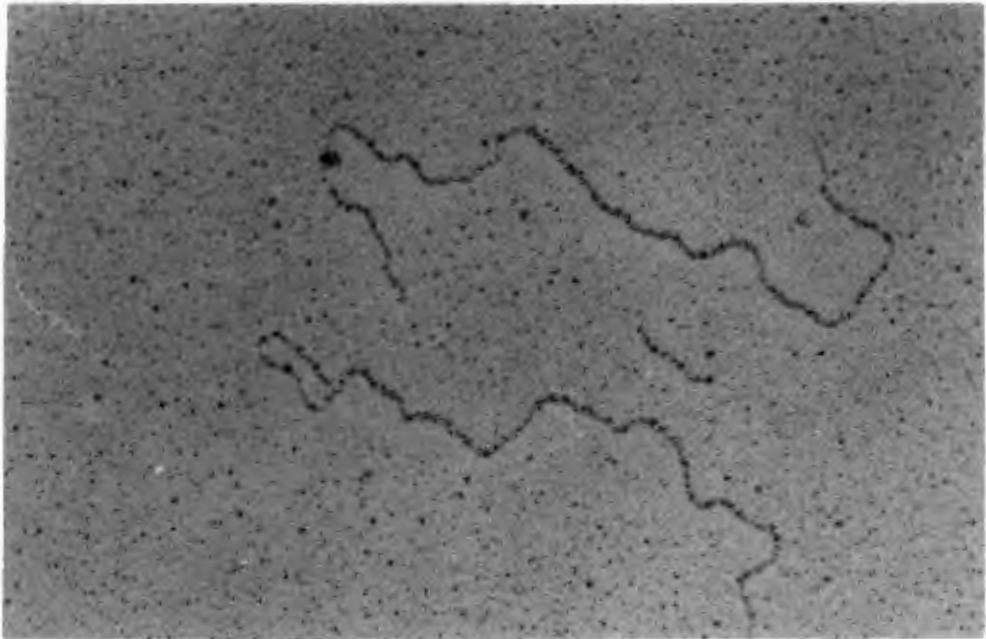
Die linker pieke toon metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules na die middelpunt van die gebonde Sp1-proteïene. Die regter piek toon die metings van die totale lengte van die DNA-molekules aan. In die lyndiagram onder die histogram in paneel A word die 370 bp Cla I - Xba I-fragment aangetoon met 'n potensiële Sp1-bindingspunt (↑).

(C = Cla I; X = Xba I)

A



B



Figuur 8.10: A: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en pEP DNA-molekules.
B: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en pXS DNA-molekules.

Die kollageenfragmente wat in plasmiede pSS en pRS teenwoordig is, het wel Sp1-binding in die DNA aangetoon tydens DNase I-afskermingsanalises (Figuur 7.7 en Figuur 7.8). Elektronmikroskopiese analise van hierdie DNA met Sp1 toon voorkeurbindingspieke vir Sp1 aan wat in ooreenstemming is met die bindingsgebiede wat tydens DNase I-afskermingsanalise geïdentifiseer is. 'n Histogram van die pSS DNA met Sp1 word in Figuur 8.11 gegee. Uit die Gaus-verspreidingskromme is die totale lengte van die pSS DNA-molekule bepaal as $3430 \text{ bp} \pm 63$, wat goed vergelyk met die werklike waarde van 3403 bp. Die totale lengte van die pRS-molekule kom ook goed ooreen met die werklike waarde van 3331 bp, naamlik $3400 \text{ bp} \pm 75$ (data nie getoon nie). In die lyndiagram onder die histogram in Figuur 8.11, word die Sp1-bindingsgebiede soos verkry is uit DNase I-afskermingsanalise in vergelyking met die voorkeurbindingsgebiede, in die histogram aangetoon. Statistiese analise van hierdie molekules het die volgende na vore gebring: Van die 1015 pSS-molekules wat geanaliseer is het 950 (93,6%) geen binding met proteïene ondergaan nie. Die ander 65 molekules (6,4%) het wel proteïenbindingskomplekse gevorm. Ongeveer 40 van die 65 molekules (61,5%) het slegs een bindingskompleks gevorm (Figuur 8.12) terwyl by 14 molekules (21,5%) twee komplekse of lusvorming waargeneem is. By 11 molekules (17%) is twee of meer DNA-molekules gevind wat aan dieselfde Sp1-proteïene bind soortgelyk as die waargeneem by die SV40-Sp1-kompleksvorming.

Bepaling van die frekwensie van kompleksvorming by pRS het 'n frekwensie aangetoon soortgelyk aan dié waargeneem by SV40 met Sp1. Ongeveer 1027 molekules is geanaliseer waarvan 850 (82,8%) geen proteïenbinding ondergaan het nie. Van die 177 molekules (17,2%) wat wel proteïenbinding ondergaan het, het 146 molekules (82,5%) slegs een proteïenkompleks en 22 molekules (12,4%) twee komplekse of lusvorming getoon. Nege molekules (5,1%) het soos in die geval van SV40 met Sp1, by pSS met Sp1, binding van twee of meer DNA-molekules aan dieselfde proteïene ondergaan.

Elektronmikroskopiese analise van pHR295 met Sp1 is ook onder dieselfde kondisies as vir die ander DNA-fragmente uitgevoer. In Figuur 8.13 word voorbeelde van proteïenkompleksvorming op die DNA-molekules gegee. Paneel A toon 'n enkelbinding, paneel B twee naasliggende Sp1-bindingskomplekse en paneel C lusvorming. 'n Histogram van die metings word in Figuur 8.14 gegee. Die grootte van die totale lengte van die DNA-molekule soos uit die Gaus-kromme verkry, is $3270 \text{ bp} \pm 93$, wat goed met die werklike grootte van 3295 bp ooreenkom. Drie verskillende proteïenvoorkeurpieke kan in die histogram in paneel A waargeneem word. Die middelste voorkeurpiek kom egter ooreen met die gebied waar die kollageenfragment geleë is en stem ook ooreen met die gebied waar Sp1-binding na DNase I-analise (Figuur 7.9) geïdentifiseer is. Uit die waardes van die Gaus-kromme wil dit voorkom of die piek rondom $1490 \text{ bp} \pm 46$ geleë is.

Die ander twee voorkeurpieke wat in die histogram waargeneem word kan waarskynlik as agtergrond van die pSP64/65-volgordes verklaar word (vergelyk Figuur 8.6). Vergelyking van die twee histogramme (pHR295 + Sp1) en (pSP65 + Sp1) met mekaar, wys uit dat die twee ander pieke in Figuur 8.14 soortgelyke bindingspieke vertoon as die ooreenkomstige gebiede in die histogram van Figuur 8.6 van pSP65 + Sp1.

Statistiese analise van 1015 molekules toon dat 175 molekules (17,2%) proteïenkomplekse gevorm het. Van hierdie 175 molekules het 147 (84%) enkel komplekse, 15 (8,6%) twee komplekse of lusvorming ondergaan en is 13 molekules (7,4%) betrokke by binding van twee DNA-molekules met mekaar deur proteïeninteraksie. Die frekwensie van kompleksvorming by pHR295 is dus soortgelyk aan die frekwensie van kompleksvorming waargeneem by SV40 en pRS DNA en Sp1.

Die Hind III - Rsa I-fragment wat in plasmied pHR3' voorkom, is ook aan elektronmikroskopiese analise onderwerp. Uit hierdie analise is waargeneem dat Sp1-binding voorkom in die ooreenstemmende gebied as wat met DNase I-afskermingsanalise (Figuur 7.10) waargeneem is (data nie getoon nie).

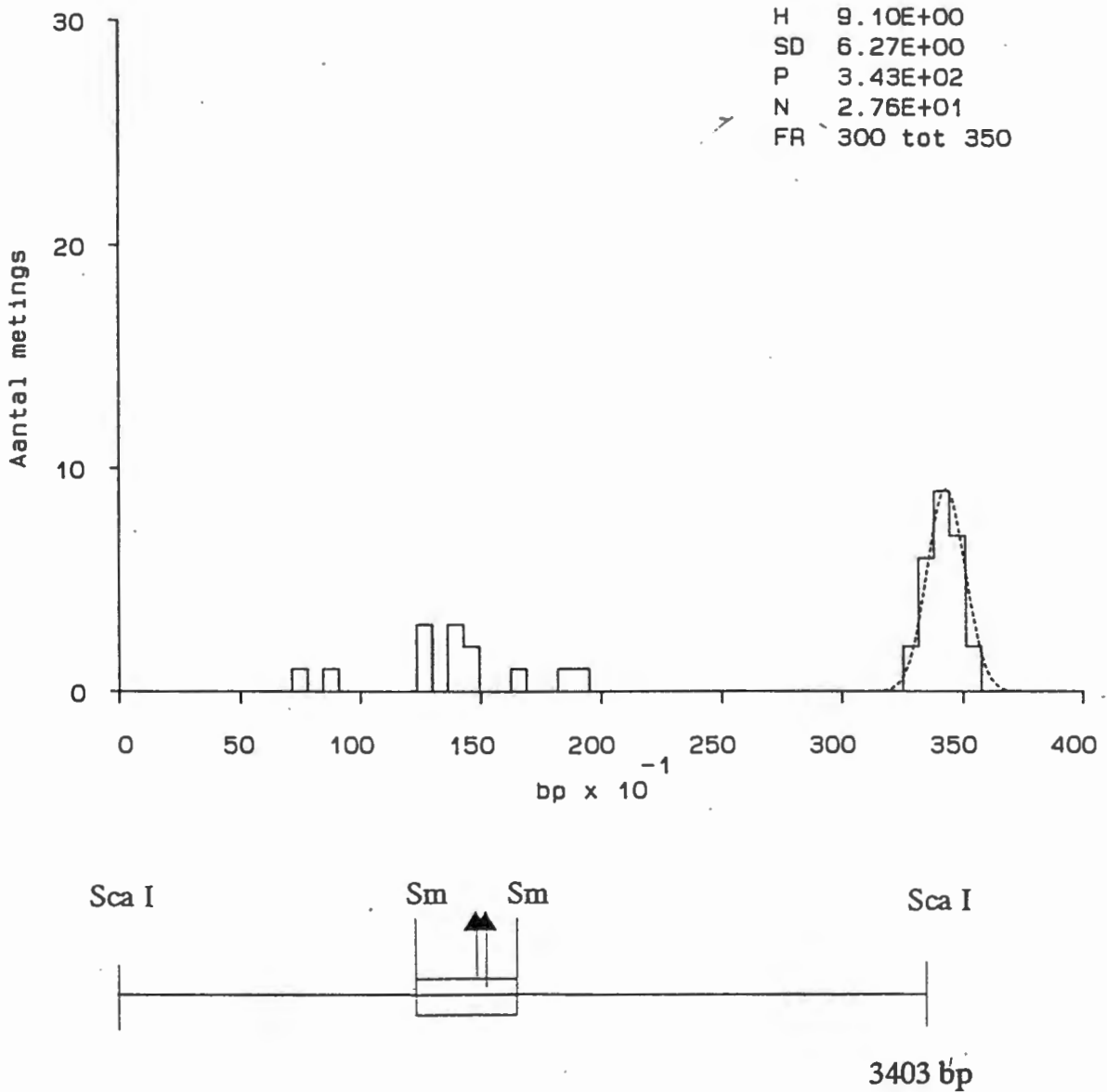
Die bepaling van die frekwensie van kompleksvorming toon dan ook dat 9,8% van die molekules, dit wil sê 104 van die 1054 molekules, betrokke is by proteïen-DNA-kompleksvorming. Sewe molekules (6,7%) is betrokke by binding van ten minste twee molekules met mekaar deur proteïeninteraksie. Verder vorm 82 molekules (78,8%) enkel proteïenkomplekse (Figuur 8.15) en 15 molekules (14,4%) twee proteïenkomplekse of is betrokke by lusvorming.

Om te bepaal of Sp1-proteïene interaksie met Sp1-proteïene in ander reguleringsgebiede in dieselfde geen ondergaan, is elektronmikroskopiese analyses ook op langer gebiede van die kollageengeen uitgevoer. Die plasmied pHS-ex1 wat die kollageenfragmente Eco RV - Pvu II; Cla I - Xba I en Xba I - Sac I insluit (Afdeling 4.4.1) en plasmied pHS-int-1 wat kollageenfragmente Sma I - Sma I; Sma I - Rsa I en Rsa I - Hind III insluit (Afdeling 4.3.1), is vir hierdie doeleindes geanaliseer.

Uit die elektronmikroskopiese analise van pHS-ex1 DNA met Sp1 is geen voorkeurspieke vir Sp1 waargeneem nie (data nie getoon nie). Uit die kontoerlengte van die DNA-molekules is die totale lengte van die DNA bepaal as 4100 bp $\pm$ 20 teenoor die werklike waarde van 4139 bp. Bepaling van die frekwensie van kompleksvorming het die volgende inligting weergegee: Uit die 1096 molekules wat geanaliseer is, het 96 molekules (8,7%) kompleksvorming ondergaan, terwyl twee molekules (0,2%) nie analiseerbaar was nie. By ongeveer 78 molekules (81,2%) is enkel komplekse gevorm en by 18 molekules (18,8%) is twee komplekse waargeneem of was by lusvorming betrokke. Komplekse wat waargeneem is, is op verskillende posisies op die DNA-molekules geleë en geen voorkeurbindingspunt kon bepaal word nie. Lusvorming wat tydens proteïen-proteïeninteraksies ontstaan het, is geleë in die pSP64/65-volgordes.

In die geval van binding van Sp1 aan die plasmied pHS-int-1 DNA, is twee voorkeurbindingspieke aangetoon. Die werklike waarde van hierdie plasmied is 4024 bp. Soos uit die histogram in Figuur 8.16 waargeneem kan word, is die totale lengte van die molekules uit die Gauss-kromme bepaal as 4020 bp $\pm$ 67, wat 'n goeie korrelasie tussen die werklike en gemete waarde toon.

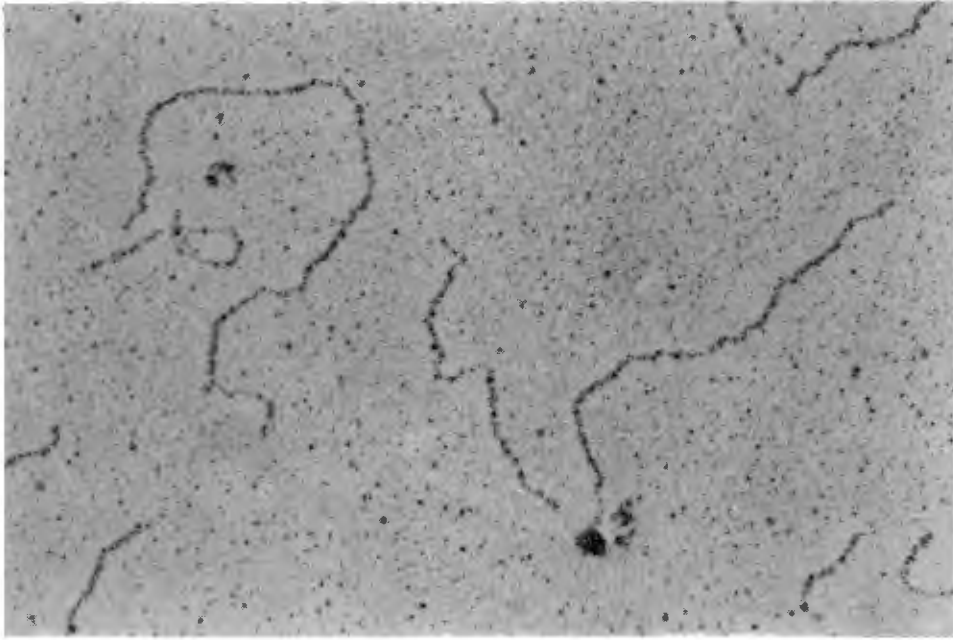
pSS + Sp1



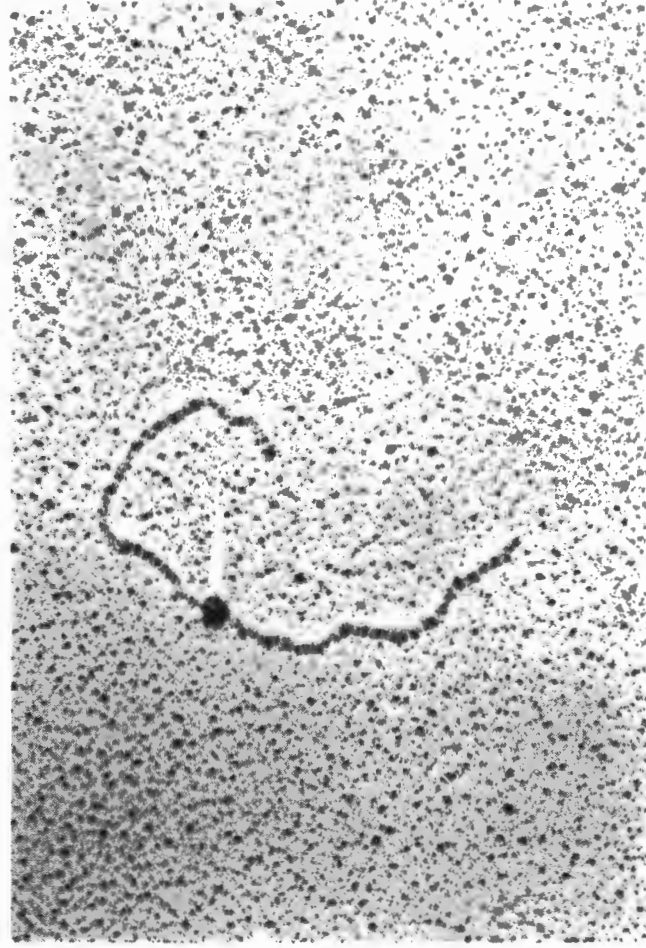
Figuur 8.11: Histogram van die metings van die pSS DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1.

Die linkerkant van die histogram toon metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Sp1-proteïene. Die regter piek toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. In die lyndiagram word die 404 bp Sma I-fragment met die Sp1-bindingspunte (↑) aangetoon soos verkry uit die DNase I-afskermingsanalise.

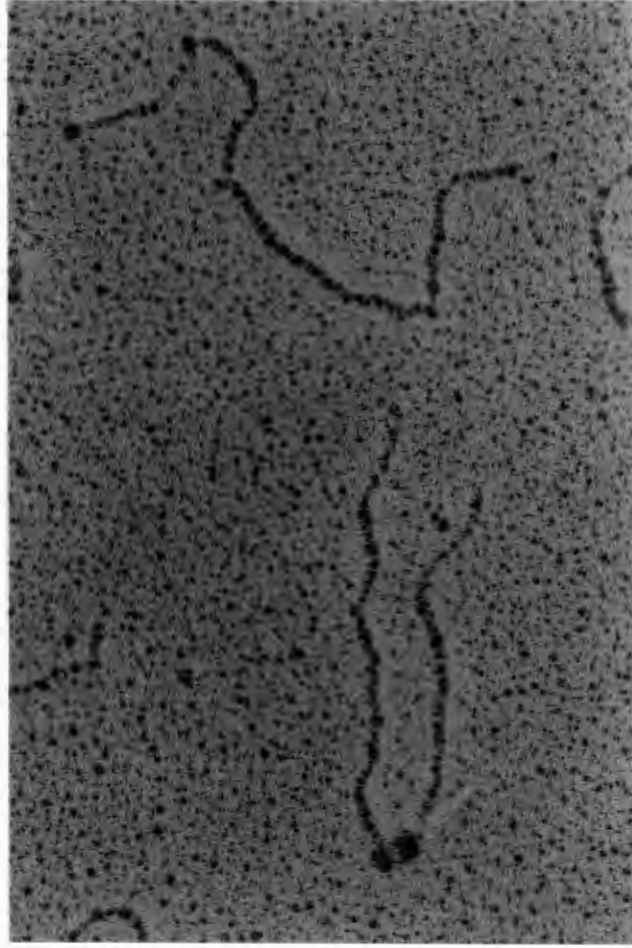
(Sm = Sma I)



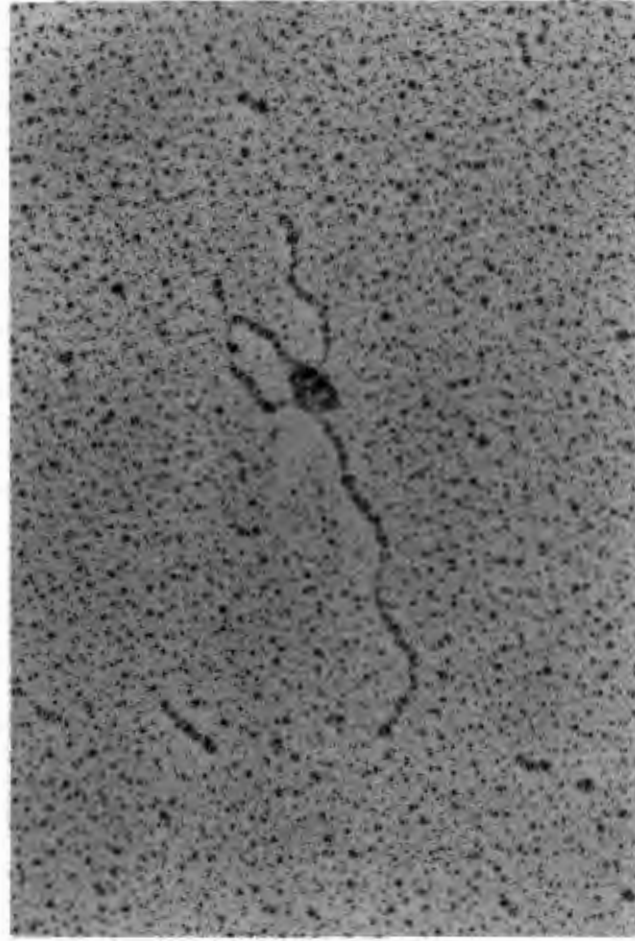
Figuur 8.12: Elektronmikroskopie van 'n enkel kompleks gevorm tussen Sp1-proteïene en 'n pSS DNA-molekule.



A



B

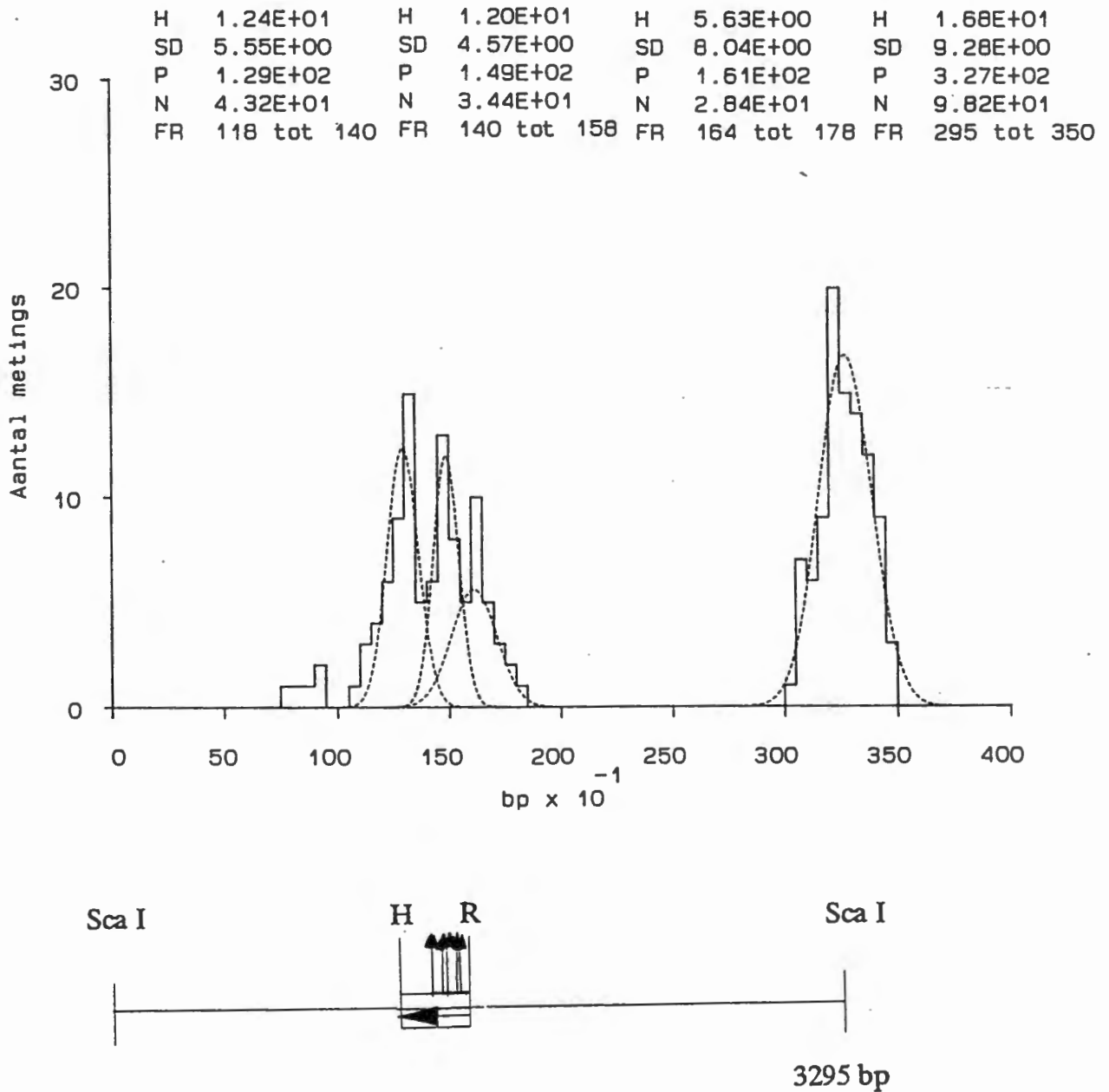


C

Figuur 8.13: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en pHR295 DNA-molekules.

- A: 'n Enkel proteïenkompleks gebonde aan die DNA-molekule.
- B: Twee naasliggende proteïenmolekules gebonde aan dieselfde DNA-molekule.
- C: Lusvorming as gevolg van proteïen-proteïeninteraksie.

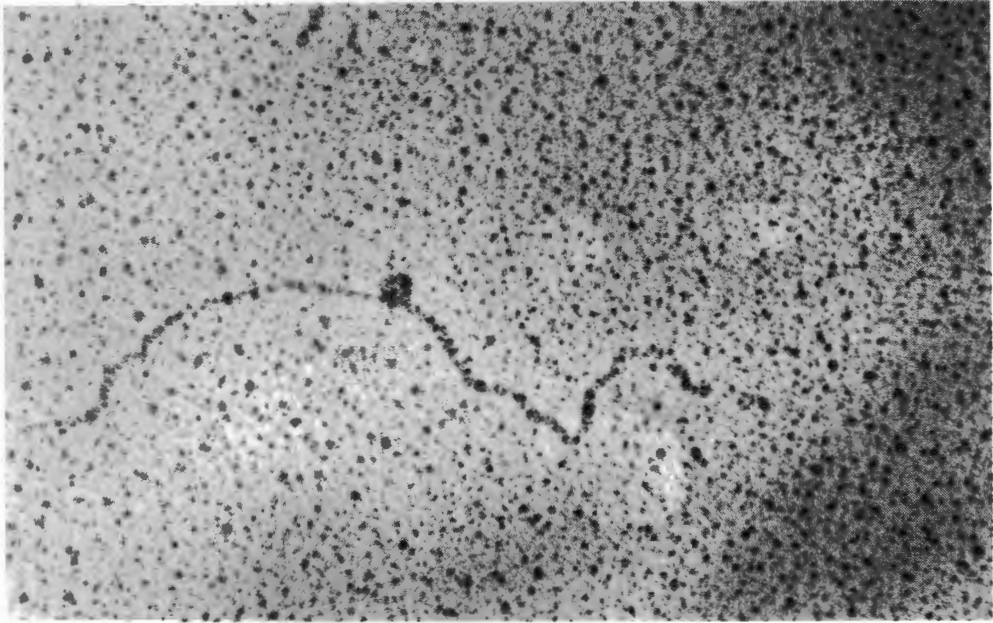
pHR295 + Sp1



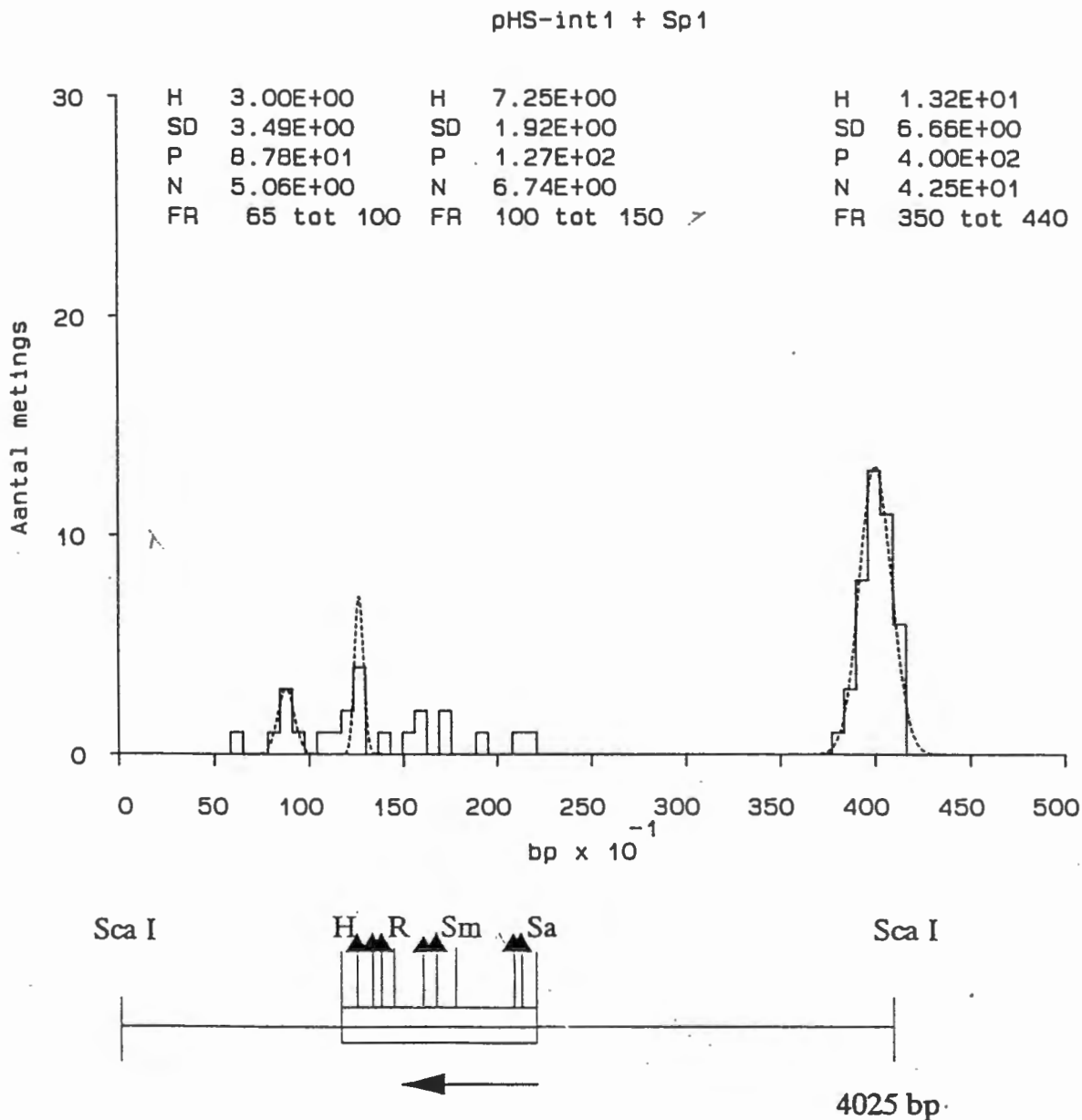
Figuur 8.14: Histogram van die metings van die pHR295 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1.

Die linkerkant van die histogram toon metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Sp1-proteïene. Die regter piek toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. Die lyndiagram toon die 296 bp Rsa I - Hind III-fragment met die Sp1-bindingspunte (↑) aan soos verkry uit die DNase I-afskermingsanalise.

(H - Hind III; R = Rsa I)



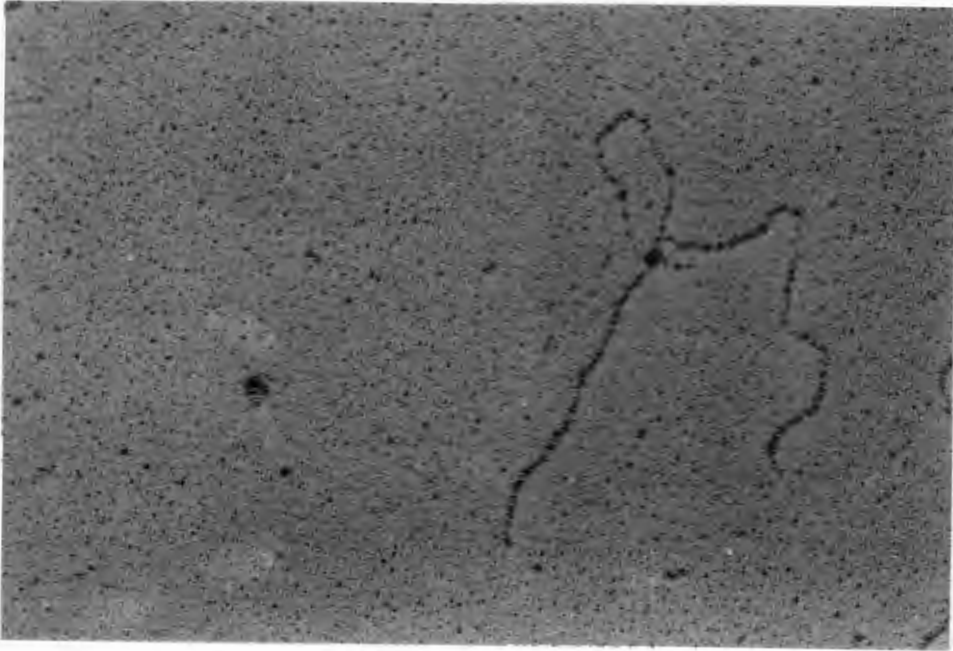
Figuur 8.15: Elektronmikroskopie van 'n enkel proteïenkompleks gevorm tussen Sp1-proteïene en 'n pHR3' DNA-molekule.



Figuur 8.16: Histogram van die metings van die pHA-Int1 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die geboonde Sp1-proteïene. Die regter piek toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. Die lyndiagram toon die 1026 bp Sac I - Hind III-fragment met die Sp1-bindingspunte (†) soos verkry uit DNase I-afskermingsanalises aan.

(H = Hind III; R = Rsa I; Sm = Sma I; Sa = Sac I)



Figuur 8.17: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en 'n pHS-int1 DNA.

Lusvorming van die DNA vind plaas deur proteïen-proteïeninteraksie.

Die twee voorkeurbindingspieke kan in die histogram waargeneem word. Die bindingspunte van hierdie voorkeurspieke op die DNA-molekule soos bepaal deur die Gaus-kromme, lê in die omgewing van onderskeidelik $878 \text{ bp} \pm 35$ en $1270 \text{ bp} \pm 19$. Bindingskompleks 1 kom ooreen met volgordes in die pSP64/65-plasmied. Gebied 2 kom egter ooreen met Sp1-bindingsgebiede in die HR295-kollageenfragment en die RS-kollageenfragment soos aangedui in die lyndiagram in Figuur 8.16. In Figuur 8.17 word 'n voorbeeld van lusvorming gegee. In hierdie figuur word proteïen-proteïeninteraksie waargeneem tussen Sp1 gebonde aan die pSP64-DNA-gebied en Sp1 gebonde aan die Sma I - Sma I-DNA-gebied. Ander proteïen-proteïeninteraksies is in hierdie DNA-molekules ook waargeneem tussen Sp1 gebonde aan die pSP64 DNA-gebied en Sp1 gebonde aan die Hind III - Rsa I-kollageengebied van die DNA. Geen interaksie tussen Sp1-proteïene gebonde in die drie kollageenfragmente wat langs mekaar in hierdie plasmied geleë is, kon egter waargeneem word nie. Bepaling van die frekwensie van kompleksvorming het getoon dat van die 1100 molekules wat geanaliseer is, 10% (110 molekules) by kompleksvorming betrokke is. Van die geanaliseerde molekules was 1,0% (11 molekules) nie analiseerbaar nie. Ongeveer 55 molekules (50%) is by twee komplekse of lusvorming betrokke en 55 molekules (50%) is by enkel kompleksvorming betrokke.

In 'n volgende eksperiment is die proteïen-proteïeninteraksie van Sp1 in die plasmied pGEM-BB5 (Figuur 4.11) ondersoek. Hierdie plasmied bevat die 5kb Bam HI - Bam HI-kollageenfragment, wat al die verskillende kollageenfragmente wat in hierdie ondersoek bestudeer is, insluit. As kontrole vir hierdie eksperiment is die plasmied pGEM11zf(+), sonder die Bam HI-fragment, gebruik. Eksperimente met pGEM11zf(+) en Sp1 en pGEM-BB5 + Sp1 is uitgevoer soos voorheen beskryf.

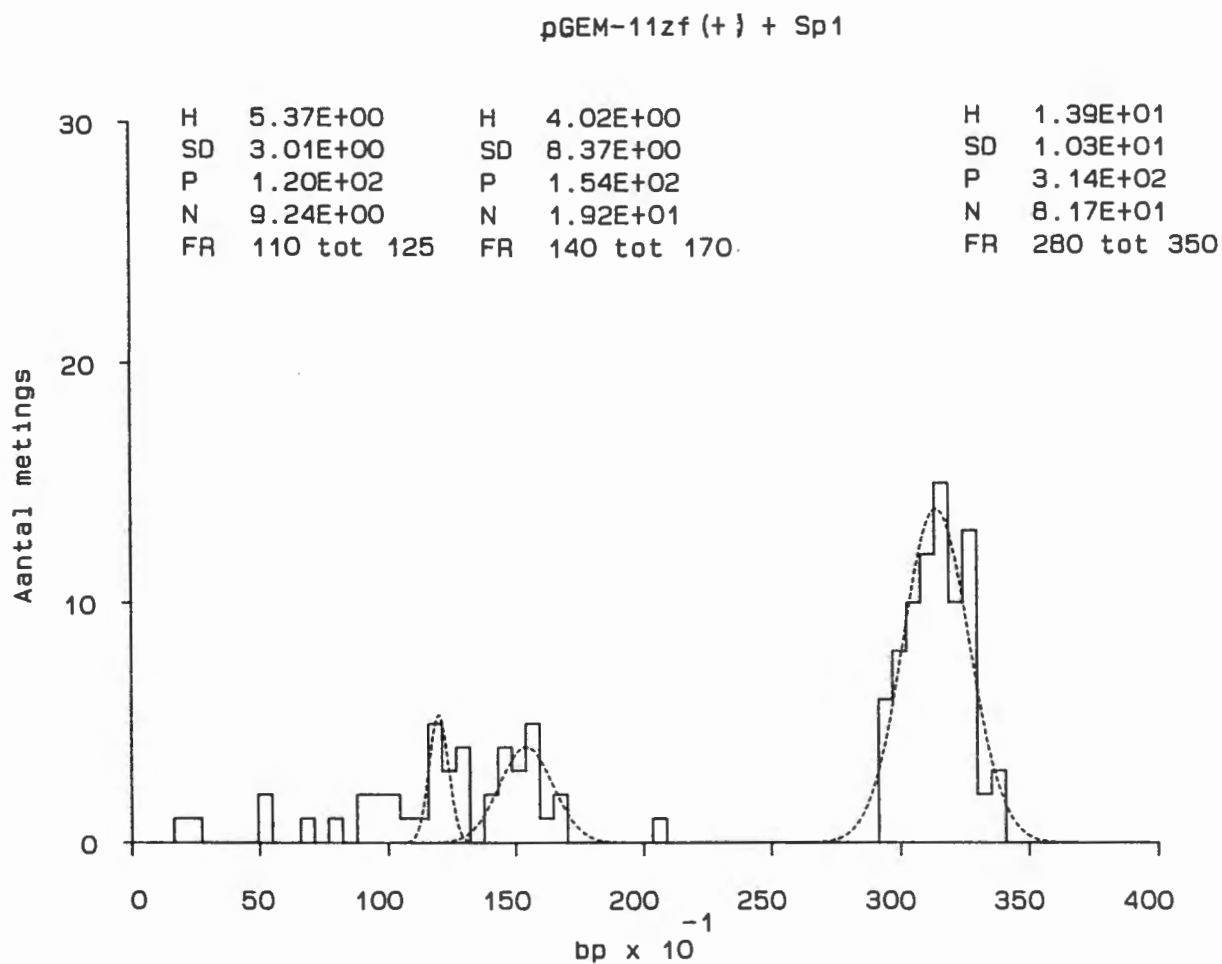
In Figuur 8.18 word die histogram van pGEM met Sp1 gegee na 123 kontoerlengtemetings van die totale molekule en die lengte vanaf die naaste eindpunt tot die middel van die proteïenkompleks. Hierdie plasmied-DNA het 'n redelike groot affiniteit vir Sp1 soos in die histogram waargeneem kan word. Twee voorkeurbindingspieke vir Sp1 aan die DNA is met behulp van die Gaus-kromme op die histogram bepaal.

Die een voorkeurbindingspiek is geleë rondom $1200 \text{ bp} \pm 30$ en die tweede voorkeurbindingspiek by $1540 \text{ bp} \pm 84$. Die totale lengte van die molekule soos bereken uit die histogram, is $3140 \text{ bp} \pm 103$ teenoor die werklike waarde van 3223 bp .

Bepaling van die frekwensie van kompleksvorming is voorts uitgevoer deur 'n statistiese analise van 1040 nie-geselekteerde DNA-molekules direk onder die elektronmikroskoop te doen. Uit die 1040 molekules wat ondersoek is, het slegs 40 molekules (3,8%) aan kompleksvorming deelgeneem. Van hierdie 40 molekules het 26 (65%) slegs een proteïenkompleks gevorm en 14 (35%) twee komplekse of het deelgeneem aan lusvorming.

Na die agtergrondbepaling van die frekwensie van Sp1-kompleksvorming aan die DNA van plasmied pGEM-11zf(+), is plasmied pGEM-BB5(A) waarin die 5 kb Bam HI-kollageenfragment voorkom, elektronmikroskopies geanaliseer. Soos in die geval van al die vorige plasmiede, is pGEM-BB5(A) met behulp van die restriksie-ensiem Sca I lineêr gemaak.

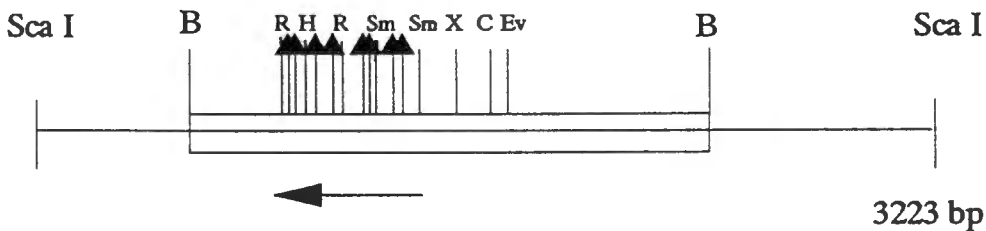
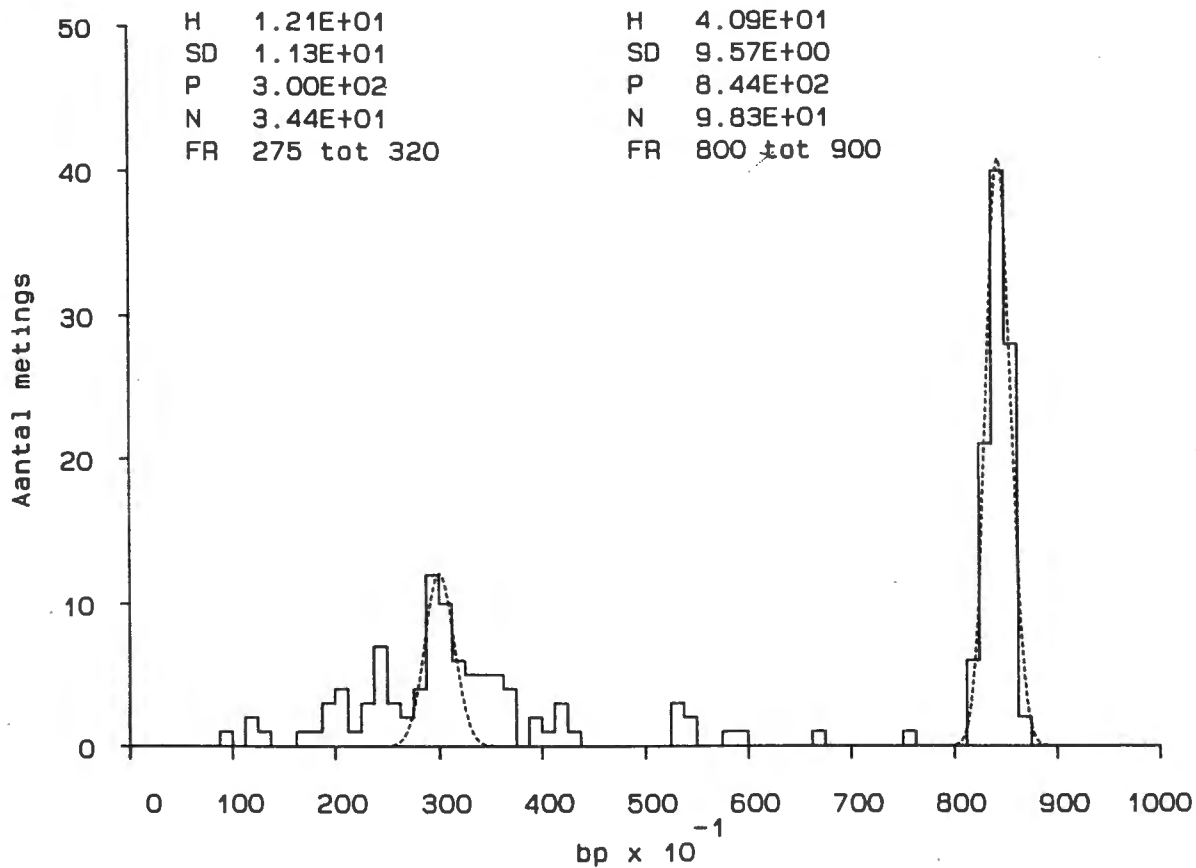
Elektronmikroskopiese analise is op die molekules uitgevoer en uit die kontoerlengtebepalings van hierdie analises is die histogram in Figuur 8.19 saamgestel. Die totale lengte van die molekules wat met behulp van die Gaus-kromme uit die histogram verkry is, is $8440 \text{ bp} \pm 96$, wat in 'n redelike mate ooreenstem met die werklike waarde van 8223 bp as die lengte van die molekule in ag geneem. Om te help met oriëntering van die molekules, is die ori gebruik om die molekules te oriënteer. 'n Voorbeeld van so 'n ori word in Figuur 8.20 gegee. Drie voorkeurbindingsgebiede van Sp1 vir die DNA is geïdentifiseer, waarvan die piekhoogte deur middel van die Gaus-kromme bepaal is. Binding van hierdie voorkeurpiek 1 kom voor rondom die $3000 \text{ bp} \pm 113$ gebied, terwyl die van die ander voorkeurgebiede geleë is rondom 2500 bp en rondom 3300 bp onderskeidelik. Al drie hierdie gebiede is geleë in die gebied tussen die eerste Sma I en die laaste Rsa I soos aangedui word deur die lyndiagram in Figuur 8.19.



Figuur 8.18: Histogram van de metings van die pGEM-11zf(+) DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene,

Die linkerkant van die histogram toon metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Sp1-proteïene. Die regter piek toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules.

pGEM-BB5 (A) + Sp1



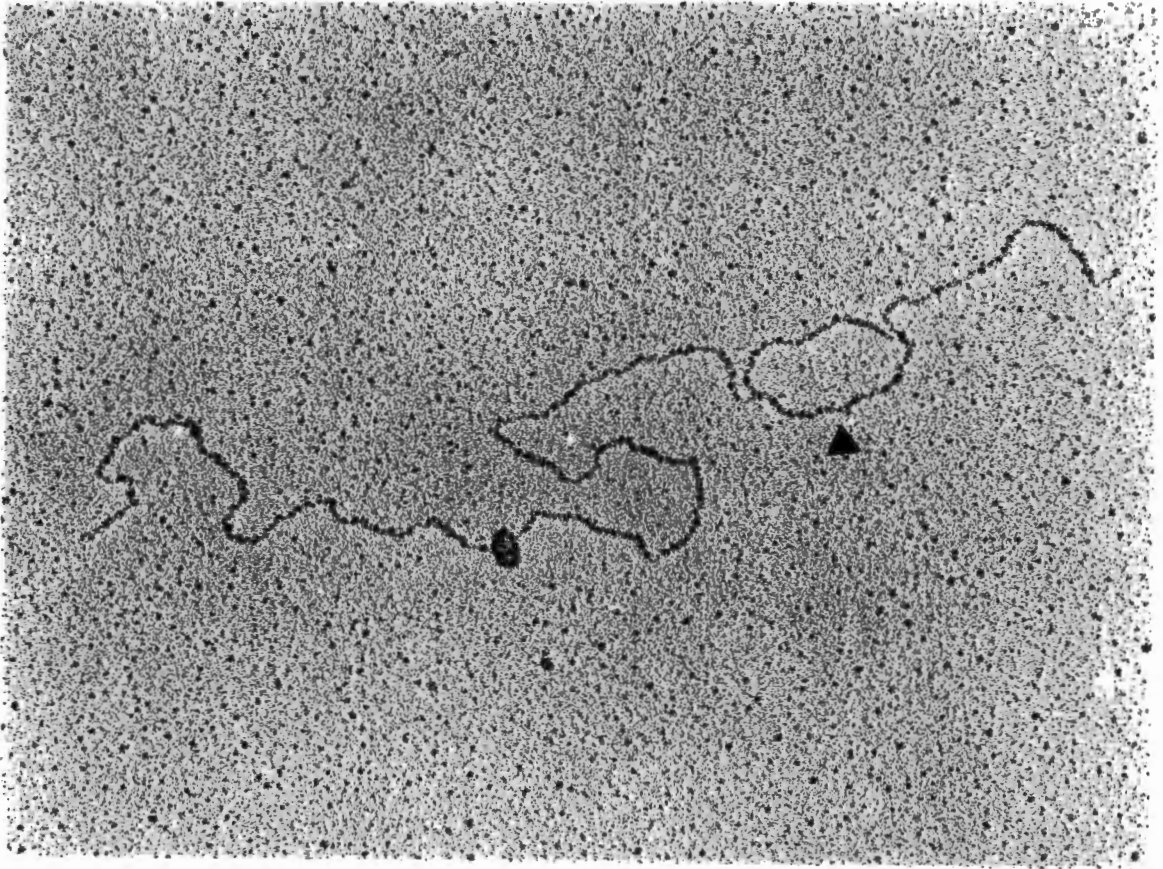
Figuur 8.19: Histogram van die metings van die pGEM-BB5' DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Sp1-proteïene. Die regter piek toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. Die lyndiagram toon die 5 kb Bam HI-fragment met die onderskeie Sp1-bindingspunte (↑) soos verkry uit DNase I-afskermingsanalises aan.

(B = Bam HI; R = Rsa I; H = Hind III, Sm = Sma I; X = Xba I; C = Cla I; Ev = Eco RV)

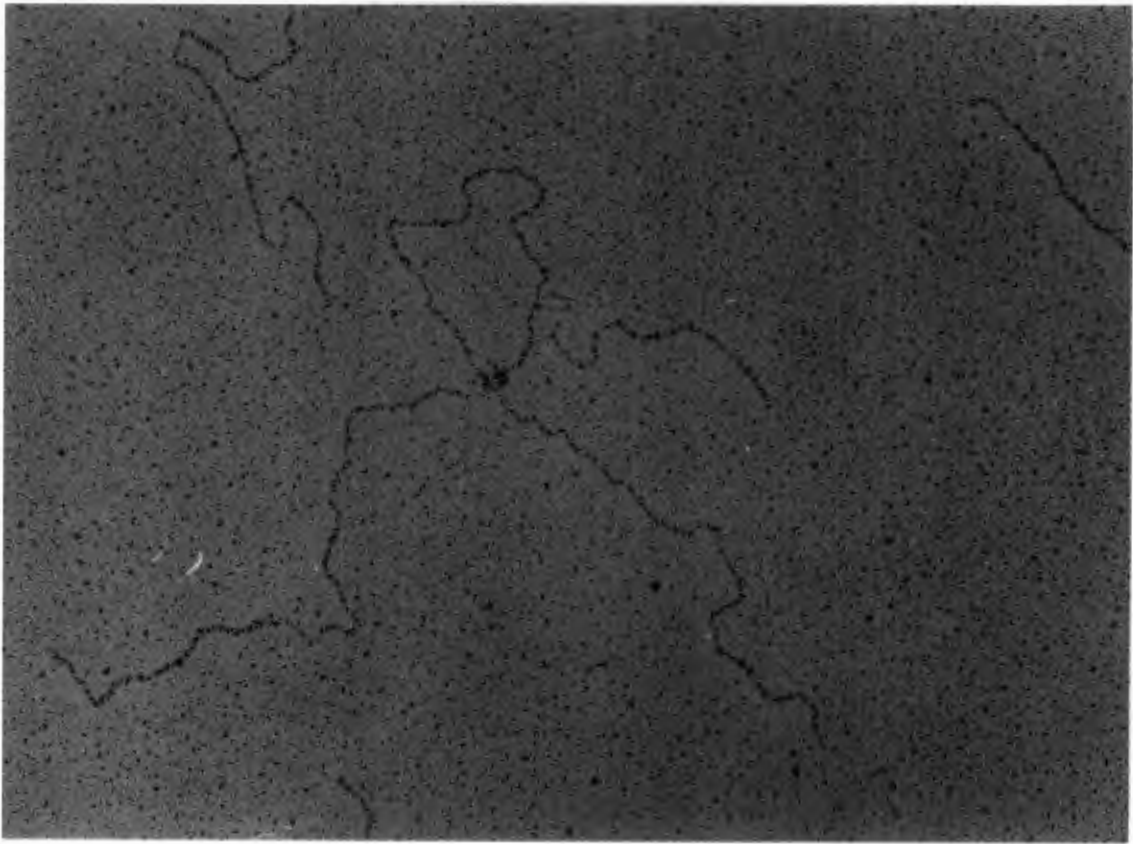
Hierdie gebied waar kompleksvorming plaasvind, bevat die eerste introngedeelte van die kollageengeen en het verskeie Sp1-bindingsgebiede (vergelyk Figuur 7.52). Proteïen-proteïeninteraksies is waargeneem tussen hierdie verskillende gebiede in die DNA-molekule, terwyl proteïen-proteïeninteraksies ook meermale waargeneem is tussen die introngebied en die promotorgebied. 'n Voorbeeld van so 'n lusvorming word in Figuur 8.21 gegee.

Verdere statistiese analyses is op 1074 molekules uitgevoer om die frekwensie van kompleksvorming te bepaal. Van die geanaliseerde DNA-molekules het 139 molekules (12,9%) aan kompleksvorming deelgeneem terwyl, 14 molekules (1,3%) nie analiseerbaar was nie. Van die 139 molekules vorm 73 (52,5%) slegs een proteïen kompleks en 66 (47,5%) twee proteïenkomplekse of is in lusvorming betrokke.



Figuur 8.20: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en 'n pGEM-BB5(A) DNA-molekule.

'n Enkel proteïenkompleks gebonde aan die DNA word waargeneem. Die ori (▲) van die repliserende molekule word gebruik om die DNA-molekule te oriënteer.



Figuur 8.21: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en 'n pGEM-BB5(A) DNA-molekule.

Lusvorming deur die DNA-molekule geskied as gevolg van proteïen-proteïeninteraksie.

Tabel 8.1 DNA-proteienkompleksvorming met Sp1 en die kollageenfragmente

FRAGMENT	GETAL (EN PERSENTASIE) MOLEKULES WAARGENEEM					
	DNA-MOLEKULES SONDER KOMPLEKSE	DNA-MOLEKULES NIE ANALISEERBAAR	DNA-MOLEKULES MET KOMPLEKSE			
				EEN PROTEÏEN- KOMPLEKS	TWEE PROTEÏEN- KOMPLEKSE OF LUSVORMING	MEER AS TWEE PRO- TEÏENKOMPLEKSE OF LUSVORMING
pSP72	1000 (96,7%)	0 (0%)	35 (3,3%)	33 (94,3%)	2 (5,7%)	-
pSV40	850 (83,2%)	8 (0,8%)	163 (16%)	151 (92,6%)	12 (7,4%)	-
pSP65	1000 (96,2%)	1 (0,09%)	38 (3,7%)	34 (89,5%)	4 (10,5%)	-
pEP	1000 (95,8%)	9 (0,8%)	35 (3,4%)	27 (77,1%)	8 (22,9%)	-
pCX	957 (95,4%)	1 (0,09%)	45 (4,5%)	39 (86,7%)	6 (13,3%)	-
pXS	1000 (97,1%)	4 (0,4%)	26 (2,5%)	22 (84,6%)	4 (15,4%)	-
pSS	950 (93,6%)	0 (0%)	65 (6,4%)	40 (61,5%)	14 (21,5%)	11 (17%)
pRS	850 (82,8%)	0 (0%)	177 (17,2%)	146 (82,5%)	22 (12,4%)	9 (5,1%)
pHR295	849 (82,8%)	0 (0%)	175 (17,2)	147 (84%)	15 (8,6%)	13 (7,4%)
pHR3'	950 (90,2%)	0 (0%)	104 (9,8%)	82 (78,8%)	15 (14,4%)	7 (6,7%)
pHS-ex1	998 (91,1%)	2 (0,2%)	96 (8,7%)	78 (81,2%)	18 (18,8%)	-
pHS-int-1	979 (89%)	11 (1%)	110 (10%)	55 (50%)	55 (50%)	-
pGEM-11zf(+)	1000 (96,2%)	0 (0%)	40 (3,8%)	26 (65%)	14 (35%)	-
pGEM-BB5(A)	921 (85,8%)	14 (1,3%)	139 (12,9%)	73 (52,5%)	66 (47,5%)	-

Uit die eksperimentele gegewens wat deur die elektronmikroskopiese analise van die verskillende kollageenfragmente met Sp1 verkry is, is waargeneem dat bindingspunte vir Sp1 met een uitsondering, ooreenkom met die resultate verkry uit die DNase I-afskermingsanalises in Hoofstuk 7. Die enigste uitsondering is die pCX-fragment. Hierdie fragment toon geen Sp1 afskerming op die DNA tydens DNase I-afskermingsanalise nie, maar vertoon volgens die histogram, wel 'n voorkeur bindingspiek vir Sp1 in 'n gebied waar volgens rekenaaranalise 'n potensiële bindingsgebied vir Sp1 op die DNA-volgorde voorkom. Hoewel hierdie piek ten opsigte van die hoeveelheid molekules wat gemeet is nie baie hoog is nie, staan dit tog uit bo die frekwensie van agtergrondbindingsgebiede en kan dit as 'n spesifieke bindingspunt beskou word. Hierdie spesifieke Sp1-bindingsgebied geleë langs die proksimale CCAAT-motief is in die literatuur reeds as kontroversieel bewys omdat heelwat navorsingsgroepe geen Sp1-binding waargeneem het nie, terwyl die groep van Nehls *et al.* (1991) wel Sp1-binding waargeneem het onder ander eksperimentele kondisies. Die frekwensie van kompleksvorming is egter in hierdie ondersoek baie laag en in die omgewing van die frekwensie van kompleksvorming by kontrole-DNA. Hierdie lae frekwensie toon dat indien Sp1 wel bind, dit met 'n baie lae affiniteit vir die spesifieke punt geskied.

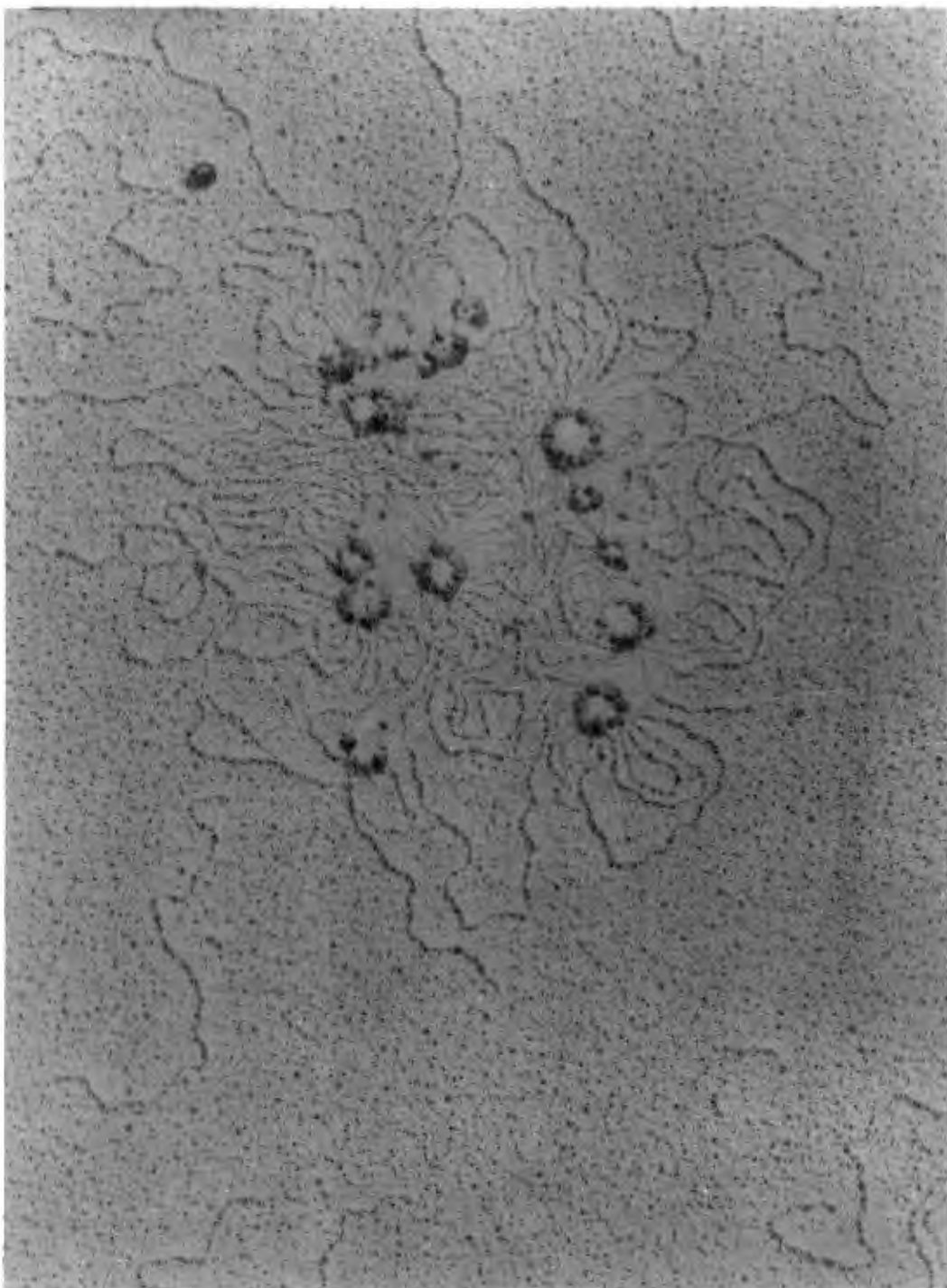
'n Opsomming van die verskillende frekwensies van kompleksvorming in die verskillende kollageenfragmente word in Tabel 8.1 gegee. Uit hierdie tabel is dit duidelik dat die kontrole fragmente 'n frekwensie van Sp1 kompleksvorming van <4% het. Die fragmente waar geen Sp1-binding waargeneem is nie, naamlik pEP en pXS sowel as die pCX-fragment, het frekwensies van Sp1-kompleksvorming in basies dieselfde ordegrootte as dié van die kontroles. 'n Toename in die frekwensie word waargeneem namate die fragmente oor meer aktiveringsvolgorde van die eerste intron van die pro- $\alpha 1$ (I)-geen beskik. Hierdie frekwensiewaardes kom dan weer in die ordegrootte van dié van die

SV40-fragment voor. Hoewel nie-analiseerbare molekules, dit wil sê molekules wat sodanig in 'n veld van ondersoek geleë is dat dit nie as 'n totale molekule waargeneem kan word nie of nie as een of meer molekules onderskei kan word nie, in 'n toenemende mate voorkom by die langer fragmente en die frekwensiewaarde beïnvloed, gee die statistiese analisemethode tog 'n aanduiding van die tendens van Sp1-binding en bindingsaffiniteit wat by die verskillende kollageenfragmente voorkom.

8.3.2 ELEKTRONMIKROSKOPIESE ANALISE VAN KOLLAGEENFRAGMENTE MET AP2-PROTEÏENE

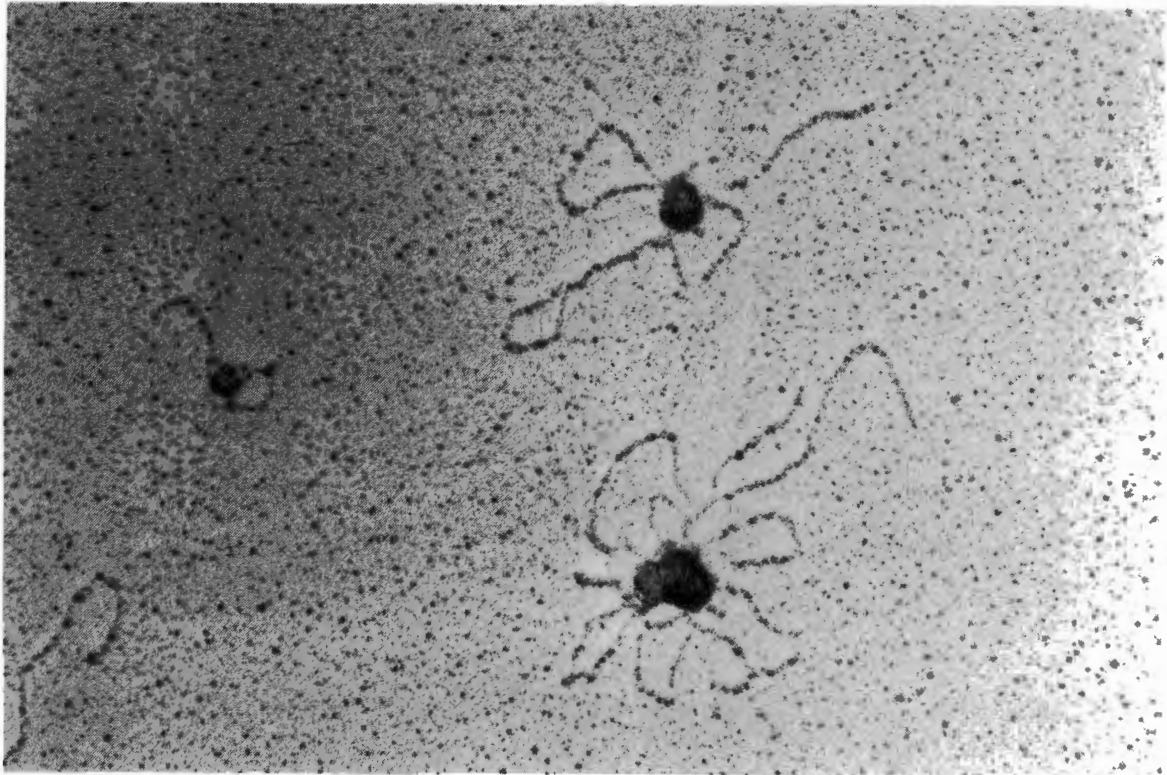
Die voorbereiding van die reaksiemengsels vir elektronmikroskopiese ondersoeke is op 'n soortgelyke wyse as vir Sp1 uitgevoer, behalwe dat 1 μ l Ap2 (10-25 ng/ μ l) in plaas van 1 μ l Sp1 (30 ng/ μ l) by die 10 μ l reaksiemengsel gevoeg is. Uit die eksperimente met SV40-DNA en Ap2 is egter waargeneem dat hierdie Ap2-konsentrasie te hoog is en aanleiding gee tot die vorming van groot DNA-proteïen-aggregate. 'n Voorbeeld van so 'n aggregaat word in Figuur 8.22 gegee. 'n Verdere nadeel van hierdie aggregaatvorming is dat die meeste proteïene daarby betrokke is, sodat heelwat DNA-molekules sonder proteïene verkry word. In 'n volgende eksperiment is die Ap2-proteïenkonsentrasie gehalveer sodat slegs 0,5 μ l Ap2 by die SV40-DNA gevoeg is. Uit die resultate van hierdie eksperimente wat verkry is, het aggregaatvorming in 'n mindere mate voorgekom, en indien wel, op 'n baie kleiner skaal soos aangetoon in Figuur 8.23. Vorming van enkel proteïenkomplekse en ook lusvorming tussen twee komplekse het in hierdie eksperimente algemeen voorgekom, soos ook in die statistiese analise weerspieël word.

Van die 1031 molekules wat ondersoek is, was 50 (4,9%) as gevolg van aggregaatvorming nie analyseerbaar nie. By 431 (41,8%) van die orige 981 molekules het kompleksvorming voorgekom. Hiervan het bykans die helfte, naamlik 224 molekules (52%), enkel proteïenkomplekse gevorm, terwyl 207 molekules (48%) betrokke was by lusvorming tussen twee proteïenkomplekse.



Figuur 8.22: Elektronmikroskopie van Ap2-SV40 DNA-kompleksvorming.

Aggregaatvorming tussen verskeie proteïene en DNA-molekules vind plaas as gevolg van die hoë affiniteit van die proteïene vir die DNA.



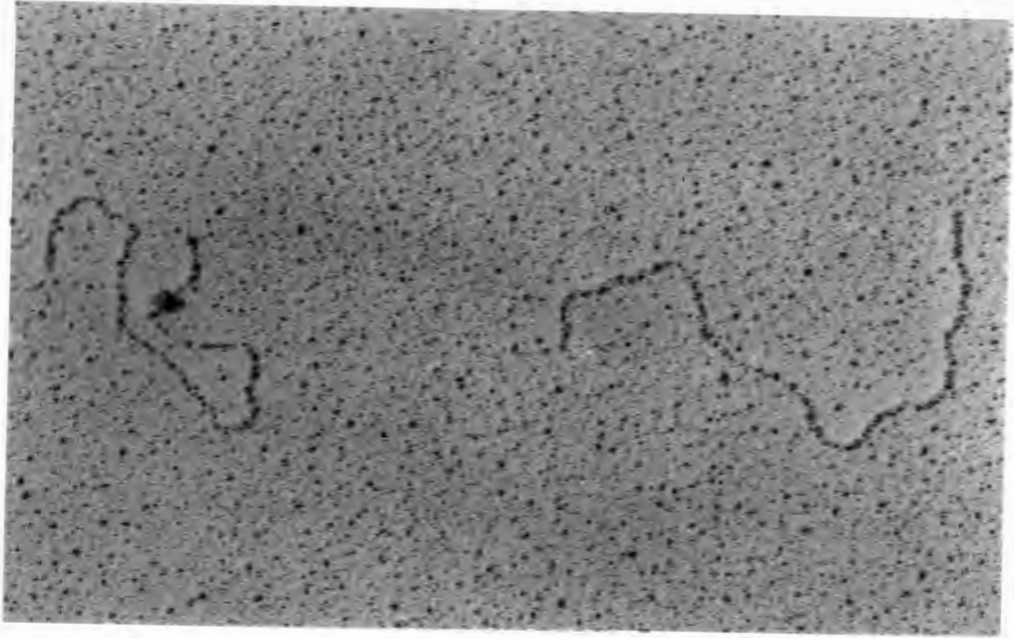
Figuur 8.23: Kleiner vorme van aggregaatvorming tussen Ap2-proteïene en SV40 DNA-molekules na verlaging van proteïenkonsentrasie.

Analise van pSP72, die kontroleplasmied vir SV40 met Ap2, toon 'n frekwensie van 15,4% vir Ap2-kompleksvorming. Uit 1064 nie-geselekteerde molekules was 164 molekules betrokke by kompleksvorming, waarvan 121 (73,8%) enkel proteïenkomplekse gevorm het en 43 (26,2%) twee komplekse of betrokke is by lusvorming. Affiniteit van die kontrole-DNA vir Ap2 is dus ook betreklik hoog. 'n Voorbeeld van 'n enkel proteïenkompleks op die pSP72-fragment word in Figuur 8.24 gegee.

Die histogram in Figuur 8.25 toon die voorkeurbindingsgebiede vir Ap2 op die totale SV40-DNA-molekule by lae resolusie. Dit is gebaseer op die analise van die binding van 142 Ap2-proteïenkomplekse gebonde aan 101 geselekteerde SV40-DNA-molekules. Twee voorkeurbindingsgebiede uit die histogram is met behulp van 'n Gaus-kromme oor die voorkeurbindingspieke bepaal. Die een voorkeur bindingsgebied is geleë rondom 775 bp ± 61 en die tweede gebied rondom 1050 bp ± 91 . Die totale lengte van die molekules is bereken as 2760 ± 70 bp, wat goed vergelyk met die werklike waarde van die DNA-molekule van 2719 bp. Uit die lyndiagram onder die histogram in Figuur 8.25 kan gesien word dat die tweede voorkeurbindingsgebied ooreenstem met die bindingsgebied vir Ap2 in die SV40-DNA, soos uit die literatuur verkry (Mitchell *et al.*, 1987) asook in DNase I-afskermingsanalises (Figuur 7.3), waar bevind is dat Ap2 in die gebied 852 - 1023 bp bind. Die eerste voorkeurpiek stem ooreen met dieselfde gebied waar Ap2-kompleksvorming op pSP72 DNA waargeneem is en kan as agtergrondbinding van Ap2 aan die pSP72-volgordes beskou word.

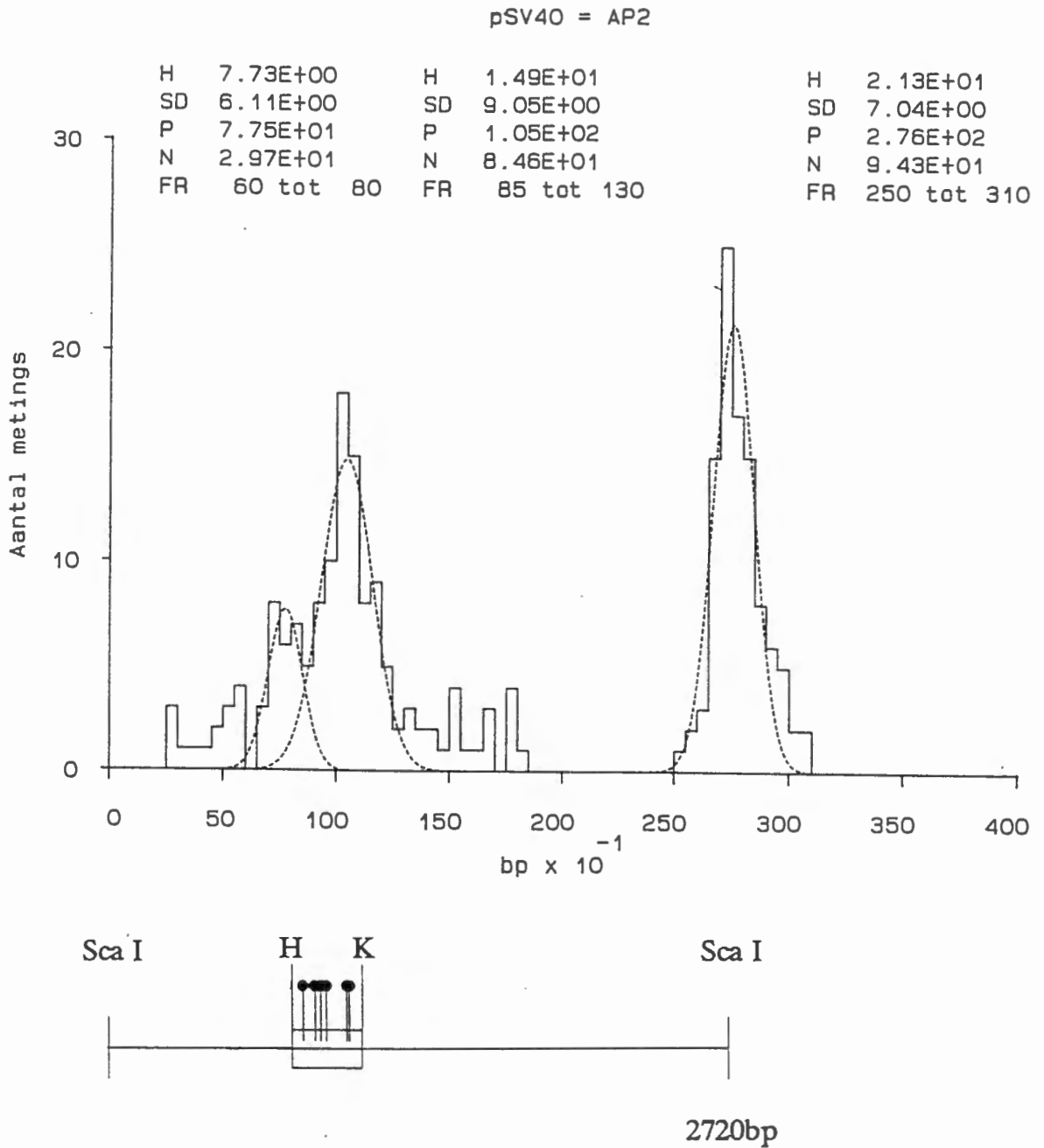
Uit die SV40-eksperimente blyk dit dat 0,5 μ g Ap2 'n werkbare proteïenkonsentrasie is en nie tot te veel aggreëatvorming aanleiding gee nie. Plasmiede waarin die kollageenfragmente voorkom, is voorts onder dieselfde eksperimentele toestande vir Ap2-binding geanaliseer.

Alvorens enige elektronmikroskopiese analise op die kollageenplasmied-DNA uitgevoer is, is die kontrole-DNA, pSP65, eers geanaliseer. Uit 1100 nie-geselekteerde molekules was 6 molekules (0,5%) as gevolg van aggreëatvorming nie analiseerbaar nie.



Figuur 8.24: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en pSP72 DNA-molekule.

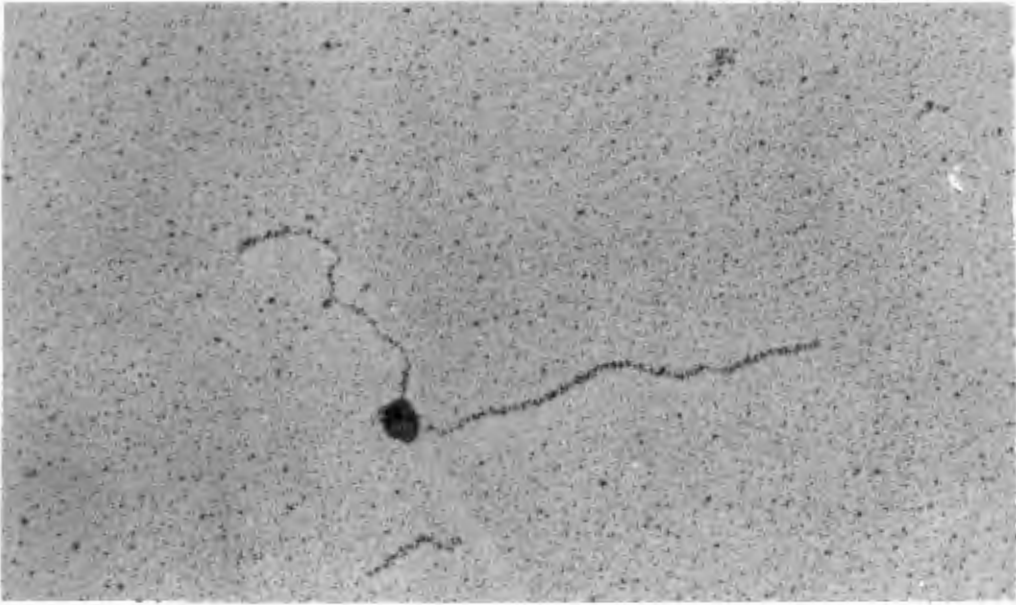
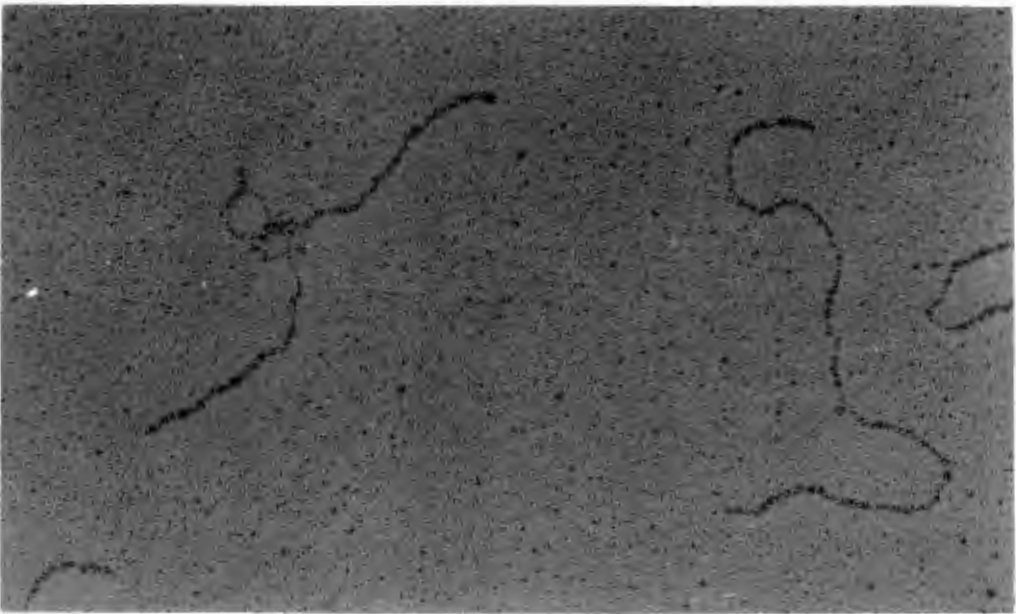
'n Enkel proteïen kompleks gebonde aan die DNA-molekule en so 'n DNA-molekule sonder gebonde proteïene as interne standaard word waargeneem.



Figuur 8.25: Histogram van die metings van die SV40 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene.

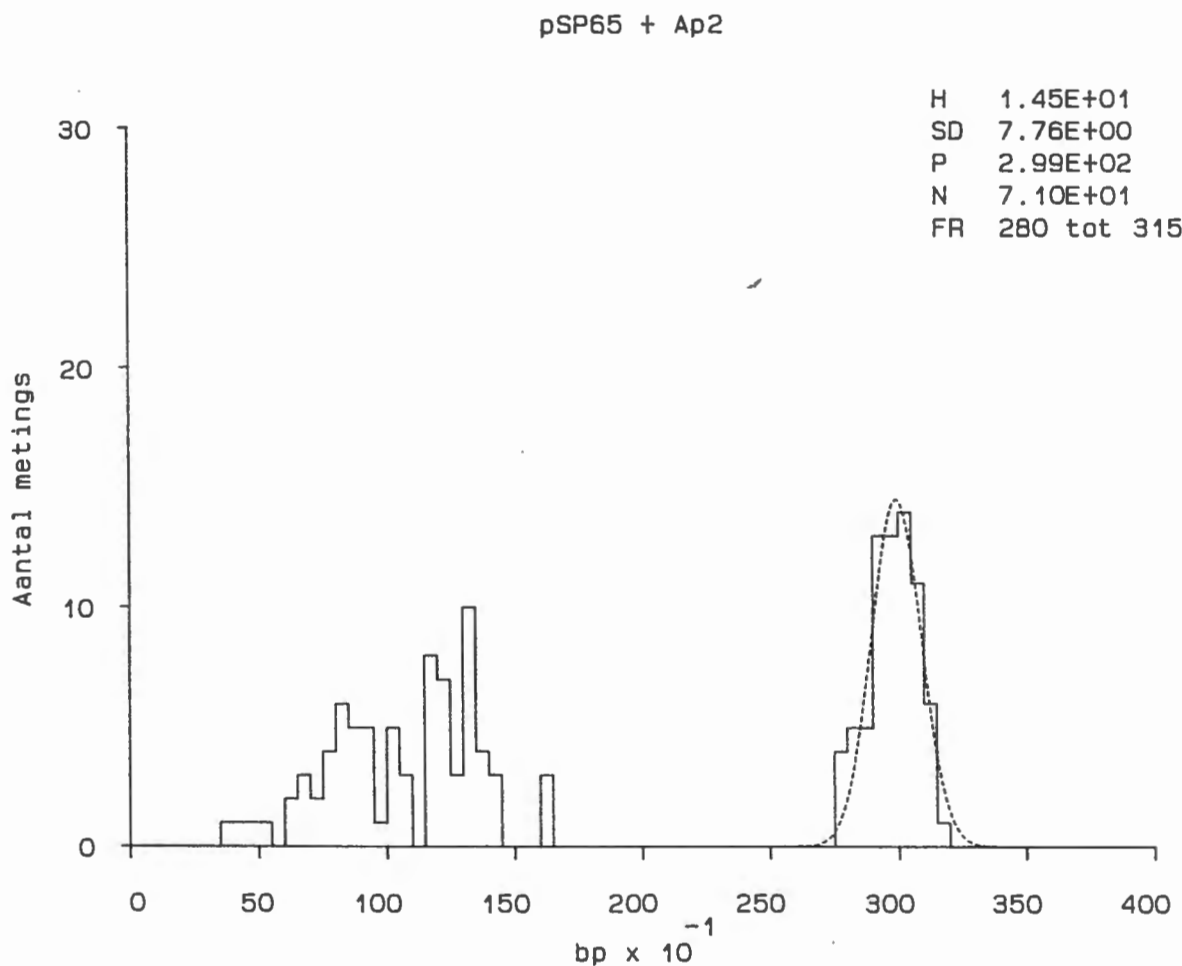
Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. In die lyndiagram word die 300 bp Hind III - Kpn I-fragment met Ap2-bindingspunte (†) soos verkry uit DNase I-afskermingsanalises, aangetoon.

(H = Hind III; K = Kpn I)

A**B**

Figuur 8.26: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en pSP65 DNA-molekules.

- A: 'n Enkel proteïenkompleks gebonde aan die DNA-molekule.
B: Lusvorming deur die DNA-molekule as gevolg van proteïen-proteïen-interaksie.



Figuur 8.27: Histogram van die metings van die pSP65 DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene.

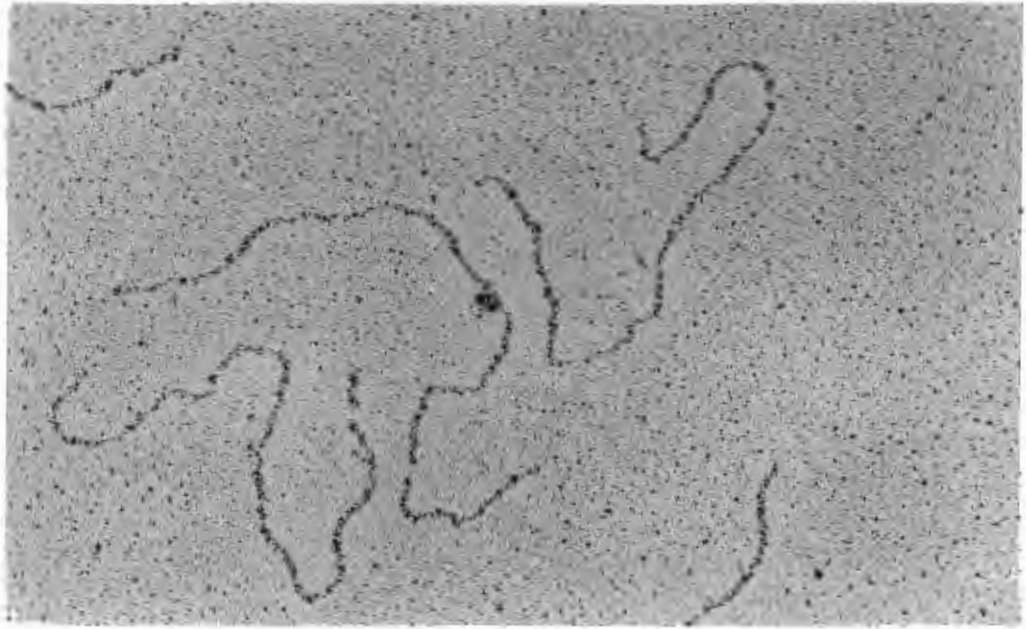
Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules.

Van die orige 1094 molekules was 94 (8,5%) betrokke by kompleksvorming. Hiervan het 72 molekules (76,6%) een proteïenkompleks gevorm en 22 molekules (23,4%) twee komplekse of lusvorming vertoon. Voorbeelde van 'n enkel proteïenkompleks en lusvorming word in Figuur 8.26 paneel A en B onderskeidelik gegee.

'n Histogram van die voorkeurbindingsgebiede van Ap2 vir pSP65-DNA word in Figuur 8.27 gegee. Vir die samestelling van die histogram is 129 datapunte van vooraf geselekteerde molekules gebruik. Die totale lengte van die molekules is uit die histogram as $2990 \text{ bp} \pm 78$, bepaal wat goed met die werklike waarde van 3005 bp vergelyk. 'n Redelike bindingsaffiniteit vir Ap2 kom veral in die gebied rondom 1150 en 1450 bp voor.

Elektronmikroskopiese analise van plasmied pEP -DNA met Ap2 toon 'n totale lengte van die molekule van $3170 \text{ bp} \pm 45$ aan teenoor die werklike waarde van 3187 bp. Voorkeurbindingsgebiede (data nie getoon nie) kom voor in dieselfde gebiede waar Ap2-binding in DNase I-afskermingsanalise (Figuur 7.4) waargeneem word. 'n Voorbeeld van so 'n binding is in Figuur 8.28 gegee. Binding van Ap2 aan pEP-DNA vertoon egter nie 'n hoë affiniteit nie. Die gebruik van 'n hoër Ap2-konsentrasie tydens kompleksvorming is egter nie moontlik nie, aangesien die probleem van aggreëatvorming dan weer na vore kom en geen metings gedoen kan word nie.

Statistiese analise van 1081 nie-geselekteerde molekules toon 'n frekwensie van kompleksvorming van 12,1%. Ongeveer 10 (0,9%) van die 1081 molekules was nie analiseerbaar nie as gevolg van te veel kompleksvorming. Van die orige 1071 molekules het 99 (75,6%) enkelkompleksvorming getoon en 32 (24,4%) twee komplekse met gepaardgaande lusvorming. Die lusvorming het voorgekom as gevolg van die selfassosiasie van die Ap2-proteïene wat aan die pSP64/65 DNA-volgordes gebonde is. Geen Ap2-selfassosiasie het tussen gebonde Ap2 in die kollageengebied voorgekom nie.

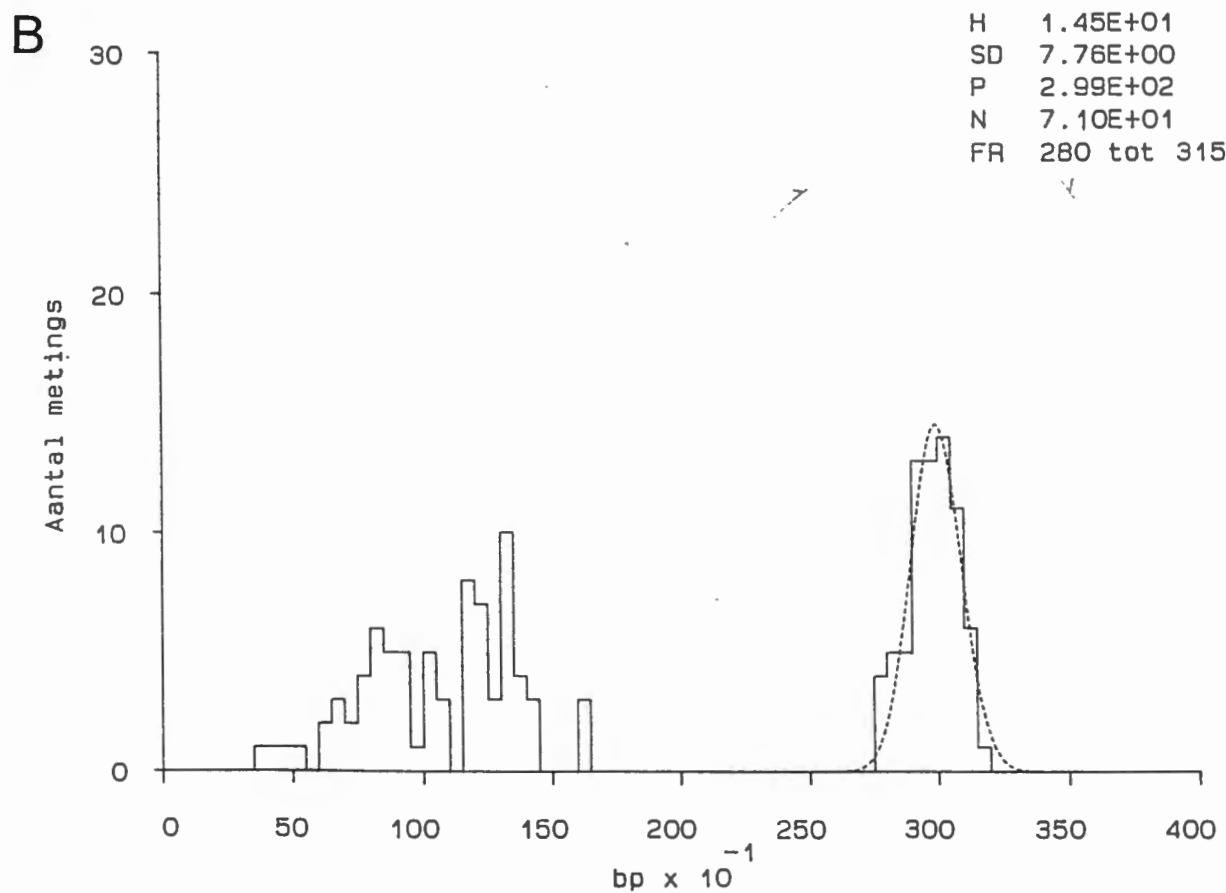
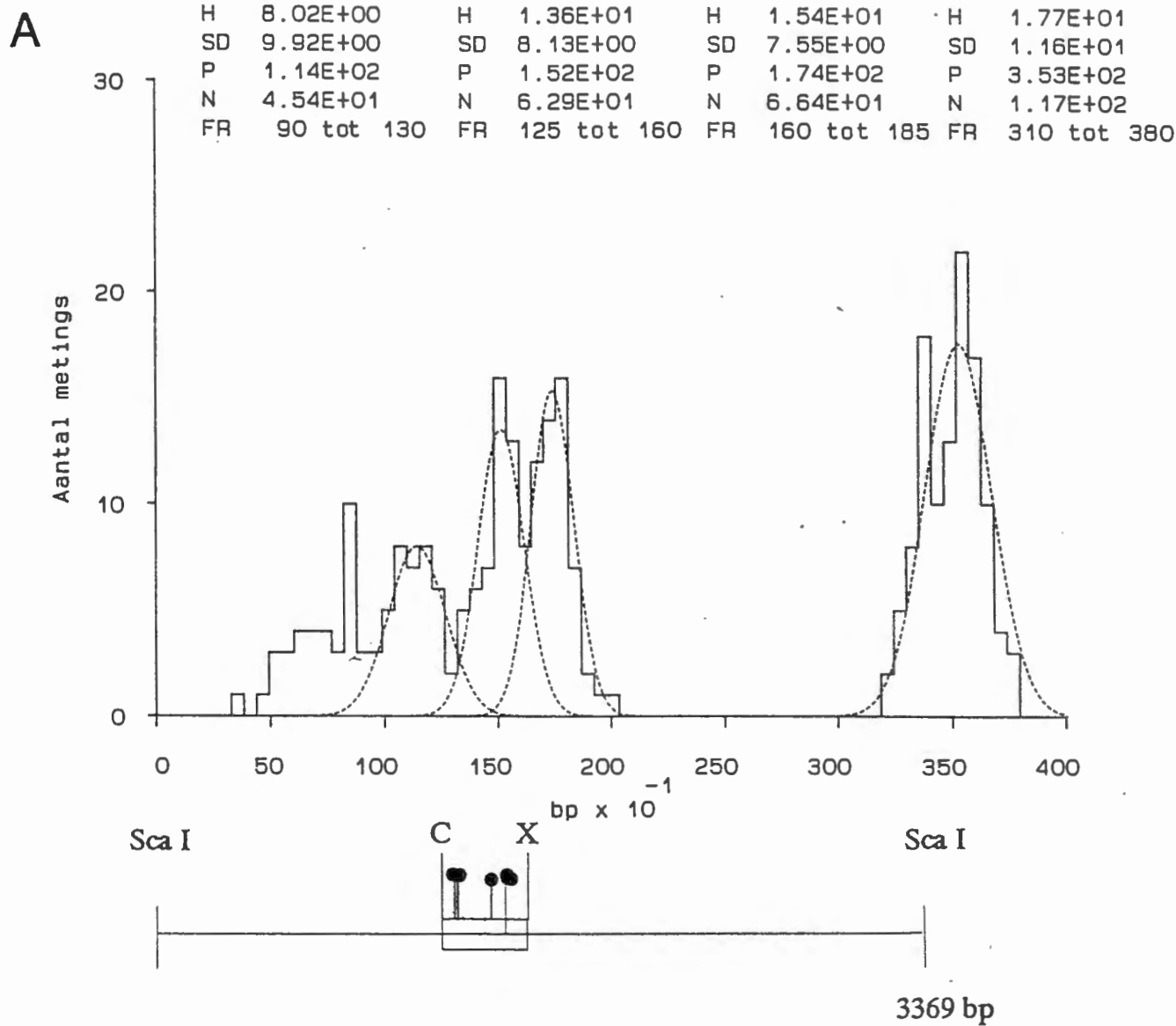


Figuur 8.28: Elektronmikroskopie van 'n enkel kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en 'n pEP DNA-molekule.

Plasmied pCX is in 'n volgende eksperiment aan elektronmikroskopiese analise onderwerp. 'n Histogram van 296 datapunte is na kontoerlengtemetings saamgestel (Figuur 8.29, paneel A). Die gemiddelde totale lengte van die DNA-molekules is uit die Gaus-verspreidingskromme as $3530 \text{ bp} \pm 116$ bepaal teenoor die werklike waarde van 3369 bp. Drie voorkeurpieke vir binding van Ap2 aan die DNA is waarneembaar. Uit die Gaus-verspreidingskromme is die voorkeur bindingspunte vir Ap2 rondom $1140 \text{ bp} \pm 99$, $1520 \text{ bp} \pm 81$ en $1740 \text{ bp} \pm 75$ bepaal. Soos uit die lyndiagram onder die histogram waargeneem kan word, is bindingspiek 2 geleë in die gebied waar Ap2-binding in DNase I-afskermingsanalise (Figuur 7.5) waargeneem is. Die histogram van pSP65 + Ap2 word ter vergelyking van agtergrondbinding in paneel B van Figuur 8.29 gegee.

Die frekwensie van kompleksvorming is in 1071 molekules ondersoek. Slegs 0,7% van die molekules was as gevolg van aggregeatvorming nie analiseerbaar nie. Van die orige 1063 molekules is 163 (15,3%) by kompleksvorming betrokke. Uit die 163 molekules het 103 (63,2%) een proteïenkompleks gevorm, terwyl 60 (36,8%) twee komplekse gevorm het of aan lusvorming deelneem. Voorbeelde van twee verskillende posisies van binding sowel as 'n voorbeeld van lusvorming is in Figuur 8.30 gegee.

Elektronmikroskopiese analise is op plasmied pXS-DNA wat die 324 bp Xba I - Sac I-kollageenfragment insluit, uitgevoer. 'n Histogram van geselekteerde DNA-molekules word in Figuur 8.31 gegee. Voorkeurgebiede vir binding van die Ap2-proteïene op die molekule word in die histogram voorgestel. Een van die waargenome Ap2-bindingsgebiede kom ooreen met die bindingsgebied van Ap2 wat met DNase I-afskerming verkry is (Figuur 7.6). Hierdie bindingspunt word in die lyndiagram onder die histogram aangetoon. Die ander bindingsgebiede wat in die histogram waargeneem word, is te wyte aan Ap2-binding aan die pSP64/65 DNA-volgordes wat voorkom. Die totale lengte van die molekule soos bepaal uit die histogram is $3320 \text{ bp} \pm 54$ teenoor die werklike waarde van 3323 bp.



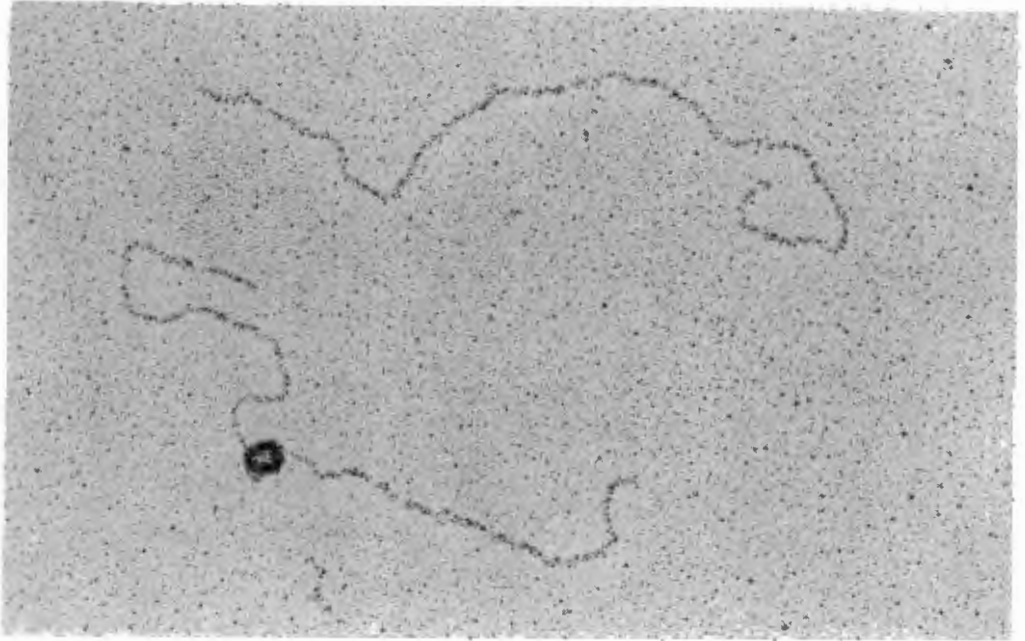
Figuur 8.29: Histogram van die metings van DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene.

- A: Metings van die 3369 bp pCX DNA-molekules.
B: Metings van die 3005 bp pSP65 DNA-molekules.

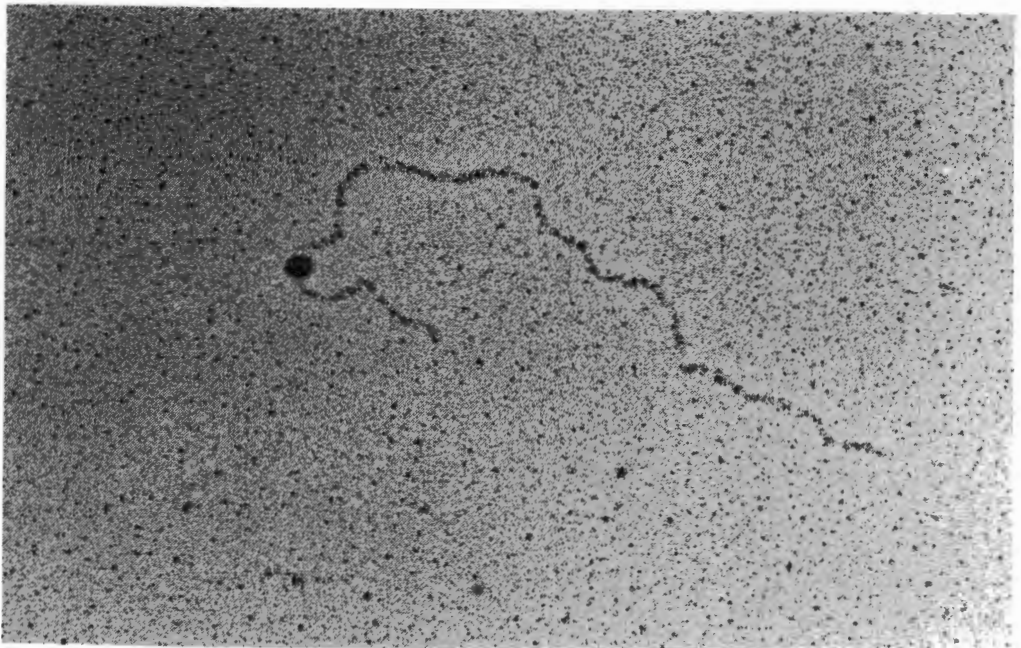
Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. In die lyndiagram onder die histogram in paneel A word die 370 bp Cla I - Xba I-fragment met die Ap2-bindingspunte (↑) soos verkry uit DNase I-afskermingsanalise aangetoon.

(C = Cla I; X = Xba I)

A



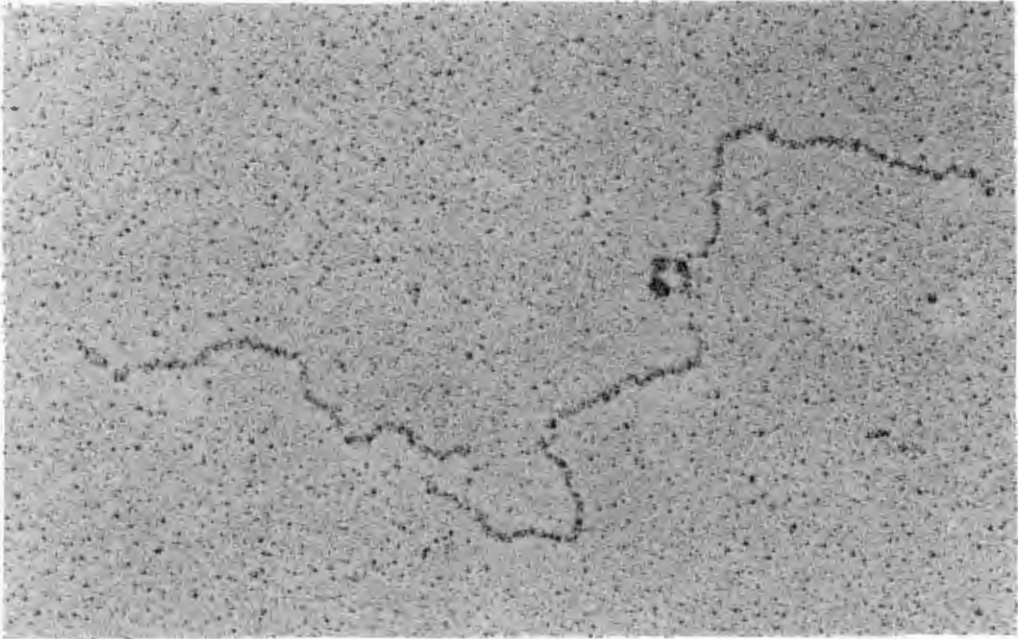
B



Figuur 8.30: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en pCX DNA-molekules.

A en B: Twee verschillende posities van enkel proteïenkomplekse op die DNA-molekules.

C

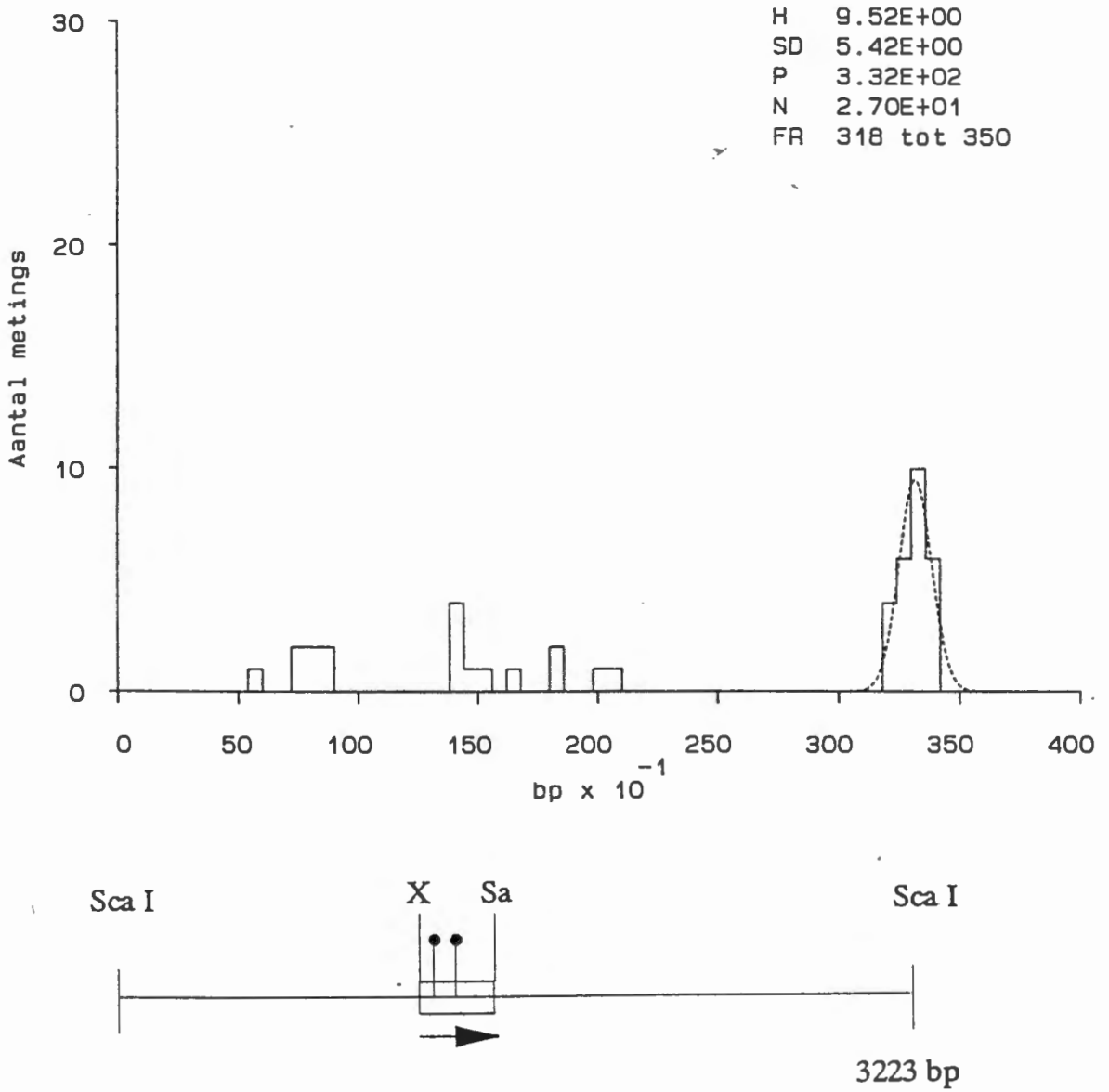


D



C en D: Twee verschillende lusvormings deur DNA-molekules as gevolg van die proteïen-proteïeninteraksie.

pXS + Ap2



Figuur 8.31: Histogram van die metings van die pXS DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene.

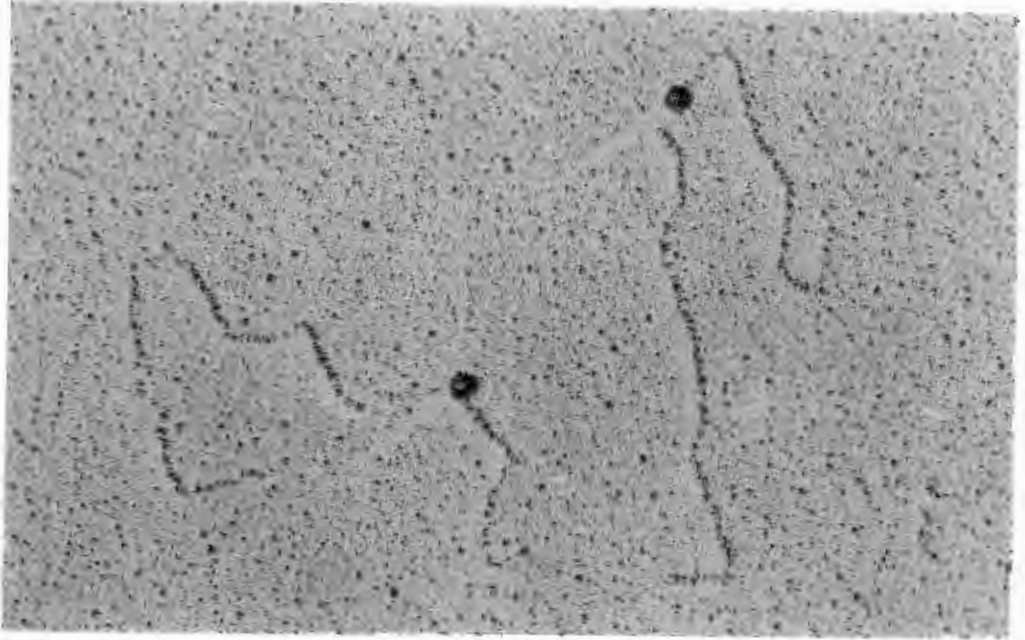
Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. Die lyndiagram van die 324 bp Xba I - Sac I-fragment toon Ap2-bindingspunte (●) soos verkry uit DNase I-afskermingsanalise.

(X = Xba I; Sa = Sac I)

Statistiese analise van ongeveer 1044 nie-geselekteerde molekules is onder die elektronmikroskoop uitgevoer om die frekwensie van kompleksvorming te bepaal. Van die 1044 molekules was 17 (1,6%) as gevolg van aggregaatvorming nie analiseerbaar nie. Van die orige 1027 molekules het 177 (17%) aan kompleksvorming deelgeneem. Hiervan het 102 molekules (57,6%) slegs een proteïenkompleks gevorm en 75 molekules (42,4%) twee molekules of was by lusvorming betrokke. 'n Voorbeeld van enkel proteïenkomplekse op twee verskillende posisies op die DNA-molekule word in Figuur 8.32 gegee.

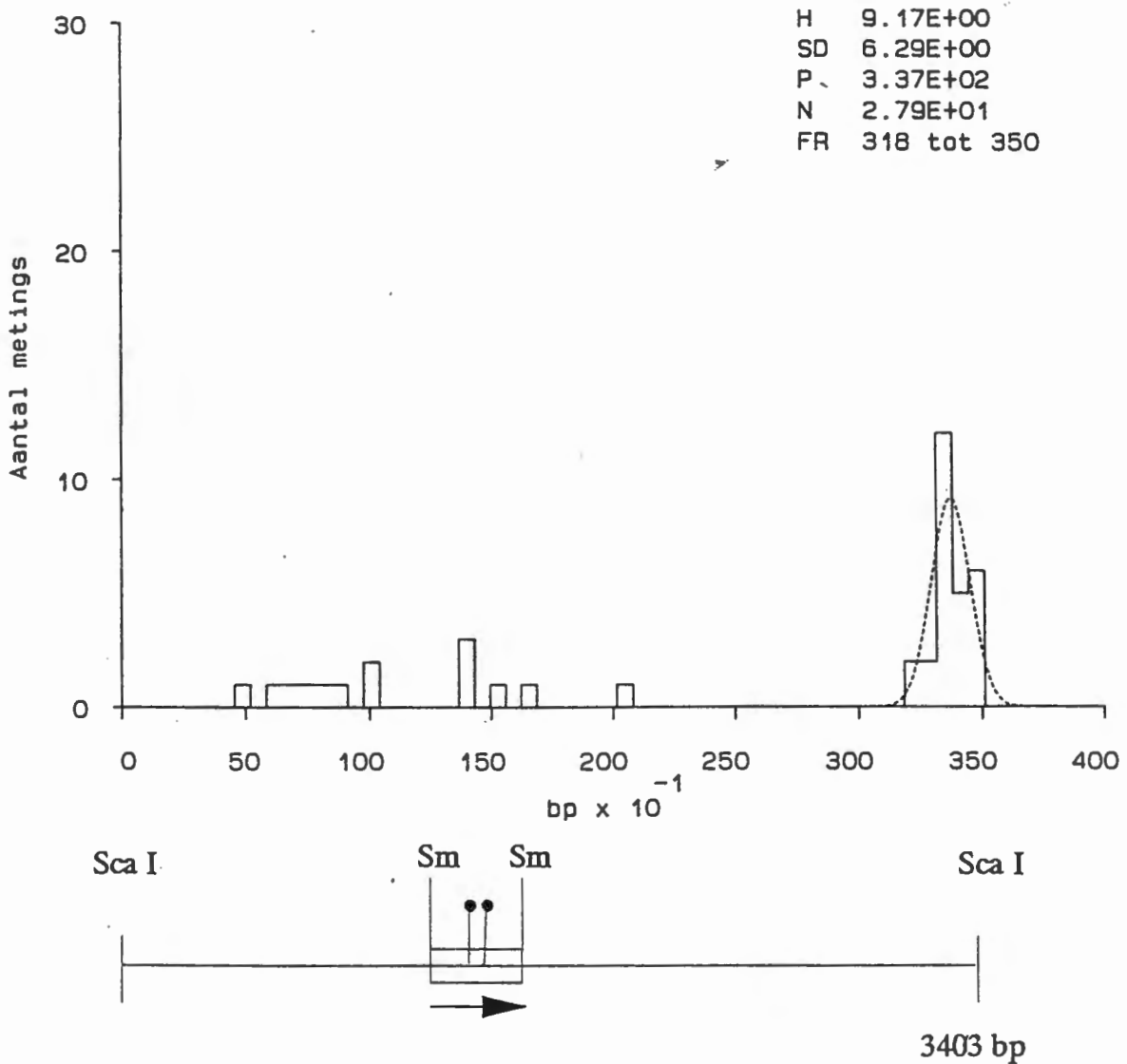
DNA van plasmied pSS is in 'n volgende eksperiment aan elektronmikroskopiese analise onderwerp. In die histogram in Figuur 8.33 kan gesien word dat die totale lengte van die molekule $3370 \text{ bp} \pm 63$ is teenoor die werklike waarde van 3403 bp. Voorkeurbindingsgebiede van die proteïene op die DNA is waarneembaar en benewens die agtergrondbinding van Ap2 aan die pSP64/45-volgordes, kom daar ook binding voor in die gebied waar Ap2-bindingsgebiede in DNase I-afskermingsanalise geïdentifiseer is (Figuur 7.7). Voorkeurbinding vir hierdie gebiede was egter nie baie hoog nie. 'n Voorbeeld van 'n enkel bindingsproteïenkompleks op die pSS-DNA-molekule word in Figuur 8.34 gegee. 'n Opvallende kenmerk van pSS + Ap2 is dat die proteïene nie so 'n hoë affiniteit as by die ander DNA's vertoon nie. Hierdie waarneming word ook weerspieël in die frekwensie van kompleksvorming wat maar 8,2% is.

Tydens statistiese analise van pSS-DNA met Ap2 onder die elektronmikroskoop om die frekwensie van kompleksvorming te bepaal, is 1089 molekules geanaliseer. Hiervan was slegs drie molekules (0,3%) nie analiseerbaar nie. Van die orige 1086 molekules was slegs 89 molekules (8,2%) betrokke by kompleksvorming, waarvan 49 (55%) enkelkomplekse en 40 (45%) twee komplekse gevorm het of betrokke by lusvorming. Die frekwensie van kompleksvorming van Ap2 met pSS-DNA is in dieselfde orde grootte as dié van die kontrole-DNA-pSP65.



Figuur 8.32: Elektronmikroskopie van twee verschillende kompleksvormings tussen Ap2-proteïene en pXS DNA-molekules.

pSS + Ap2



Figuur 8.33: Histogram van die metings van die pSS DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene.

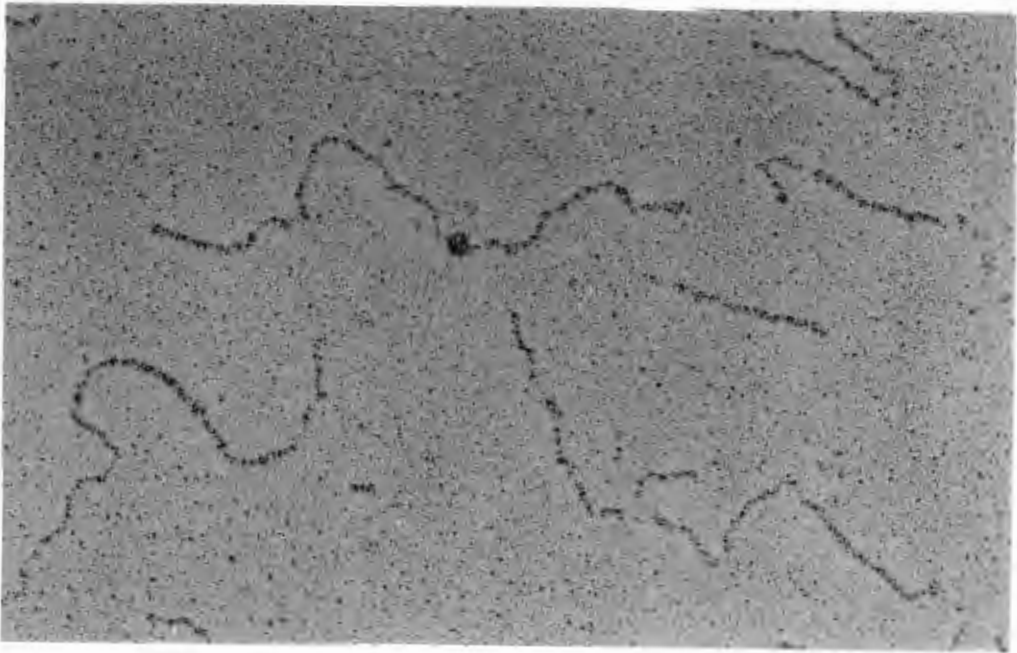
Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. Die lyndiagram van die 404 bp Sma I-fragment met die Ap2-bindingspunte (●) soos verkry uit DNase I-afskermingsanalise.

(Sm = Sma I)

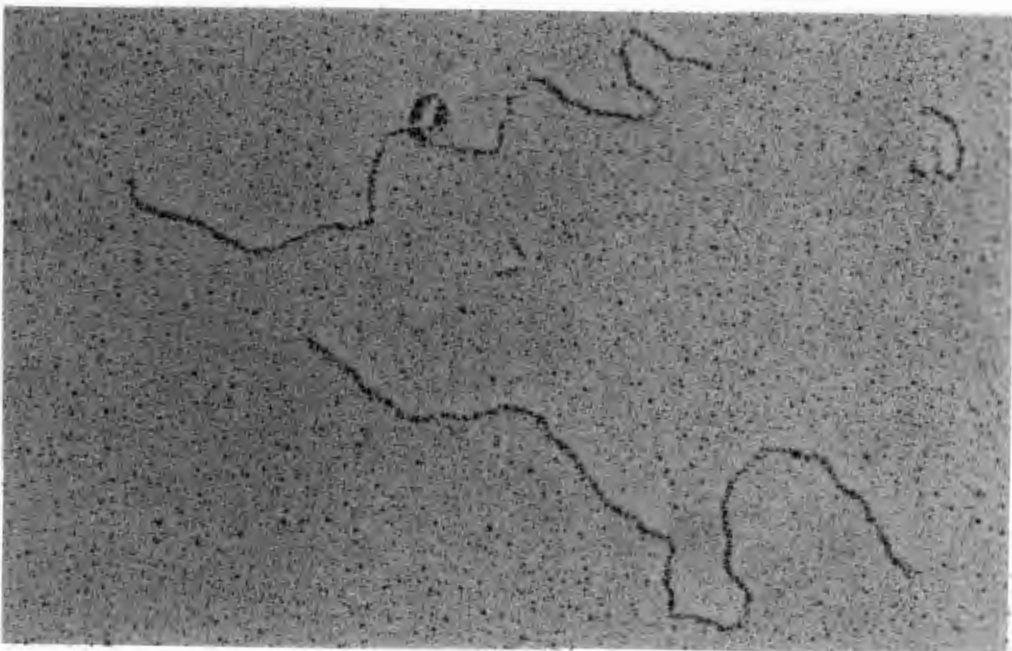
Plasmied-pRS DNA met Ap2 is soos die ander plasmied-DNA's aan elektronmikroskopiese analise onderwerp. 'n Histogram van voorkeurbindingsgebiede is uit kontoermetings van die molekules verkry (resultate nie getoon nie). Uit die Gaus-kromme is die totale lengte van die molekules bepaal as 3400 bp $\pm$ 75 teenoor die werklike waarde van 3331 bp. Meeste van die voorkeurbindingsgebiede van Ap2 vir hierdie DNA is geleë in die gebied waar pSP64/65-volgordes voorkom, hoewel binding ook plaasgevind het in die gebiede tussen 1290 en 1580 bp, wat die twee Ap2 bindingsgebiede soos verkry uit DNase I-afskermingsanalise van pRS (Figuur 7.8), insluit. Die voorkeurpiekbinding in die histogram vir hierdie DNA is rondom 1360 bp $\pm$ 50, wat ooreenkom met een van die Ap2-bindingsgebiede wat met DNase I-afskermingsanalise geïdentifiseer is. 'n Voorbeeld van 'n Ap2-bindingskompleks aan pRS word in Figuur 8.35 getoon.

Die frekwensie van kompleksvorming van Ap2 met die pRS-DNA is uit 1001 molekules bereken. Ongeveer 12 molekules (1,2%) was as gevolg van aggregate nie analiseerbaar nie, terwyl 101 molekules (10,1%) van die orige 989 molekules aan kompleksvorming deelgeneem het. Van hierdie 101 molekules het 47 (46,5%) enkel proteïenkomplekse gevorm en was 54 molekules (53,5%) betrokke by twee komplekse of lusvorming. Die frekwensie van 10,1% kompleksvorming is net effens hoër as dié van die kontroleplasmied.

Elektronmikroskopiese analise van pHR295 met Ap2 is uitgevoer soos vir al die ander fragmente. 'n Hoë affiniteit van Ap2 vir die HR295-DNA met gepaardgaande hoë frekwensie van aggregaatvorming soortgelyk aan dié wat waargeneem is met SV40-DNA en Ap2, is verkry. 'n Voorbeeld van so 'n aggregaatvorming word in Figuur 8.36 gegee. Die histogramme in Figuur 8.37 toon die voorkeurbindingsgebiede vir Ap2 op HR295-DNA (paneel A) aan en ter wille van die vergelyking met die agtergrondbinding van Ap2 aan pSP64/65 word dié van die kontrole-DNA, pSP65 (paneel B) ook gegee. Die totale lengte van die HR295 DNA molekule soos bepaal uit die histogram is 3290 bp $\pm$ 79 teenoor die werklike waarde van 3295 bp.

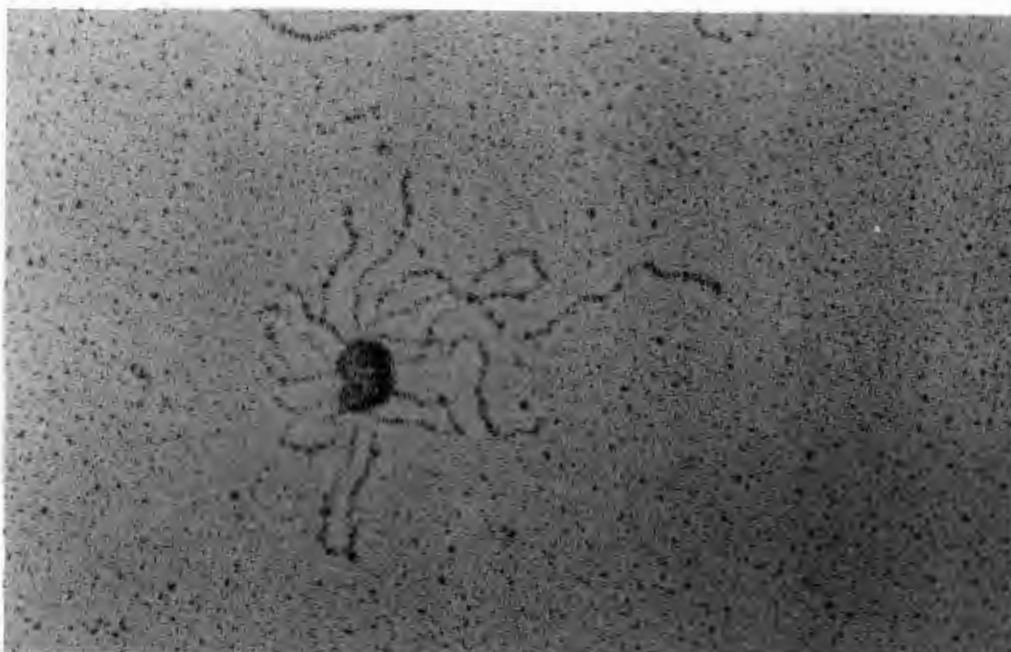


Figuur 8.34: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en pSS DNA-molekule.

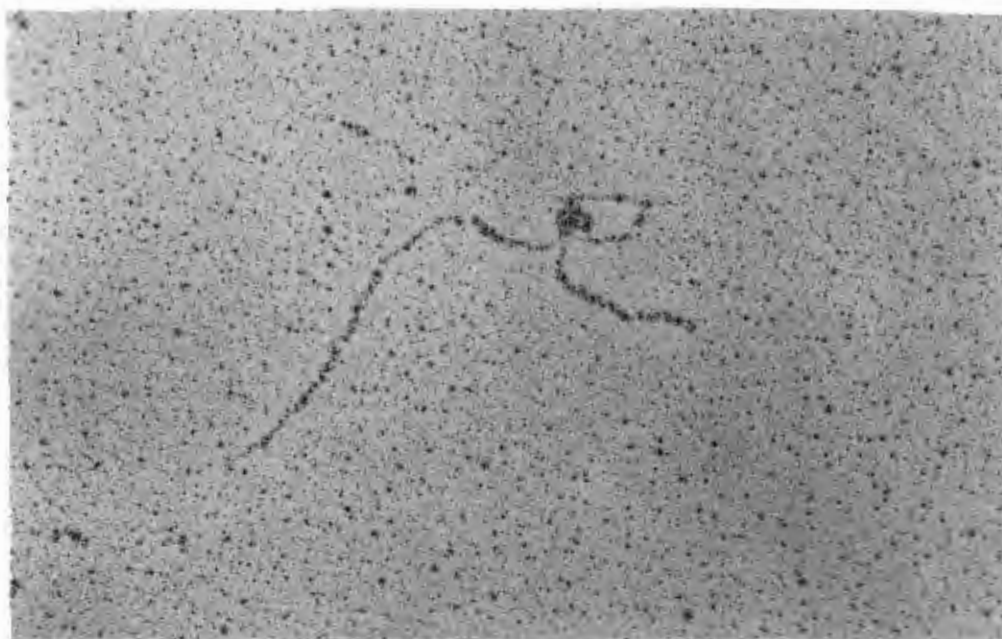


Figuur 8.35: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en 'n pRS DNA-molekule.

A



B



Figuur 8.36: A: Aggregaatvorming van Ap2-proteïene met pHR295 DNA-molekules.

B: Lusvorming deur pHR295 DNA-molekules as gevolg van proteïen-proteïeninteraksies.

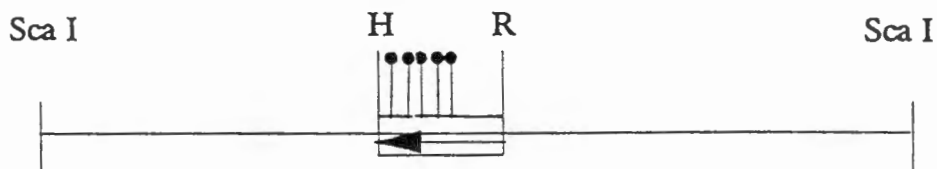
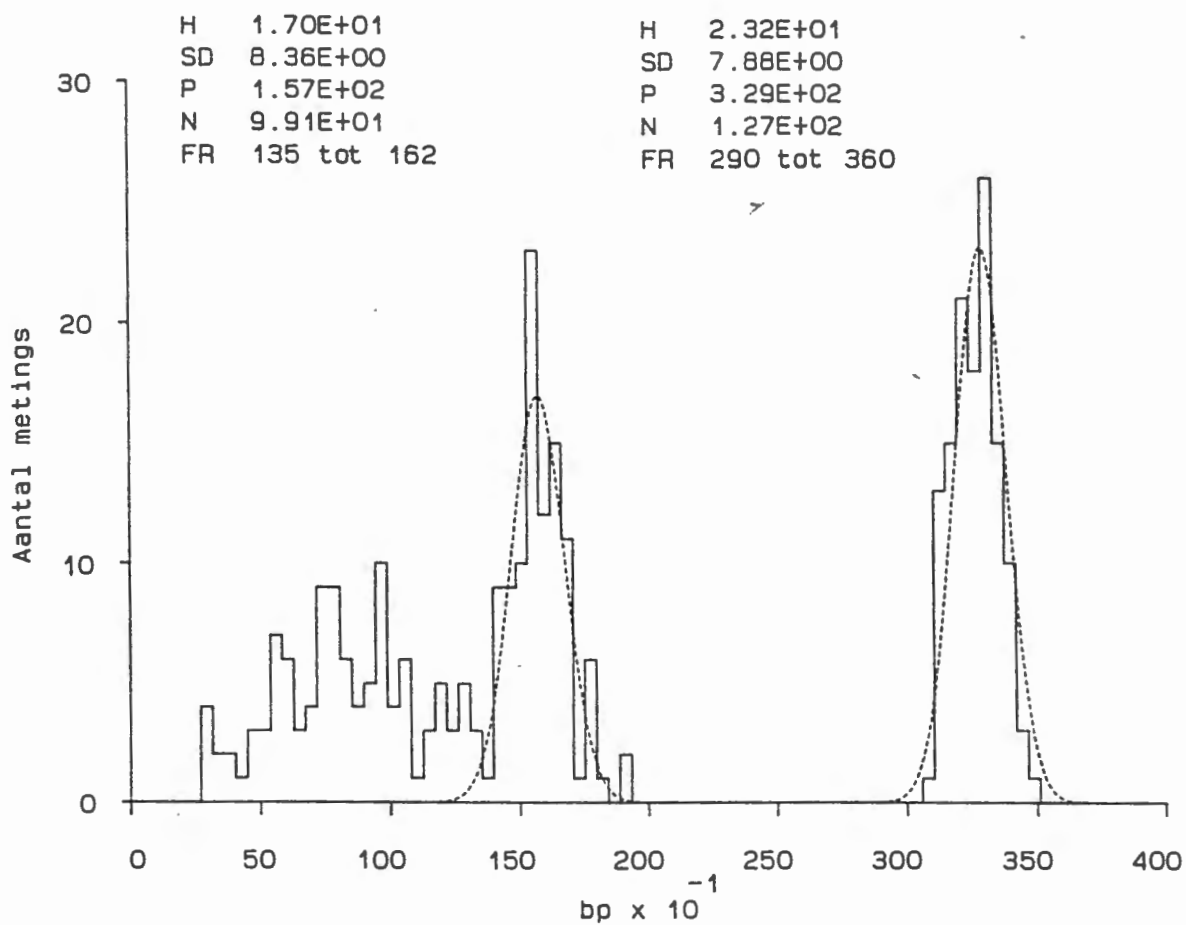
Die verskillende geïdentifiseerde Ap2-bindingsgebiede (Figuur 7.9) geleë tussen 1300 bp en 1500 bp soos verkry uit DNase I-afskermingsanalise kon, nie afsonderlik onder die elektronmikroskoop waargeneem word nie. 'n Voorkeurbindingsgebied kom egter wel in die histogram na vore na kontoermetings van geselekteerde DNA-molekules uitgevoer is. Die piek van hierdie gebied soos bepaal uit die Gaus-kromme in die histogram is rondom 1570 bp ± 84 geleë. In die lyndiagram onder die histogram van pHR295 met Ap2 word 'n aanduiding gegee van die vergelykende Ap2-bindingspunte wat met DNase I-afskermingsanalise verkry is.

Statistiese analise van 1172 molekules om die frekwensie van kompleksvorming te bepaal, is onder die elektronmikroskoop uitgevoer. Ongeveer 171 van hierdie molekules (14,6%) was as gevolg van aggreëatvorming nie analiseerbaar nie. Van die orige 1001 molekules het 381 molekules (32,5%) deelgeneem aan kompleksvorming. Enkel kompleksbindings is by 186 molekules (48,8%) waargeneem, terwyl 195 molekules (51,2%) betrokke is by twee komplekse of lusvorming. Die meeste lusvorming het plaasgevind deur interaksie tussen Ap2-proteïene van die pSP64/65-volgorde. 'n Voorbeeld van enkel bindingskomplekse en lusvorming word in Figuur 8.38 (paneel A en paneel B) gegee. Die hoë frekwensie van aggreëatvorming beïnvloed die frekwensiebepaling van kompleksvorming, maar ten spyte daarvan is die frekwensie van Ap2-binding aan die DNA heelwat hoër as in die geval van die ander fragmente en is dit meer in dieselfde orde grootte as dié van SV40.

Die laaste van die kleiner kollageenfragmente wat elektronmikroskopies ondersoek is, is pHR3' met Ap2. 'n Histogram van die meting van die kontoerlengtes van die DNA-molekules is bepaal en daaruit is die totale lengte van die molekule bereken as 3360 bp ± 35 teenoor die werklike waarde van 3249 bp (data nie getoon nie). Benewens die agtergrondbinding deur Ap2 aan die pSP64/65 DNA-volgordes, is voorkeurbinding ook verkry in die gebied waar Ap2-binding met DNase I-afskermingsanalises geïdentifiseer is (Figuur 7.10).

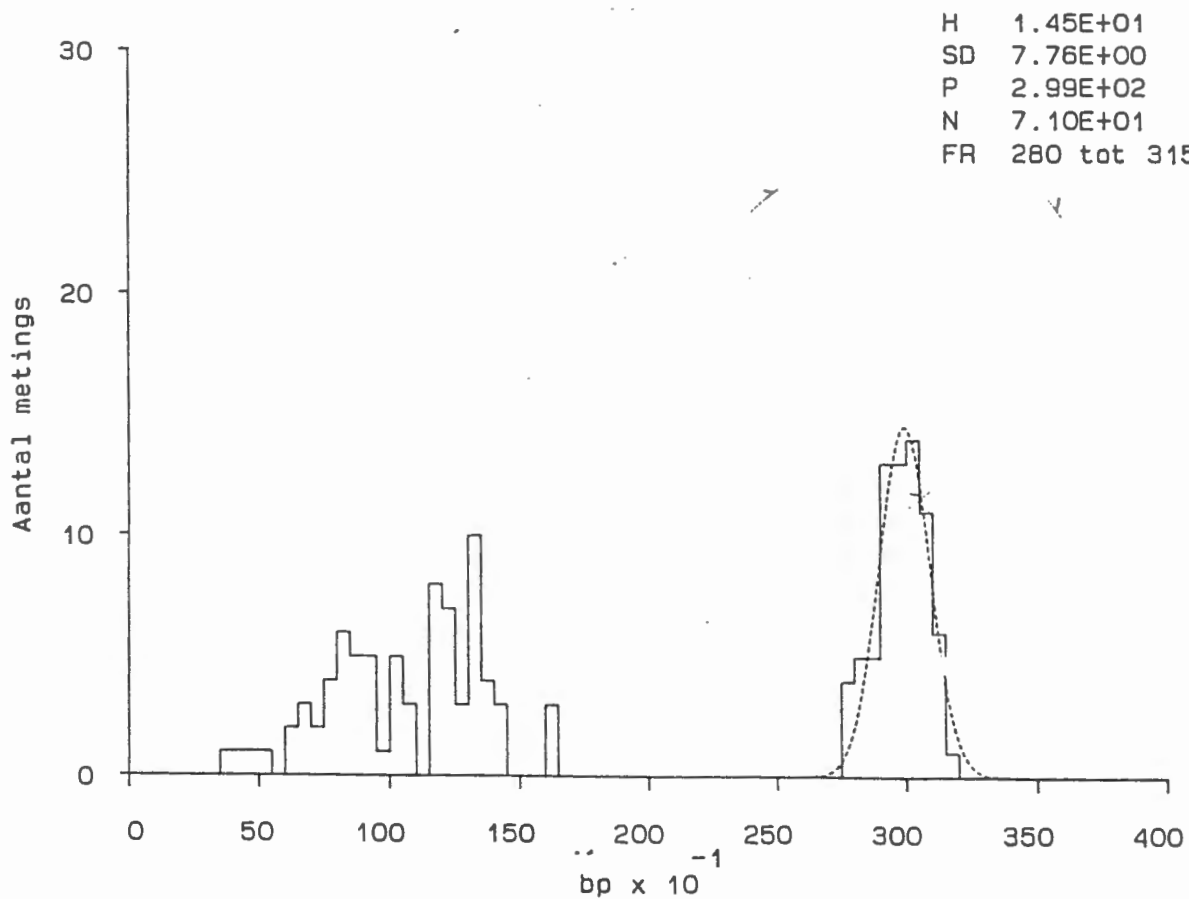
Bepaling van die frekwensie van Ap2-kompleksvorming aan die HR3'-DNA is uitgevoer deur die analise van 1067 molekules direk onder die elektronmikroskoop.

A



3295 bp

B



Figuur 8.37: Histogram van metings van DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene.

- A: Metings van die 3295 bp pHR295 DNA-molekules.
B: Metings van die 3005 bp pSP65 DNA-molekules.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. Die lyndiagram onder die histogram in paneel A toon die 296 bp Rsa I - Hind III-fragment met Ap2-bindingspunte (†) soos verkry uit DNase I-afskermingsanalise.

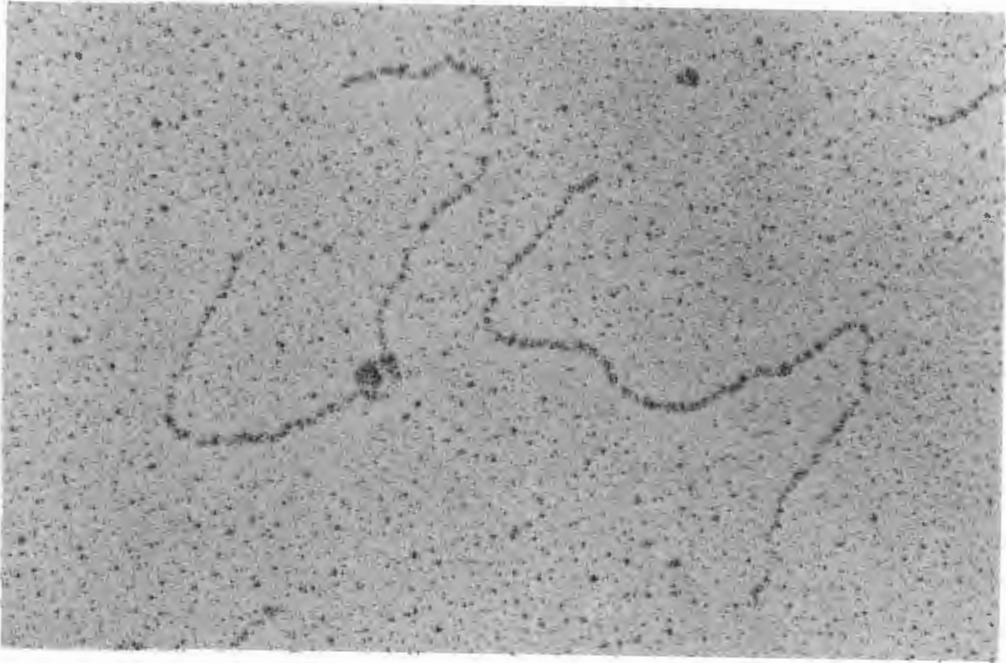
(R = Rsa I; H = Hind III)

Van hierdie 1067 molekules was 32 (3%) as gevolg van aggregaatvorming nie analiseerbaar nie, terwyl 167 van die orige 1035 molekules betrokke is by kompleksvorming. Dié frekwensie van kompleksvorming is dus 15,6%. Van hierdie 167 molekules het 81 molekules (48,5%) slegs een proteïenkompleks en 86 molekules (51,5%) twee komplekse en/of lusvorming gevorm. 'n Voorbeeld van so 'n lusvorming by pHR3' met Ap2 word in Figuur 8.39 gegee.

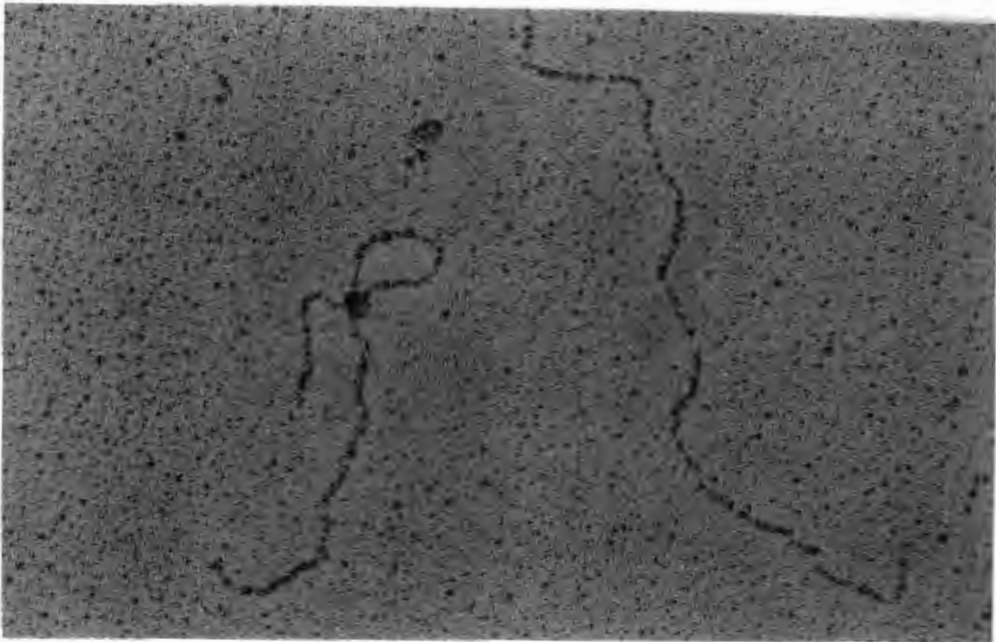
Die plasmiede met die langer kollageenfragmente is ook soos vir Sp1 aan elektronmikroskopiese analise onderwerp om proteïen-proteïeninteraksie te ondersoek. Uit die histogram van plasmied pHS-ex1 wat die Eco Rv - Pvu II; Cla I - Xba I en Xba I - Sac I-kollageenfragmente insluit, met Ap2 is die totale lengte van die molekules as 4040 bp $\pm$ 70 bepaal, teenoor die werklike waarde van 4139 bp. Proteïen-proteïeninteraksie wat waargeneem is, het hoofsaaklik tussen die Ap2-proteïene gebonde aan die die pSP64/65 DNA-volgordes plaasgevind. Binding van Ap2 is verder ook aangetref soortgelyk aan die ooreenkomstige fragmente en hul Ap2-binding (data nie getoon nie). Die frekwensie van kompleksvorming is uit 1008 nie-geselekteerde molekules bepaal. Van die 1008 molekules was 12 (1,2%) as gevolg van aggregaatvorming of verstrengeling van DNA nie analiseerbaar nie. Slegs 196 van die orige 996 molekules, dus 19,4%, is by kompleksvorming betrokke. Hiervan het 112 molekules (57,2%) 'n enkel kompleks gevorm, 72 molekules (36,7%) het lusvorming ondergaan en 12 molekules (6,1%) het twee gebiede van lusvorming en dus proteïen-proteïeninteraksie op een molekule ondergaan. In Figuur 8.40 word 'n voorbeeld van 'n enkel proteïenkompleks aangetoon.

Analise van plasmied pHS-int1 DNA (Figuur 4.3) met Ap2 is vervolgens op soortgelyke wyse as vir die ander plasmiede uitgevoer. Die grootste deel van die eerste intron kom in hierdie plasmied voor. Uit die histogram van metings van die kontoerlengtes van die molekules is die totale lengte van die molekule op 4000 bp $\pm$ 104 bepaal, wat goed met die werklike waarde van 4024 bp vergelyk. Voorkeurbindingsgebiede is soos vir die onderskeie pSS, pRS en pHR295 DNA's met Ap2 verkry, terwyl agtergrondbinding van Ap2 aan die pSP64/65 DNA-volgordes ook waargeneem is (data nie getoon nie).

A

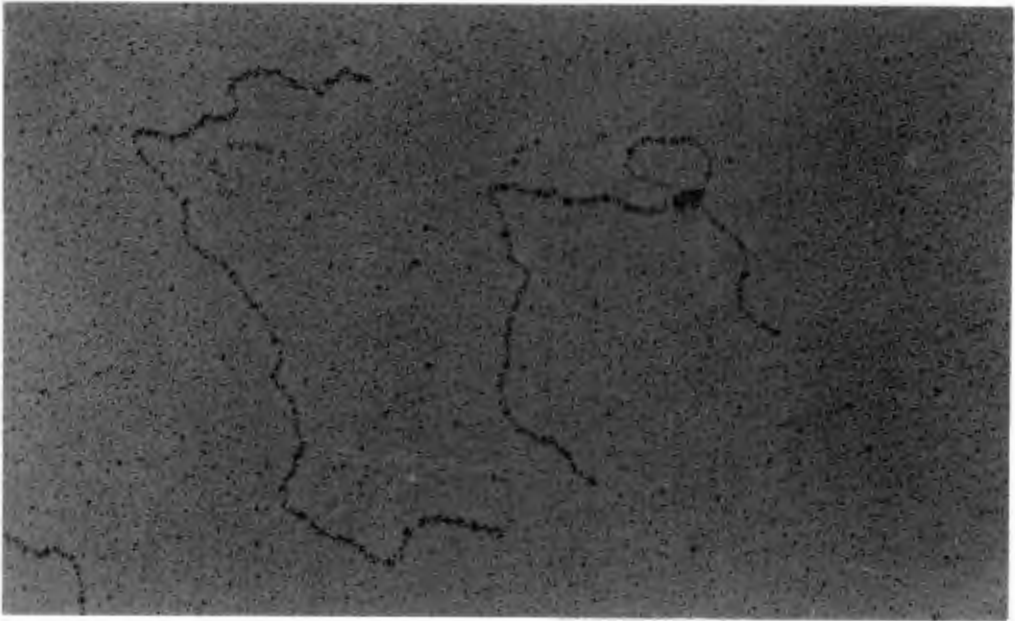


B

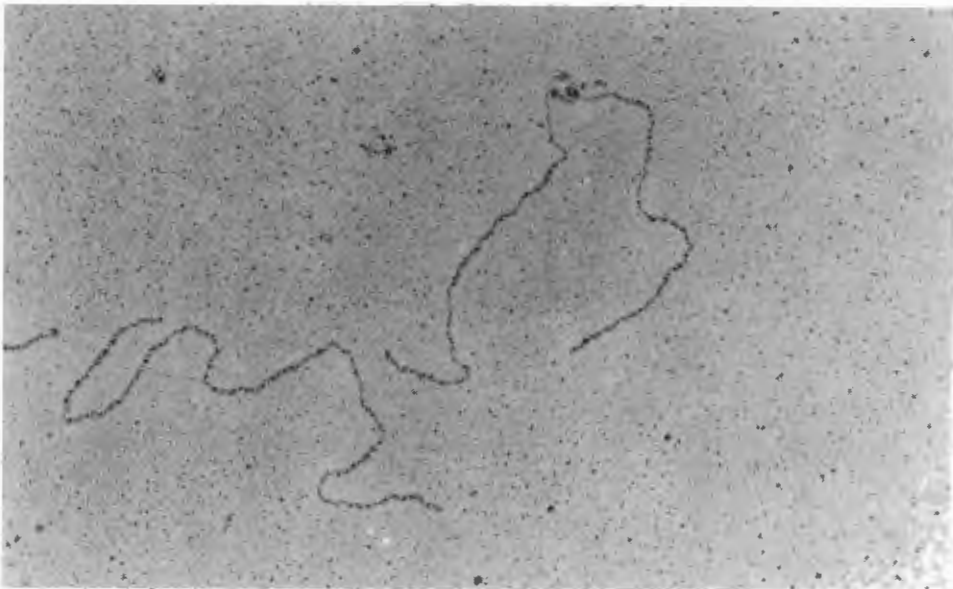


Figuur 8.38: Elektronmikroskope van Ap2-pHR295 DNA kompleksvorming.

- A: 'n Enkel proteïenkompleks gebonde aan die DNA-molekule.
- B: Lusvorming van DNA-molekule as gevolg van proteïen-proteïen-interaksie.



Figuur 8.39: Elektronmikroskopie van lusvorming deur die pHR3' DNA-molekule as gevolg van Ap2-Ap2 interaksie.

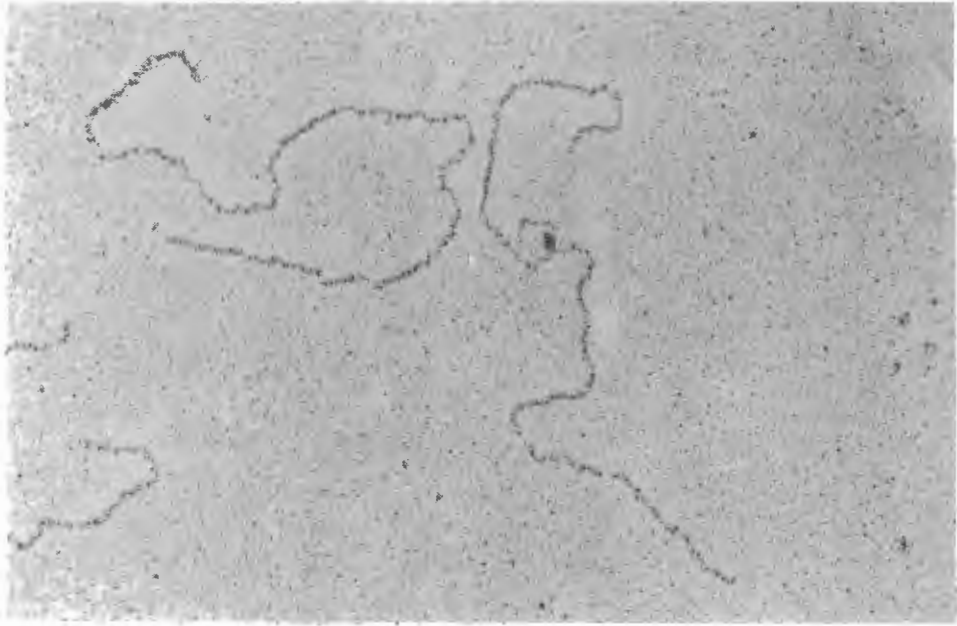


Figuur 8.40: Elektronmikroskopie van Ap2-pHS-ex1 DNA-kompleksvorming.

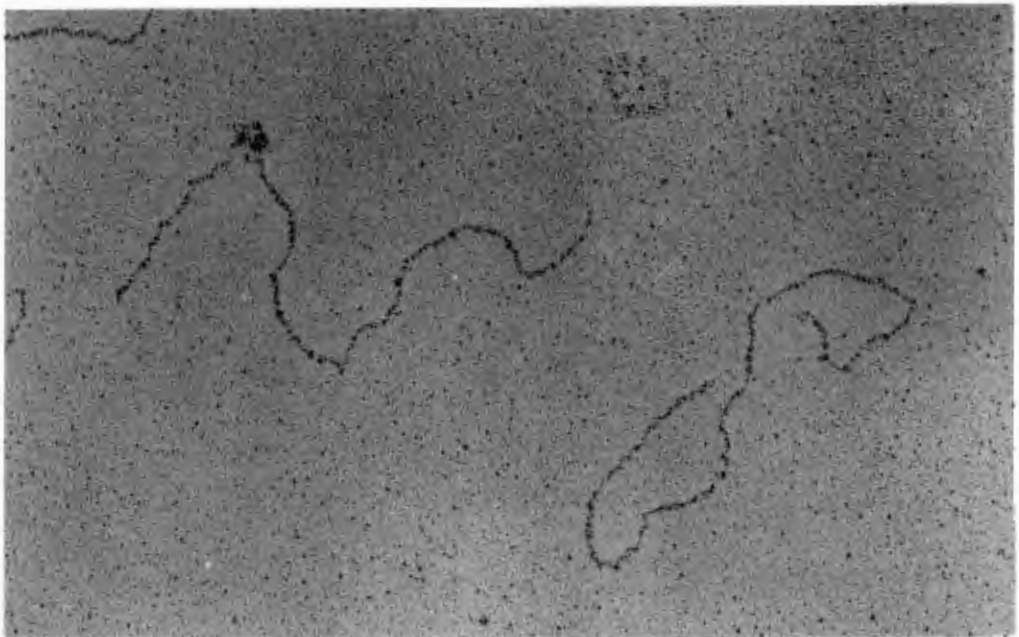
Frekwensiebepaling van kompleksvorming is op 1050 molekules uitgevoer waarvan 20 molekules (1,9%) nie analiseerbaar was nie. Van die orige 1030 molekules is gevind dat 250 (23,8%) betrokke is by kompleksvorming. Ongeveer 90 molekules (36%) is betrokke by enkel proteïenkompleksvorming, 130 molekules (52%) is betrokke by lusvorming en 30 molekules (12%) is betrokke by vorming van twee verskillende lusse op dieselfde molekule. 'n Voorbeeld van proteïenbinding op die pHS-int1-fragment word in Figuur 8.41 gegee.

Alvorens die plasmied pGEM-BB5(A) DNA geanaliseer is, is pGEM-11zf(+), die kontrole vir pGEM-BB5(A), in die teenwoordigheid van Ap2 geanaliseer. 'n Redelike hoë mate van Ap2-binding is aan pGEM-11zf(+)-DNA waargeneem. Statistiese analise direk onder die elektronmikroskoop van 1097 molekules toon dat 27 molekules (2,5%) as gevolg van aggreëatvorming nie analiseerbaar is nie, terwyl die frekwensie van kompleksvorming by die orige 1070 molekules 15,9% (170 molekules) is. Van hierdie 170 molekules is 90 (53%) betrokke by enkel proteïenkompleksbindings (Figuur 8.42) en 80 (47%) by lusvorming betrokke. In Figuur 8.43 word die histogram van die metings van die kontoerlengtes van die pGEM-DNA met Ap2 gegee. Die grootte van die totale lengte van die molekules is uit die histogram as 3240 bp $\pm$ 44 bereken. Hierdie waarde kom goed ooreen met die werklike waarde van 3223 bp. Voorkeurbindingsgebiede van Ap2 op die DNA word in die histogram aangetoon.

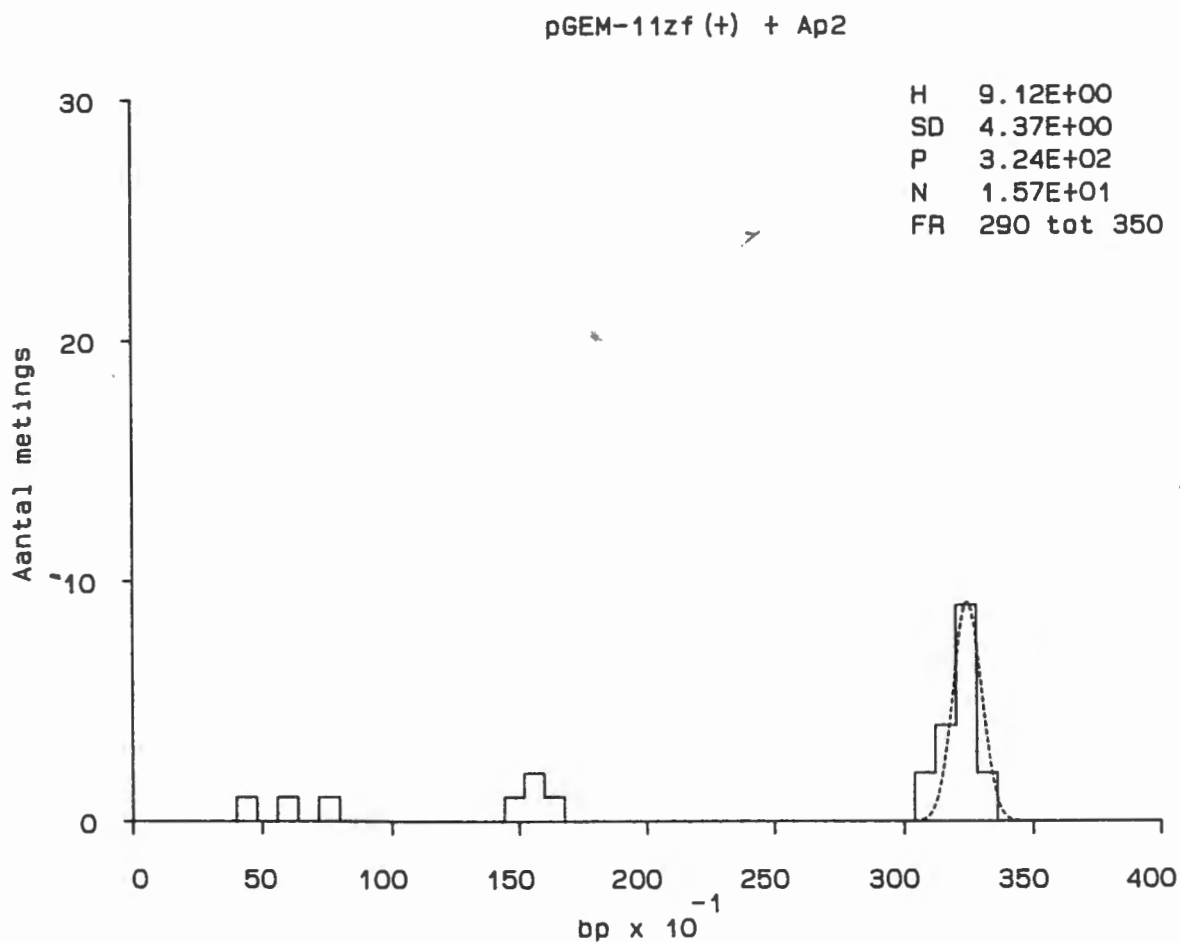
Elektronmikroskopiese analise is voorts op pGEM-BB5(A) DNA met Ap2 uitgevoer. Hierdie plasmied beskik oor die 5 kb Bam HI-fragment wat al die kollageenfragmente onder bestudering insluit en op 'n antikloksgewyse-oriëntasie in die plasmied ingevoeg is (Figuur 4.11). Frekwensiebepaling van kompleksvorming is op 1088 nie-geselekteerde molekules uitgevoer. Ongeveer 40 molekules (3,7%) was as gevolg van aggreëatvorming of verstrengeling van die DNA nie analiseerbaar nie. Van die orige 1048 molekules is 421 (38,7%) by kompleksvorming betrokke. Hiervan vorm 228 molekules (54,2%) slegs een proteïenkompleks. Ongeveer 148 molekules (35,2%) is betrokke by lusvorming, terwyl 45 molekules (10,6%) twee verskillende lusse op dieselfde molekule vorm.



Figuur 8.41: Elektronmikroskopie van Ap2-pHS-int1 DNA-kompleksvorming.

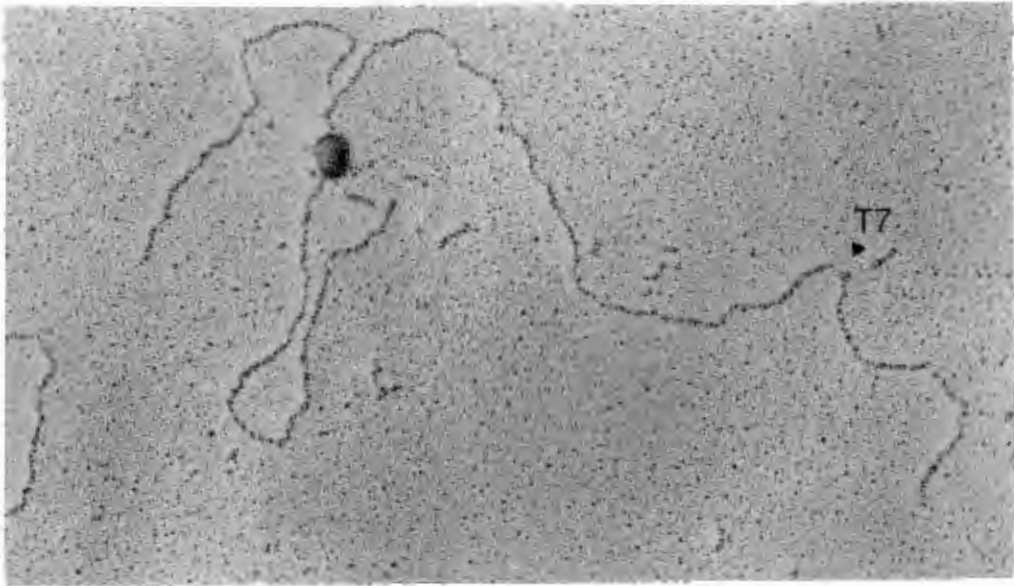


Figuur 8.42: Elektronmikroskopie van Ap2-pGEM-11zf(+) DNA-kompleksvorming.



Figuur 8.43: Histogram van die metings van die pGEM-11zf(+) DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene.

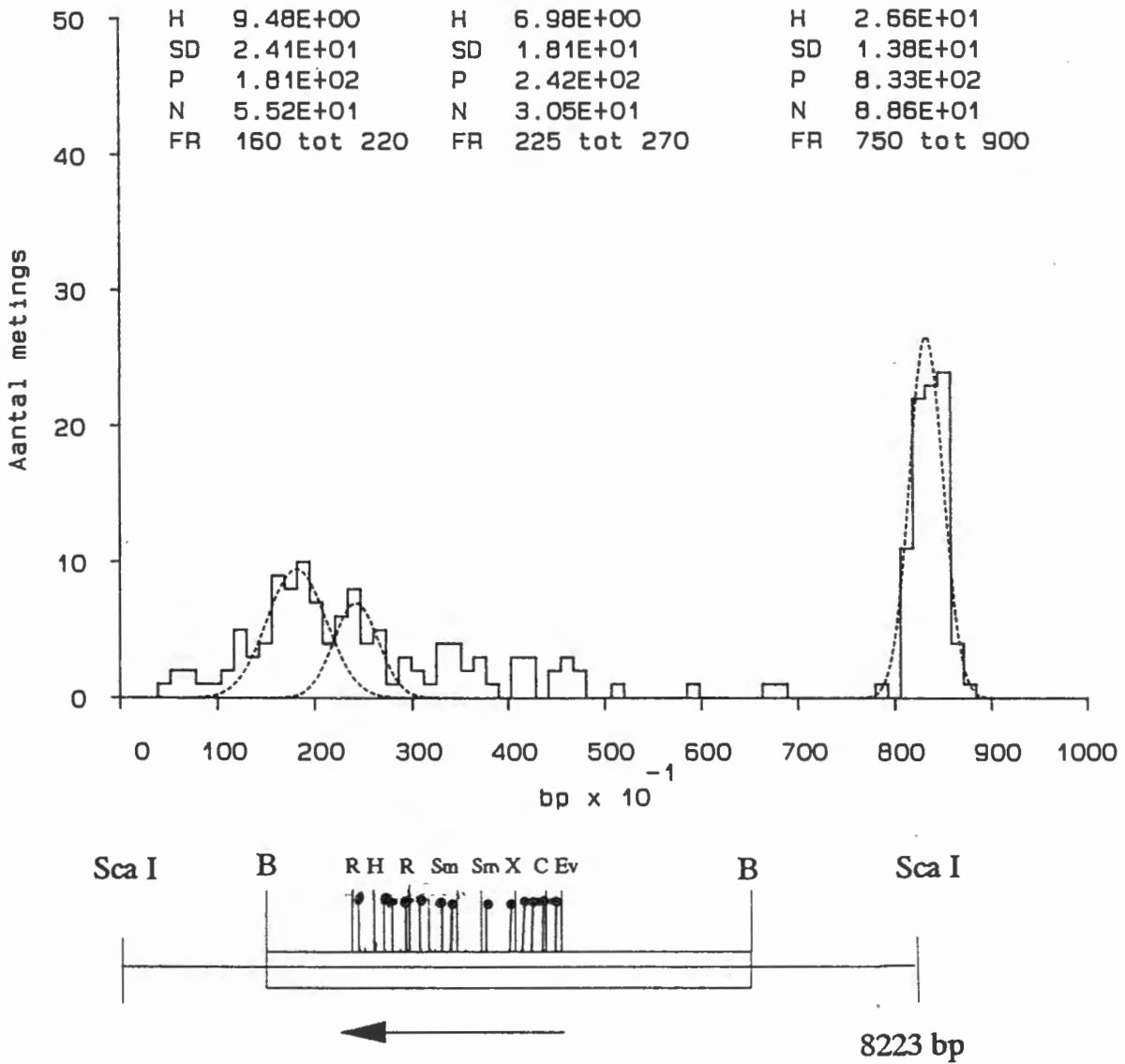
Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules.



Figuur 8.44: Elektronmikroskopie van Ap2-pGEM-BB5(A) DNA-kompleksvorming.

Binding van die T7 polimerase word ook aangetoon en help met die oriëntering van die molekule.

pGEM-BB5 (A) + Ap2



Figuur 8.45: Histogram van metings van pGEM-BB5(A) DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. Die lyndiagram toon die 5 kb Bam HI-fragment met Ap2-bindingspunte (•) soos verkry uit die DNase I-afskermingsanalises.

(B = Bam HI; R = Rsa I; H = Hind III; Sm = Sma I; X = Xba I; C = Cla I; Ev = Eco RV)

In Figuur 8.44 word 'n voorbeeld van so 'n lusvorming gegee. Tydens proteïen-proteïeninteraksie tussen Ap2-proteïene gebonde aan verskillende gebiede van die DNA vind lusvorming hoofsaaklik plaas tussen Ap2 gebonde aan die DNA in die pGEM-volgorde en dié in die BamHI-fragment. Proteïen-proteïeninteraksie is egter ook waargeneem tussen Ap2 in die Cla I - Xba I-promotorgebied en die Ap2 in die Hind III - Rsa I-intrangebied sowel as tussen Ap2-bindingsgebiede in die Eco RV - Pvu I-promotorgebied en Ap2-bindingsgebiede in die kollageenfragment nader aan die Bam HI-punt. Hierdie punte word in die lyndiagram onder die histogram in Figuur 8.45 aangedui.

Die histogram van die kontoerlengtemetings van die verskillende molekules word in Figuur 8.45 gegee. Die totale lengte van die molekules soos bereken uit die histogram is 8330 bp $\pm$ 138, teenoor die werklike waarde van 8223 bp. Voorkeurbindingsgebiede vir Ap2 word op die histogram aangetoon. Op grond van die oriëntasie soos verkry deur binding van die T7-polimerase en die *ori* is die volgorde waarin die bindingsgebiede op die DNA voorkom, omgekeer. Binding van T7-polimerase word ook in Figuur 8.44 aangetoon. As 'n reël word metings altyd van links langs die kortste moontlike pad na die middel van die naaste kompleks bepaal. Op grond van die oriëntasie deur T7-polimerase en die *ori* is die lesings in die histogram dus in die omgekeerde oriëntasie geles soos aangetoon in Figuur 8.45. Die piek van voorkeurbinding word veral op twee posisies in die histogram met behulp van die Gaus-kromme bepaal. Die eerste bindingspiek is rondom 1810 bp $\pm$ 241 geleë en die tweede bindingspiek rondom 2420 bp $\pm$ 181. Die eerste bindingsgebied is geleë in die kollageengebied tussen Rsa I en Bam HI en die tweede gebied in die Hind III - Rsa I-fragment (Figuur 8.44, lyndiagram). Die gebied tussen Rsa I en Bam HI is nie aan enige DNase I-analises in hierdie studie onderwerp nie, maar dit wil voorkom of daar in hierdie DNA-gebied affiniteitsbindingspunte vir Ap2 aanwesig is.

Tabel 8.2 DNA-proteïenkompleksvorming met Ap2 en die kollageenfragmente

FRAGMENT	GETAL (EN PERSENTASIE) MOLEKULES WAARGENEEM					
	DNA-MOLEKULES SONDER KOMPLEKSE	DNA-MOLEKULES NIE ANALISEERBAAR	DNA-MOLEKULES MET KOMPLEKSE			
				EEN PROTEÏEN- KOMPLEKS	TWEE PROTEÏEN- KOMPLEKSE OF LUSVORMING	MEER AS TWEE PRO- TEÏENKOMPLEKSE OF LUSVORMING
pSP72	900 (84,6%)	0 (0%)	164 (15,4%)	121 (73,8%)	43 (26,2%)	-
pSV40	550 (53,3%)	50 (4,9%)	431 (41,8%)	224 (52%)	207 (48%)	-
pSP65	1000 (91%)	6 (0,5%)	94 (8,5%)	72 (76,6%)	22 (23,4%)	-
pEP	940 (87%)	10 (0,9%)	131 (12,1%)	99 (75,6%)	32 (24,4%)	-
pCX	900 (84%)	8 (0,7%)	163 (15,3%)	103 (63,2%)	60 (36,8%)	-
pXS	850 (81,4%)	17 (1,6%)	177 (17%)	102 (57,6%)	75 (42,4%)	-
pSS	997 (91,5%)	3 (0,3%)	89 (8,2%)	49 (55%)	40 (45%)	-
pRS	888 (88,7%)	12 (1,2%)	101 (10,1%)	47 (46,5%)	54 (53,5%)	-
pHR295	620 (52,9%)	171 (14,6%)	381 (32,5%)	186 (48,5%)	195 (51,5%)	-
pHR3'	868 (81,4%)	32 (3%)	167 (15,6%)	81 (48,5%)	86 (51,5%)	-
pHS-ex1	800 (79,4%)	12 (1,2%)	196 (19,4%)	112 (57,2%)	72 (36,7%)	12 (6,1%)
pHS-int1	780 (74,3%)	20 (1,9%)	250 (23,8%)	90 (36%)	130 (52%)	30 (12%)
pGEM-11zf(+)	873 (81,6%)	27 (2,5%)	170 (15,9%)	90 (53%)	80 (47%)	-
pGEM-BB5(A)	627 (57,6%)	40 (3,7%)	421 (38,7%)	228 (54,2%)	148 (35,2%)	45 (10,6%)

8.3.2.1 SAMEVATTING

Die Ap2-proteïene toon 'n aansienlik hoër affiniteit vir DNA as Sp1 met die gevolglike vorming van DNA-proteïenaggregate. Hierdie aggregaatvorming het daartoe bygedra dat heelwat meer molekules as in die geval van Sp1-binding nie analiseerbaar was nie en het gevolglik ook 'n groter invloed op die frekwensie van kompleksvorming gehad soos waargeneem kan word in Tabel 8.2. 'n Duidelike tendens wat egter uit hierdie statistiese analise na vore gekom het, soos weergegee in Tabel 8.2, is dat hoe hoër die affiniteit van Ap2 vir die DNA is, hoe hoër die persentasie aggregaatvorming en gevolglike nie-geanaliseerbare molekules is.

Opmerklik uit Tabel 8.2 is dat die frekwensie van Ap2-kompleksvorming in kontroleplasmiede pSP72 en pGEM-11zf(+) bykans twee keer hoër is as die van kontroleplasmied pSP65, ofskoon daar nie veel verskil in DNA-volgorde tussen pSP72 en pSP65 is nie. Die verskil in DNA-volgordes dra egter blykbaar wel by tot hoër Ap2-affiniteit. Die frekwensie van binding aan veral die kollageenfragment pHR295 is ook opvallend hoër as naasliggende kollageenfragmente, maar is min of meer in dieselfde orde grootte as die bindingsfrekwensie van Ap2 aan pSV40, pGEM-BB5(A) en pHS-int1. Laasgenoemde twee fragmente bevat beide die pHR295-kollageenfragment, wat 'n verdere aanduiding van die hoë affiniteit van Ap2 vir hierdie bindingsgebied is.

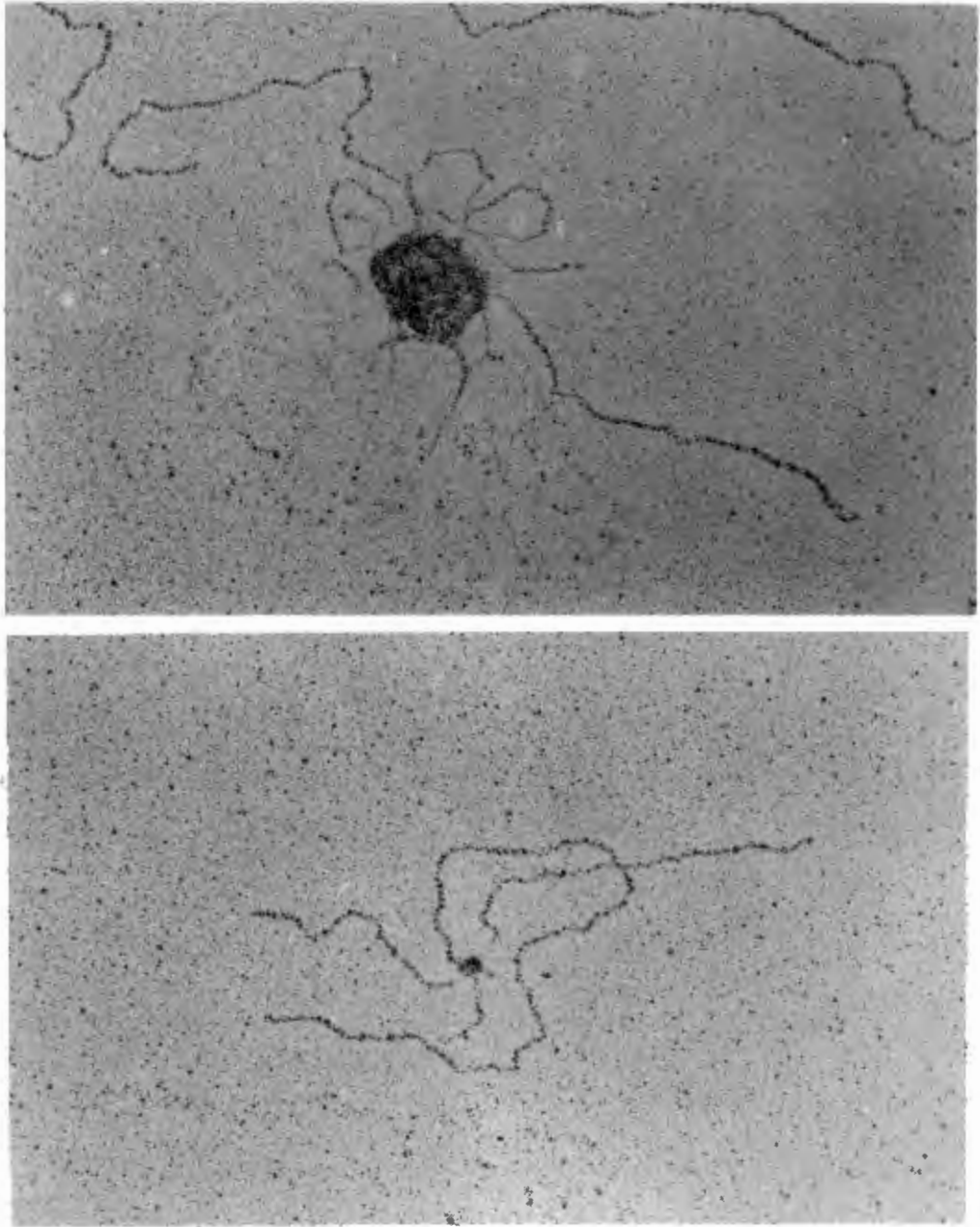
8.3.3 ELEKTRONMIKROSKOPIESE ANALISE VAN DIE KOLLAGEENFRAGMENTE MET AP1

Elektronmikroskopiese analise van DNA met Ap1 is op die "standaard" SV40-DNA en sy kontrole-pSP72 uitgevoer. Van die korter kollageenfragmente is slegs pSS met sy kontrole-pSP65 vir Ap1-binding ondersoek. Plasmied pSS is die enigste van die kollageenfragmente waar Ap1-binding deur DNase I-afskermingsanalise geïdentifiseer

is (Figuur 7.7). Die langer kollageenfragment pHS-ex1 en pHS-int1 wat onderskeidelik die promotorgebied en eerste ekson en die eerste intron bevat, is ook vir Ap1-binding ondersoek. Verder is pGEM-BB5(A) met sy kontroleplasmied pGEM-11zf(+) ook vir Ap1-binding geanaliseer. Die laasgenoemde drie langer DNA-fragmente is ingesluit om te bepaal of ander Ap1-bindingsgebiede benewens die in die pSS-fragment in die kollageengeen, voorkom en of enige Ap1-selfassosiasie tussen verskillende bindingsgebiede plaasvind.

pSV40-DNA is in die teenwoordigheid van 0,5 μ l Ap1 (1.1 μ g/ml) in 'n 10 μ l reaksiemengsel vir 40 minute by kamertemperatuur geïnkubeer. Die res van die eksperiment is onder dieselfde eksperimentele toestande as vir Sp1 en Ap2 uitgevoer. 'n Groot mate van DNA-proteïen aggregaatvorming, selfs teen 'n hoër frekwensie as in die eerste Ap2-eksperiment, is waargeneem. 'n Herhaling van die eksperiment met 0,2 μ l Ap1 het tot dieselfde resultaat gelei. 'n Verdere herhaling van die eksperiment in die teenwoordigheid van 0,1 μ l Ap1 het 'n afname in aggregaatvorming tot gevolg gehad, hoewel die frekwensie van aggregaatvorming nog hoog is. Soos ook in Figuur 7.32 genoem, lei die hoë konsentrasie van die Ap1-proteïene by veral die DNase I-afskerming tot probleme, maar aangesien verdunning van die proteïene tot 'n afname in proteïenaktiwiteit lei, is besluit om die eksperimente met 0,1 μ l Ap1 uit te voer. 'n Algemene voorbeeld van aggregaatvorming deur Ap1 word in Figuur 8.46 (paneel A) gegee.

Meting van die SV40-DNA met Ap1 is bemoeilik deur die hoë affiniteit van Ap1 vir die DNA met gevolglike probleme om histogramme te verkry. Indien die Ap1 nie aggregate vorm nie, veroorsaak dit binding van meer as een molekule aan dieselfde proteïen-molekule. 'n Voorbeeld hiervan word in Figuur 8.46 (paneel B) gegee. Uit die molekules wat gemeet kon word, is 'n histogram saamgestel en hieruit is die totale lengte van die molekule as 2730 bp $\pm$ 36 bepaal. Hierdie grootte kom goed ooreen met die werklike grootte van 2719 bp. Voorkeurbindingsgebiede is ook waargeneem by die gebiede waar Ap1-binding op die SV40-DNA voorkom (data nie getoon nie).



Figuur 8.46: Elektronmikroskopie van Ap1-SV40 DNA-kompleksvorming.

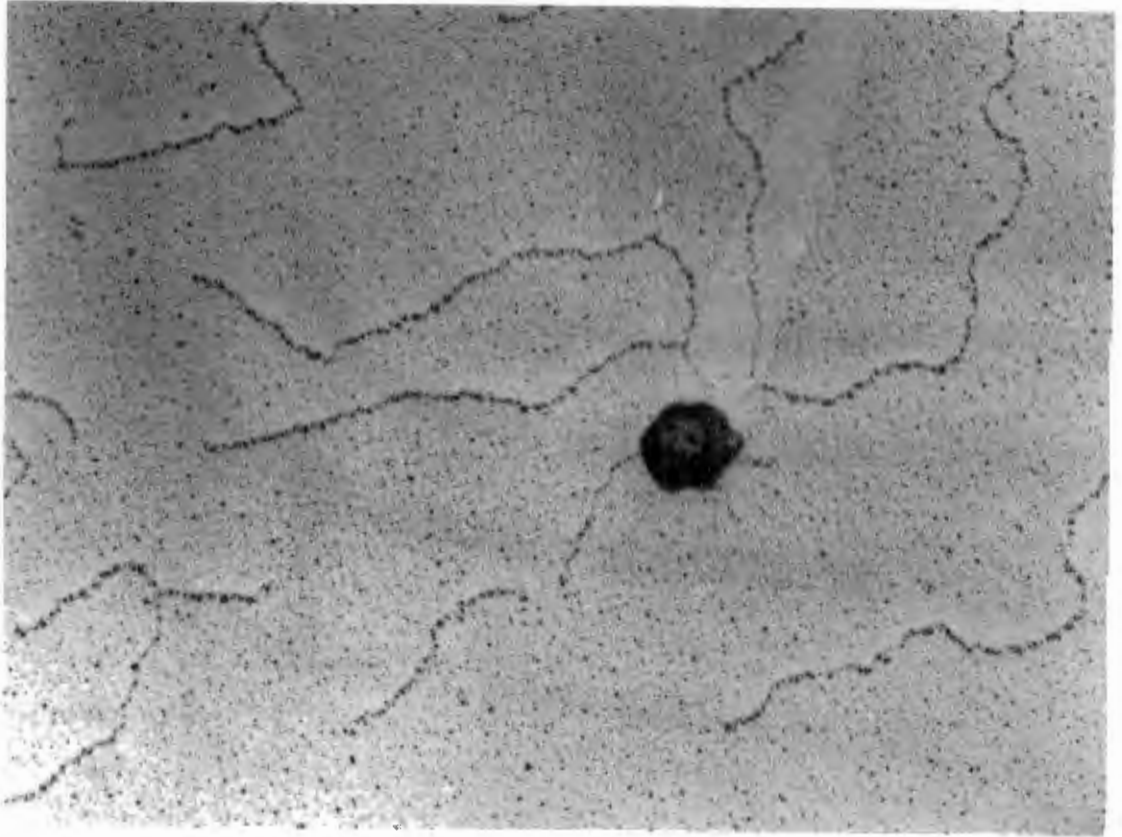
- A: Aggregaatvorming tussen verskeie Ap1-proteïene en DNA-molekules as gevolg van die hoë affiniteit van die proteïene vir die DNA.
- B: Interaksie van meer as een DNA-molekule met dieselfde proteïenkompleks.

Frekwensiebepaling van kompleksvorming is uitgevoer deur die analise van 1016 molekules. Hiervan was sewe molekules (0,7%) betrokke by aggregaatvorming en dus nie analiseerbaar nie. Van die orige 1009 molekules was slegs 59 (5,8%) by kompleksvorming betrokke. Die rede vir hierdie lae binding van proteïene is waarskynlik te wyte aan die feit dat die meeste proteïene vasgevang of betrokke is by die groot aggregate wat gevorm word. Van die 59 molekules toon 55 (93%) enkel proteïenkomplekse en vier (7%) lusvorming of twee proteïenkomplekse.

Baie min Ap1-binding kon aan die kontrole-pSP72-DNA waargeneem word met die gebruik van dieselfde eksperimentele kondisies as vir SV40-DNA met Ap1. Binding wat waargeneem is was egter almal deel van aggregaatvorming. Van die duisend molekules wat geanaliseer is, is 5 (0,5%) by aggregaatvorming betrokke, terwyl geen enkel kompleksvorming by die ander molekules waargeneem kon word nie.

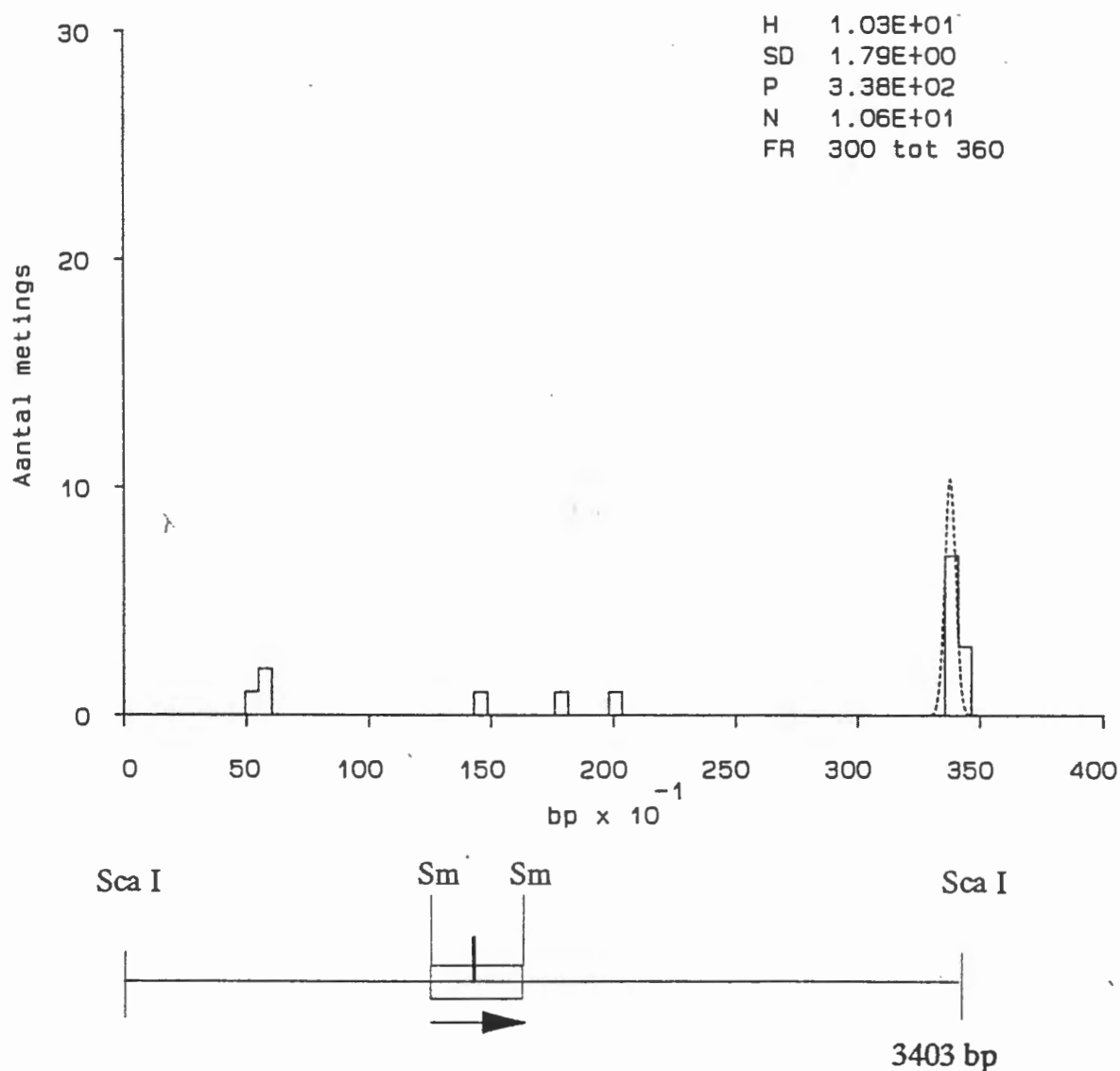
Die enigste Ap1-binding wat tydens hierdie studie in die kollageenfragmente waargeneem is, kom in plasmied pSS voor. Hierdie plasmied bevat die 404 bp Sma I-kollageenfragment waar 'n Ap1-bindingspunt met DNase I-afskermingsanalise geïdentifiseer is (Figuur 7.7). Elektronmikroskopiese analise van hierdie pSS-DNA met Ap1 toon 'n nog groter affiniteit van Ap1 vir die DNA as wat by SV40 waargeneem is.

Statistiese analise van ongeveer 1010 molekules toon dan ook 'n tendens van heelwat aggregaatvorming of andersins binding van ten minste twee DNA-molekules met een Ap1-proteïen of 'n kompleks van proteïene. 'n Voorbeeld van molekules wat aan so 'n proteïenkompleks bind word in Figuur 8.47 gegee. Analise van die 1010 molekules toon dat 252 molekules (25%) betrokke is by aggregaatvorming en daarom nie analiseerbaar is nie. Van die orige 758 molekules is slegs 190 molekules (19,8%) nie by kompleksvorming betrokke nie. Die frekwensie van kompleksvorming is dus 56,2%. Van die 568 molekules is 230 molekules (40%) betrokke by enkelbindings en 338 molekules (60%) by lusvorming.



Figuur 8.47: Aggregaatvorming tussen Ap1-proteïene en pSS DNA-molekules.

pSS + Ap1



Figuur 8.48: Histogram van die metings van DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap1-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap1-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. Die lyndiagram toon die 404 bp Sma I-fragmente met die Ap1-bindingspunte (|) soos verkry uit Dnase I-afskermingsanalise aan.

(Sm = Sma I)

'n Opstelling van die histogram is weer eens erg bemoeilik deur die aggregaatvorming. Die totale lengte van die molekule is egter uit die histogram (Figuur 8.48) as 3380 bp $\pm$ 18 bepaal, wat goed met die werklike grootte van 3403 bp vergelyk. Voorkeurbinding is ook waargeneem in die gebied waar Ap1-binding met DNase I-afskermingsanalise geïdentifiseer is. Hierdie Ap1-bindingsgebied word in die lyndiagram onder die histogram aangetoon.

Analise van die elektronmikroskopiese ondersoek van die kontroleplasmied pSP65 toon 'n baie lae affiniteit van Ap1 vir die DNA. In 'n statistiese analise van 1013 molekules is waargeneem dat vier molekules (0,4%) nie analiseerbaar is nie. Van die orige 1009 molekules is slegs 13 molekules (1,3%) by kompleksvorming betrokke. Ongeveer agt molekules (61,5%) toon enkel proteïenbindings, terwyl vyf molekules (38,5%) by lusvorming betrokke is. 'n Voorbeeld van 'n enkel proteïenkompleks op pSP65 word in Figuur 8.49 gegee.

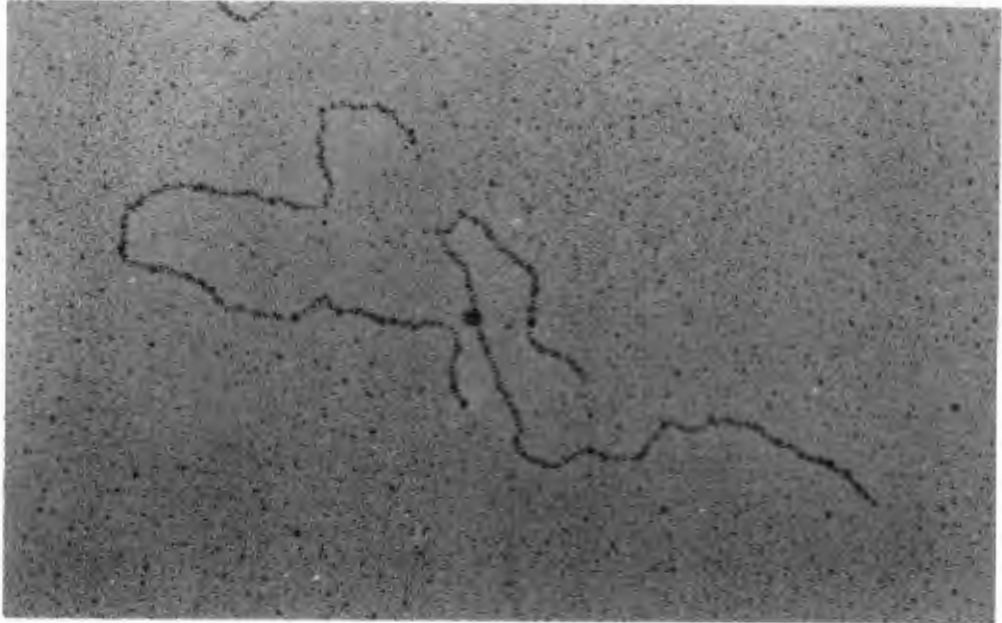
Die histogram van kontoerlengtemetings van die pSP65-molekules met Ap1 soos in Figuur 8.50 gegee, weerspieël die min proteïenbindings wat waargeneem is. Die totale lengte van die molekule is uit die histogram as 2980 bp $\pm$ 48 bepaal, wat redelik ooreenstem met die werklike waarde van 3005 bp.

Plasmied pHS-ex1 bevat 'n kollageenfragment waarin, volgens DNase I-afskermingsanalises, geen Ap1-bindingsgebiede voorkom nie (Hoofstuk 7). 'n Histogram van die metings toon dan ook geen bindingsgebiede in die kollageenfragment aan nie. Bindingsgebiede wat wel voorkom, stem ooreen met dié verkry by pSP65 DNA (data nie getoon nie). Frekwensiebepaling van kompleksvorming toon dat 1,4% van die molekules nie analiseerbaar is nie. Van die orige 1035 molekules neem 30 (2,8%) aan kompleksvorming deel en is al 30 molekules by enkel proteïenbindings betrokke. 'n Voorbeeld van so 'n enkel kompleks word in Figuur 8.51 gegee. Die frekwensie van kompleksvorming is selfs minder as die van pSP65, wat 'n duidelike aanduiding is dat geen spesifieke Ap1-binding voorkom nie.

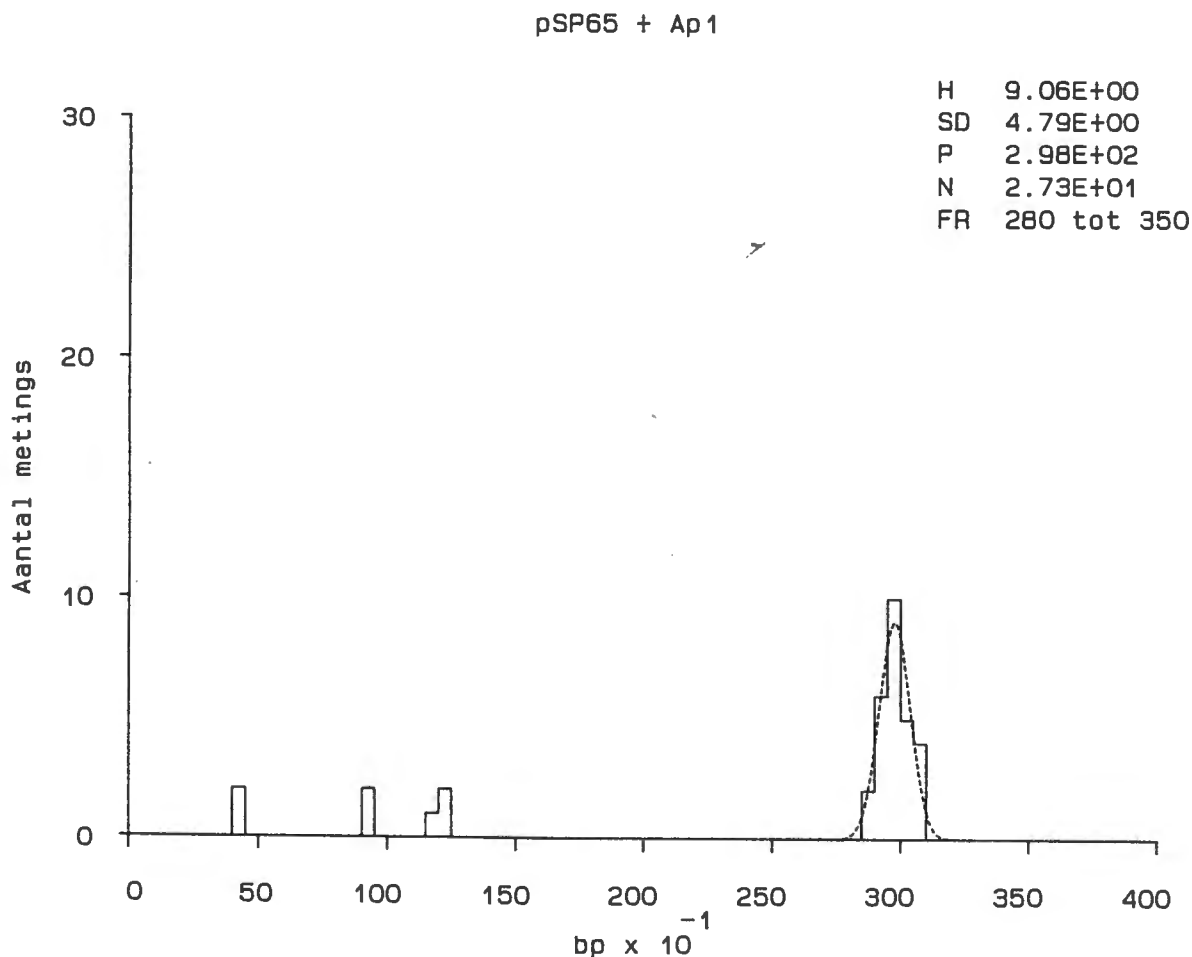
Elektronmikroskopiese analise van plasmied pHS-int1 met Ap1 is uitgevoer en die histogram van die kontoerlengtemetings is in Figuur 8.52 aangetoon. Soos uit die histogram en die lyndiagram waargeneem kan word, kom net een bindingsgebied vir Ap1 in die kollageenfragment gedeelte (Sma I - Sma I-fragment) voor (Afdeling 4.3.1 en Hoofstuk 7). Hierdie voorkeurbindingsgebied stem ooreen met die Ap1-bindingsgebied wat reeds met DNase I-afskermingsanalise geïdentifiseer is. Ander voorkeurbindingsgebiede wat aangetref word, kom ooreen met bindingsgebiede in die pSP64/65-volgorde. Die totale lengte van die molekule soos bepaal uit die histogram, is 4020 bp $\pm$ 48, wat ooreenstem met die werklike grootte van 4024 bp. Frekwensiebepaling van kompleksvorming toon dat 9 van die 1017 molekules nie analiseerbaar is nie. Ongeveer 57 molekules (5,6%) van die orige 1008 molekules is by kompleksvorming betrokke. Van hierdie 57 molekules vorm 33 (58%) slegs enkel proteïenkomplekse, terwyl 24 (42%) by lusvorming betrokke is. 'n Voorbeeld van so 'n lusvorming word in Figuur 8.53 gegee.

Alvorens die plasmied met die 5 kb Bam HI-kollageenfragment, pGEM-BB5(A) elektronmikroskopies geanaliseer is, is die kontroleplasmied pGEM-11zf(+) eers vir die teenwoordigheid van Ap1-binding ondersoek. Statistiese analise van 1010 molekules toon dat twee molekules (0,2%) nie analiseerbaar is nie, terwyl twaalf molekules (1,2%) van die orige 1008 molekules by kompleksvorming betrokke is. Al twaalf molekules is betrokke by enkel proteïenkomplekse, terwyl geen lusvorming waargeneem is nie. Twee of meer DNA-molekules wat aan dieselfde proteïenkompleks bind kom egter algemeen voor. Voorbeelde van so 'n genoemde bindingskompleks (paneel A) sowel as aggregaatvorming (paneel B) en DNA-molekules sonder enige proteïenkomplekse (paneel C), word in Figuur 8.54 gegee.

'n Histogram van die kontoerlengtemetings van die molekules word in Figuur 8.55 gegee. Uit die histogram kon met behulp van die Gaus-verspreidingskromme die totale lengte van die molekule as 3250 bp $\pm$ 49 bepaal word. Hierdie lengte kom goed met die werklike grootte van 3223 bp ooreen. Die lae frekwensie van kompleksvorming word ook in die histogram weerspieël.

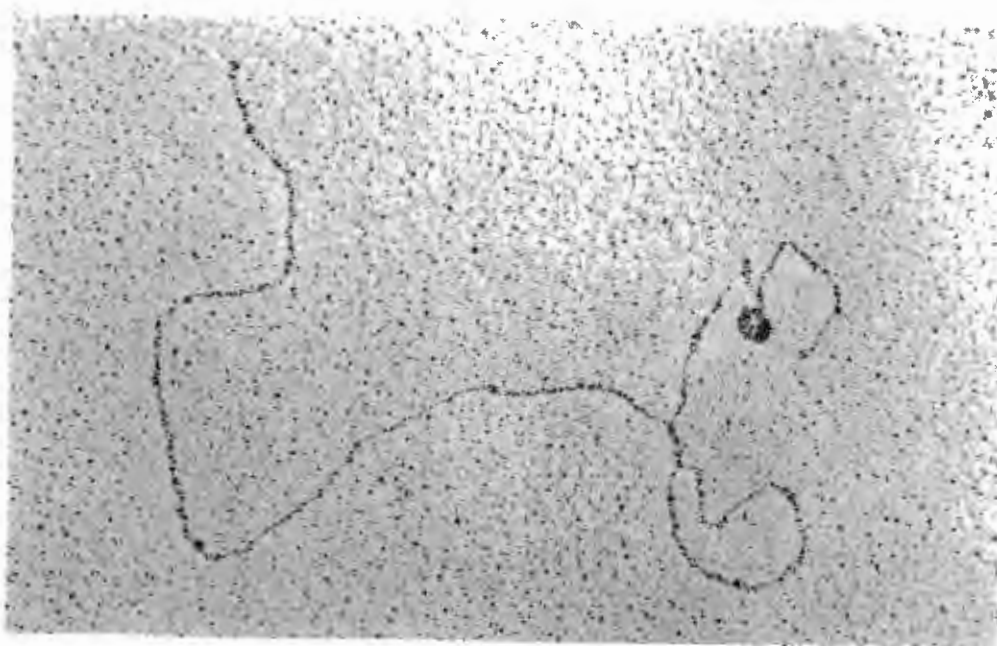


Figuur 8.49: Elektronmikroskopie van Ap1-pSP65 DNA-kompleksvorming.

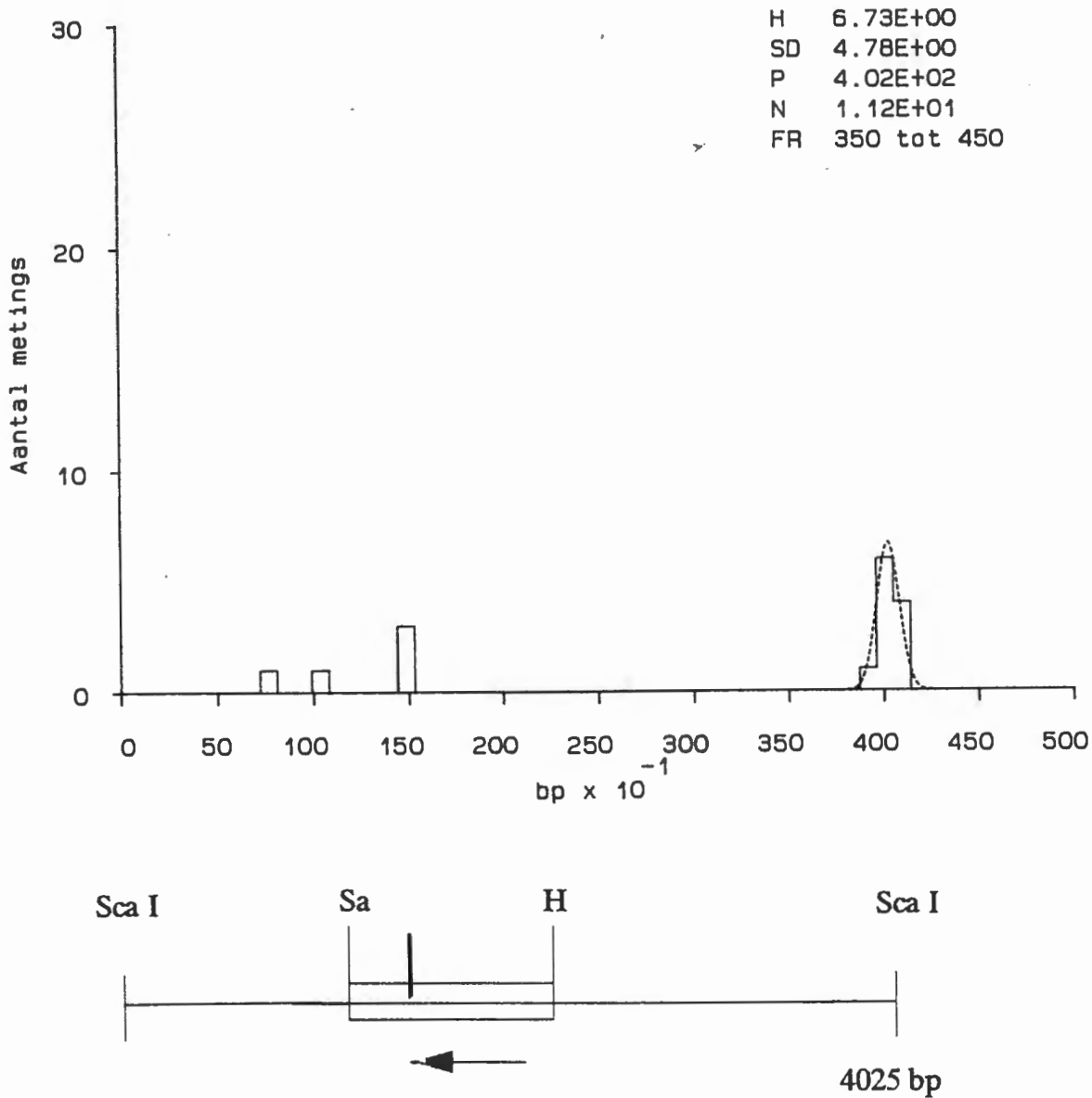


Figuur 8.50: Histogram van metings van die pSP65 DNA-molekules in die teenwoordigheid Ap1-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap1-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules.



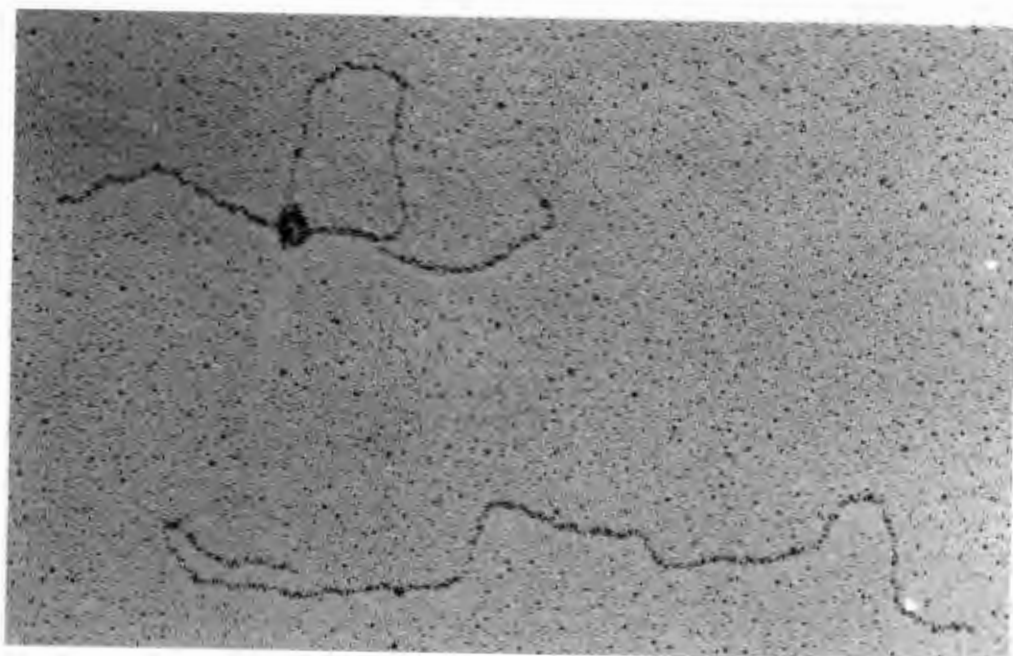
Figuur 8.51: Elektronmikroskopie van Ap1-pHS-ex1 DNA-kompleksvorming.



Figuur 8.52: Histogram van metings van die pHS-int1 DNA-molekules in die teenwoordigheid Ap1-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap1-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. Die lyndiagram toon die 1068 bp Sac I -Hind III-fragment met die Ap1-bindingspunt (|) soos verkry uit DNase I-afskermingsanalise van pSS-DNA, aan.

(Sa = Sac I; H = Hind III)



Figuur 8.53: Elektronmikroskopie van Ap1-pHS-int1 DNA-kompleksvorming.

Lusvorming van die DNA-molekule vind plaas as gevolg van die proteïen-proteïeninteraksie.

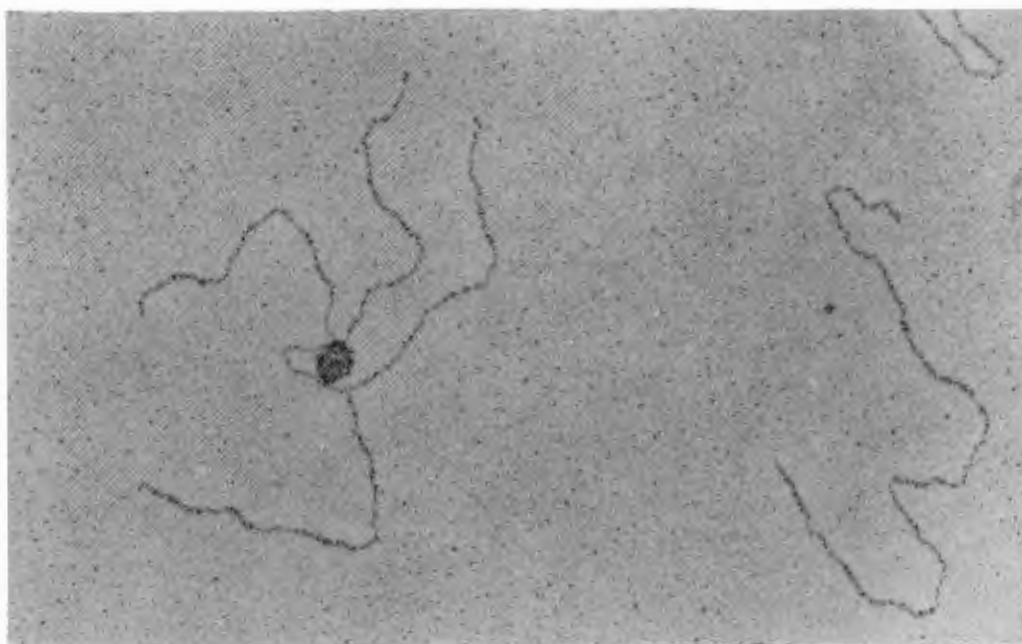
In 'n volgende eksperiment is die plasmied pGEM-BB5(A) geanaliseer. Frekwensiebepaling van kompleksvorming is op 1020 molekules uitgevoer. Van hierdie 1020 molekules is 12 molekules (1,2%) as gevolg van aggreëatvorming of verstrengeling nie analiseerbaar nie. Ongeveer 60 molekules (5,9%) van die orige 1008 is by kompleksvorming betrokke. Hiervan is 48 molekules (80%) betrokke by 'n enkel proteïenbindingskompleks, vorm twee molekules (3,3%) twee bindingskomplekse en 10 molekules (16,7%) vier afsonderlike proteïenkomplekse óf is betrokke by óf een óf twee lusvormings. 'n Voorbeeld van 'n molekule met meer as een proteïenkompleks word in Figuur 8.56 gegee.

'n Histogram van die kontoerlengtemetings van die verskillende molekules word in Figuur 8.57 gegee. Uit die verkrygte waardes is die totale lengte van die molekule as 8290 bp bepaal teenoor die werklike waarde van 8223 bp. Benewens agtergrond binding van Ap1 aan die pGEM-volgordes kom ten minste twee Ap1-voorkeurbindingsgebiede in die 5 kb Bam HI-fragment voor. Die eerste bindingsgebied kom ooreen met die Ap1-bindingspunt wat reeds in die Sma I - Sma I-fragment (Figuur 7.7) geïdentifiseer is, terwyl die tweede voorkeurbindingsgebied in 'n gedeelte van die kollageenfragment geleë is wat nie in hierdie studie aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp is nie. Rekenaaranalise van hierdie gebied se DNA-volgordes toon egter wel volgordes waaraan die Ap1 potensieel kan bind. Die Ap1-bindingsgebied soos verkry met DNase I-afskermingsanalise sowel as die potensiele Ap1-bindingsgebied word in die lyndiagram onder die histogram in Figuur 8.57 aangetoon ter vergelyking.

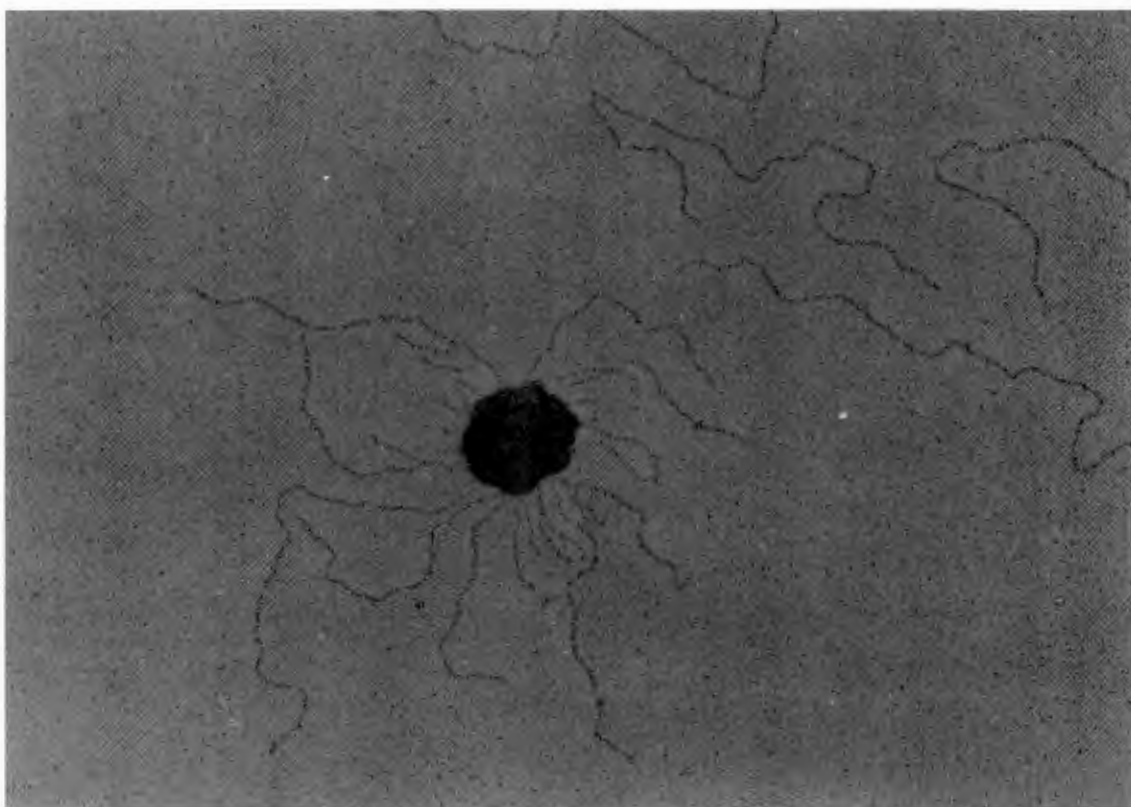
8.3.3.1 SAMEVATTING

'n Opsomming van die statistiese analise van DNA-Ap1-kompleksvorming met die verskillende fragmente word in Tabel 8.3 gegee. Benewens fragment pSS, toon die meeste van die fragmente 'n frekwensie van ongeveer 6% van kompleksvorming indien 'n Ap1-bindingsgebied teenwoordig is en 'n frekwensie van ongeveer 1-3% indien geen Ap1-bindingsgebiede in die volgordes teenwoordig is nie.

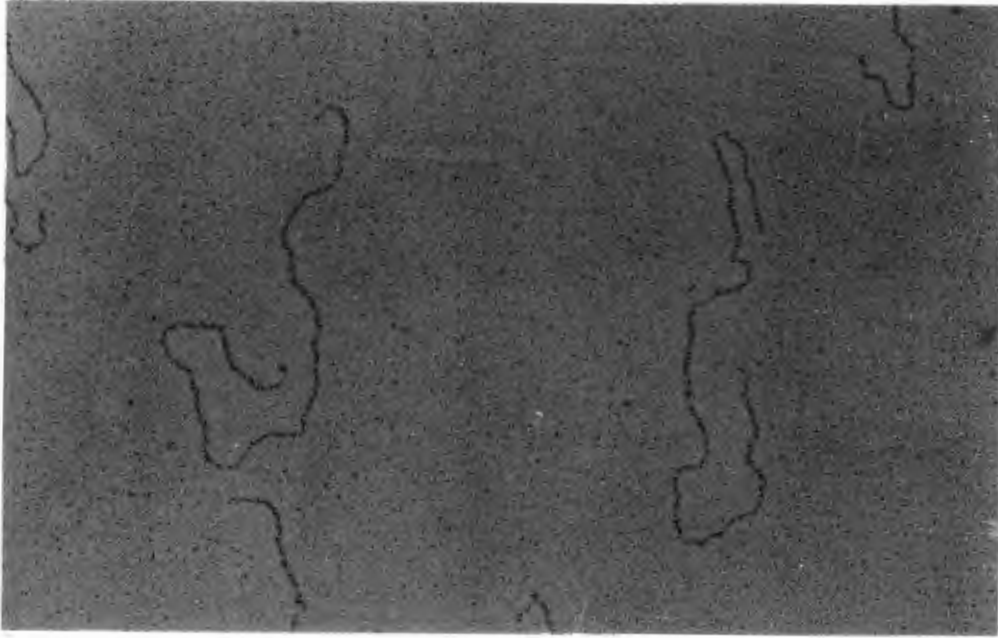
A



B

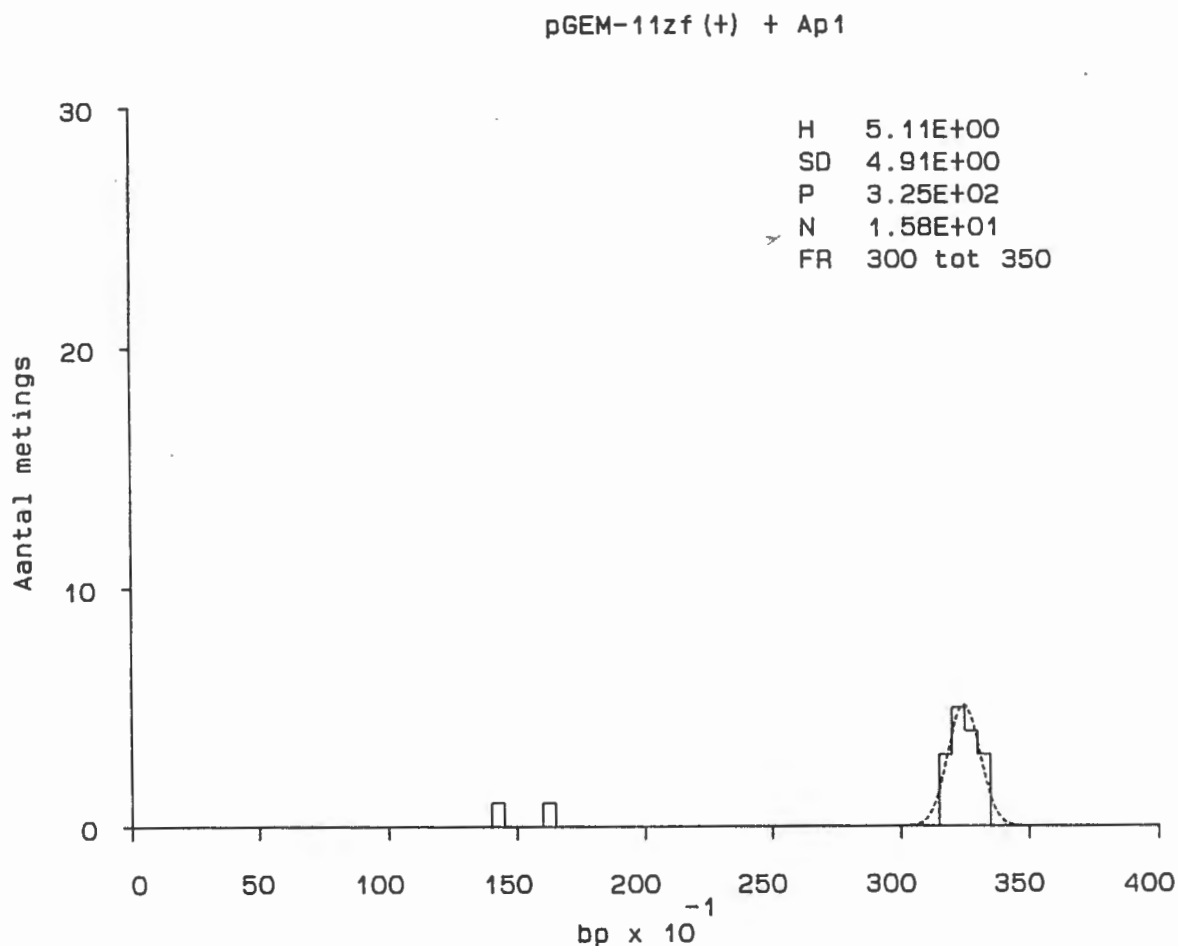


C



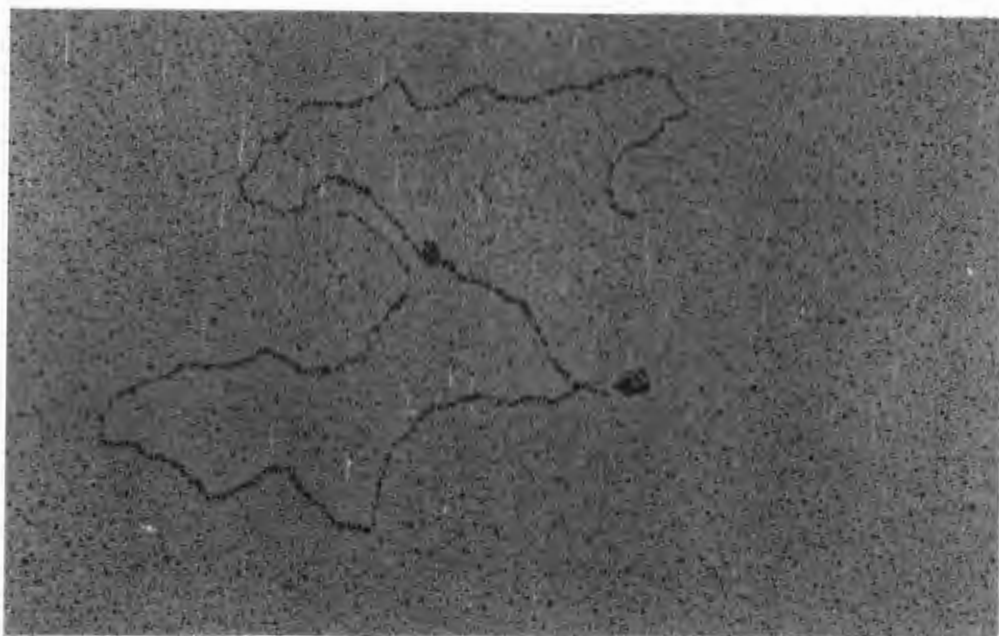
Figuur 8.54: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap1 en pGEM-11zf(+) DNA-molekules.

- A: Interaksie van twee verskillende DNA-molekules met dieselfde proteïene kompleks.
- B: Aggregaatvorming van Ap1-proteïene met verskeie DNA-molekules.
- C: DNA-molekule sonder proteïen gebonde.



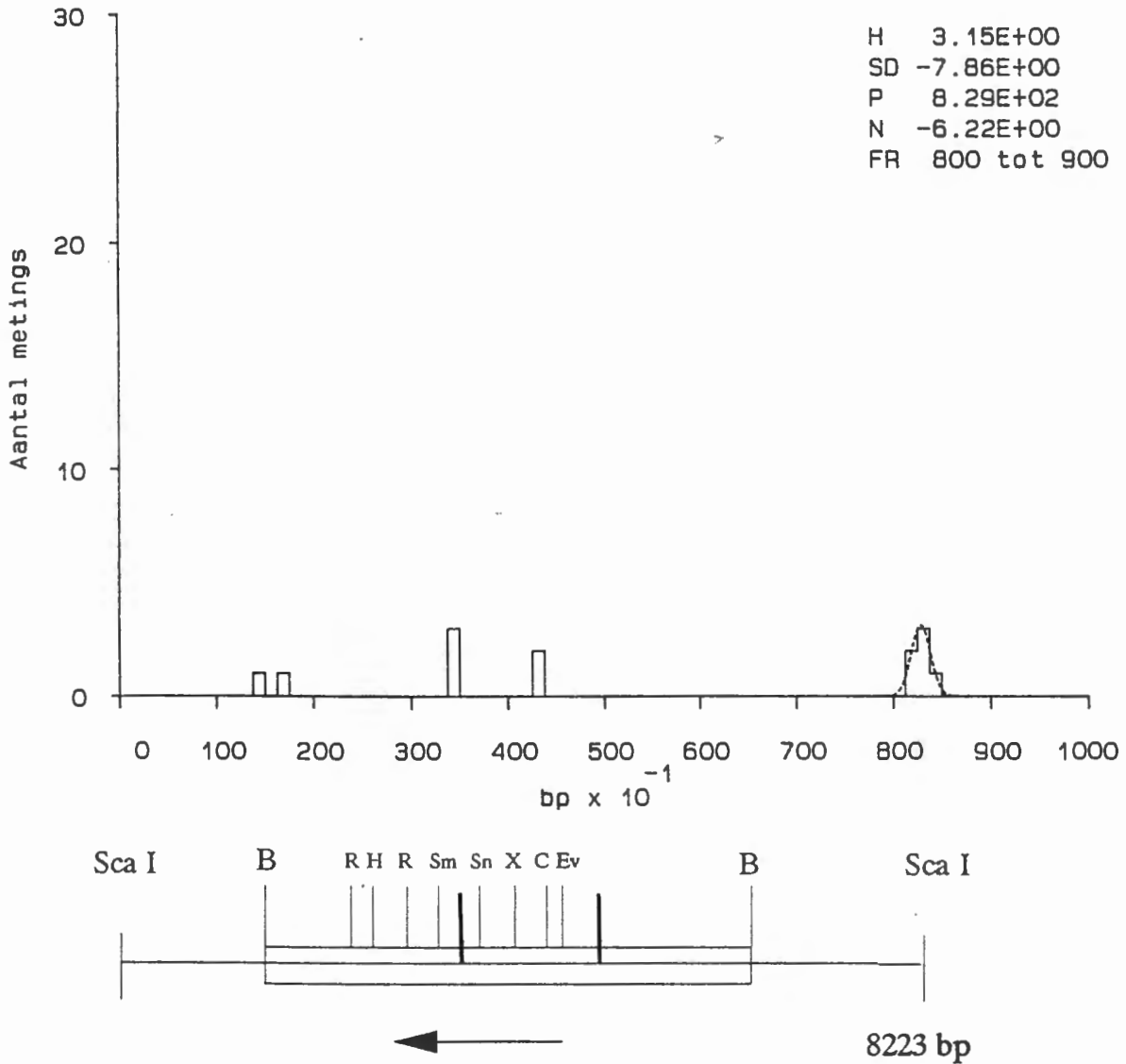
Figuur 8.55: Histogram van de metings van pGEM-11zf(+) DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap1-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap1-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules.



Figuur 8.56: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap1-proteïene en pGEM-BB5(A) DNA-molekules.

pGEM-BB5 (A) + Ap1



Figuur 8.57: Histogram van die metings van pGEM-BB5(A) DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap1-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap1-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. Die lyndiagram toon die 5 kb Bam HI-fragment met die Ap1-bindingspunte (|) aan.

(B = Bam HI; R = Rsa I; H = Hind III; Sm = Sma I; X = Xba I; C = Cla I; Ev = Eco RV)

Tabel 8.3 DNA-proteïenkompleksvorming met Ap1 en die kollageenfragmente

FRAGMENT	GETAL (EN PERSENTASIE) MOLEKULES WAARGENEEM					
	DNA-MOLEKULES SONDER KOMPLEKSE	DNA-MOLEKULES NIE ANALISEERBAAR	DNA-MOLEKULES MET KOMPLEKSE			
				EEN PROTEÏEN- KOMPLEKS	TWEE PROTEÏEN- KOMPLEKSE OF LUSVORMING	MEER AS TWEE PRO- TEÏENKOMPLEKSE OF LUSVORMING
pSP72	995 (99,5 %)	5 (0,5 %)	-	-	-	-
pSV40	950 (93,5 %)	7 (0,7 %)	59 (5,8 %)	55 (93 %)	4 (7 %)	-
pSP65	996 (98,3 %)	4 (0,4 %)	13 (1,3 %)	8 (61,5 %)	5 (38,5 %)	-
pSS	190 (18,8 %)	252 (25 %)	568 (56,2 %)	230 (40 %)	338 (60 %)	-
pHS-ex1	1005 (95,8 %)	15 (1,4 %)	30 (2,8 %)	30 (100 %)	0 (0 %)	-
pHS-int1	951 (93,5 %)	9 (0,9 %)	57 (5,6 %)	33 (58 %)	24 (42 %)	-
pGEM-11zf(+)	996 (98,6 %)	2 (0,2 %)	12 (1,2 %)	12 (100 %)	0 (0 %)	-
pGEM-BB5(A)	948 (92,9 %)	12 (1,2 %)	60 (5,9 %)	48 (80 %)	2 (3,3 %)	10 (16,7 %)

Die lae bindingsfrekwensie van <6% is as gevolg van die hoë affiniteit wat Ap1 vir die DNA en vir ander Ap1-proteïene met gevolglike aggregaatvormings. Die konsentrasie Ap1-proteïene moes daarom sodanig verlaag word om vir die hoë affiniteit te kompenseer. By fragmente waar 'n hoë affiniteit vir Ap1 voorkom, soos in die geval van die pSS-fragment, is daar steeds bykans 25% van die geanaliseerde molekules by aggregaatvorming betrokke. Hierteenoor is die waarneming ook dat lae affiniteits-Ap1-bindingspunte weinig proteïenbindingskomplekse vertoon.

8.3.4 ELEKTRONMIKROSKOPIESE ANALISE VAN KOLLAGEENFRAGMENTE MET SP1 EN AP2

'n Elektronmikroskopiese analise is uitgevoer op pGEM-BB5(A) en sy kontrole-pGEM-11zf(+) om te bepaal of daar enige interaksie tussen die Sp1 en Ap2-proteïene van verskillende reguleringsgebiede voorkom. Vir hierdie doel is die DNA gelyktydig met 1 μ l Sp1 en 0,5 μ l Ap2-proteïene geïnkubeer onder dieselfde eksperimentele kondisies as vir die analise met Sp1 en Ap2 afsonderlik. Hierdie analise is spesifiek op pGEM-BB5(A) uitgevoer, aangesien hierdie plasmied 'n 5 kb Bam HI-fragment van die mens-pro- α 1(I)-geen bevat, wat al die kollageenfragmente insluit wat in hierdie studie ondersoek is.

'n Histogram van die kontoerlengtemetings van pGEM-11zf(+) word in Figuur 8.58, paneel C weergegee. Die afsonderlike histogramme van pGEM-11zf(+) met Sp1 (paneel A) en Ap2 (paneel B) word ter wille van vergelyking ook weergegee. Uit 'n vergelyking tussen hierdie histogramme kan waargeneem word dat die hoof voorkeurbindingspieke hoofsaaklik aan Sp1-binding te wyte is. Die totale lengte van die molekule soos verkry uit die Gaus-verspreidingskromme is 3170 bp $\pm$ 96 teenoor die werklike waarde van 3223 bp. Hoewel lusvorming algemeen voorkom, is dit moeilik om te bepaal of hierdie lusvorming as gevolg van Sp1 of Ap2-selfassosiasie of as gevolg van Sp1 en Ap2-interaksie plaasvind, aangesien die Sp1 en Ap2-bindingsgebiede so naby aan mekaar geleë is en die Sp1 en Ap2-proteïene nie visueel

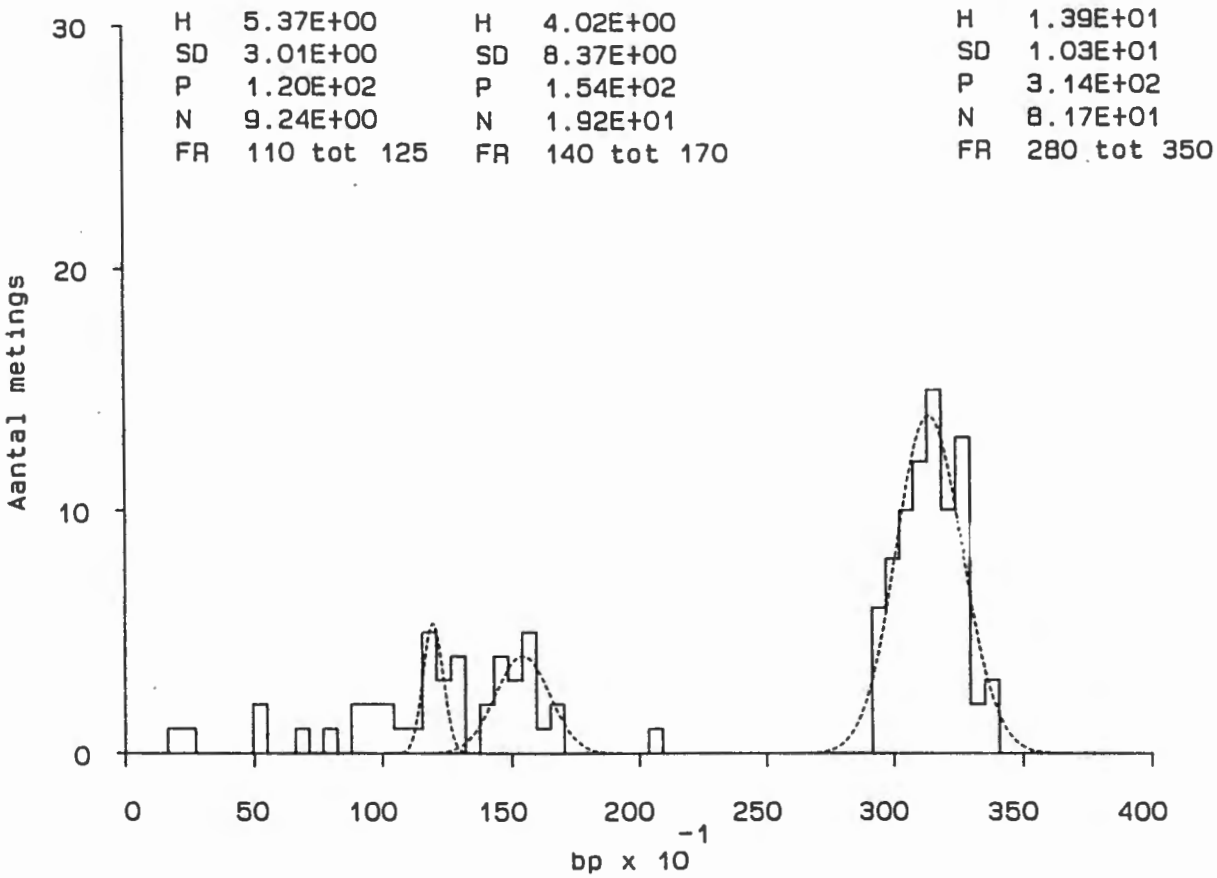
van mekaar onderskei kan word nie. 'n Moontlike wyse waarop hierdie onderskeid getref kan word is die gebruik van immuno-elektronmikroskopie.

Statistiese analise van 446 molekules toon dat ses molekules (1,3%) nie analiseerbaar is nie, terwyl 46 molekules (10,3%) by kompleksbinding betrokke is. Van hierdie 46 molekules vorm 16 (34,8%) enkel proteïenkomplekse en 30 (65,2%) twee proteïenkomplekse of is by lusvorming betrokke. Die frekwensie van lusvorming of teenwoordigheid van meer as een proteïenkompleks is dus heelwat hoër as die voorkoms van enkel proteïenbindings. 'n Voorbeeld van lusvorming en die voorkoms van twee proteïenkomplekse op dieselfde DNA-molekule word in Figuur 8.59 gegee.

Uit die elektronmikroskopiese analise van geselekteerde pGEM-BB5(A) DNA-molekules met Sp1 en Ap2 is na kontoerlengtemetings die histogram in Figuur 8.60 (paneel C) verkry. Die histogramme van pGEM-BB5(A) met Sp1 (paneel A) en Ap2 (paneel B) is weer ter vergelyking in Figuur 8.60 gegee. Uit die Gaus-verspreidingskromme in Figuur 8.60 (paneel C) is die totale lengte van die DNA-molekule bereken as $8400 \text{ bp} \pm 133$ in vergelyking met die werklike waarde van 8223 bp. 'n Groot aantal voorkeur bindingspieke is in hierdie histogram teenwoordig. Gaus-verspreidingskrommes is op 'n aantal uitgevoer en die volgende bindingsgebiede is daaruit verkry: Bindingspiek 1 is geleë rondom $1570 \text{ bp} \pm 40$; bindingspiek 2 is geleë rondom $2340 \text{ bp} \pm 22$; bindingspiek 3 is geleë rondom $2960 \text{ bp} \pm 14$; bindingspiek 4 is geleë rondom $3300 \text{ bp} \pm 16$ en bindingspiek 5 is geleë rondom $3890 \text{ bp} \pm 19$. 'n Vergelyking met die histogram van pGEM-BB5(A) DNA met Sp1 in paneel A van Figuur 8.60 toon dat drie bindingspieke een waarop 'n Gaus-verspreidingskromme uitgevoer is en die twee pieke weerskante daarvan, ooreenkom met bindingspieke 2 tot 4 van die histogram in paneel C. Hierdie ooreenkoms in bindingsgebiede is 'n aanduiding dat Sp1 veral in bindingspieke 3 en 4 en in 'n kleiner mate in bindingsgebied 2 van die pieke van pGEM-BB5(A), 'n bydrae tot binding aan die DNA lewer. Die twee pieke waarop 'n Gaus-verspreidingskromme in die histogram van pGEM-BB5(A) met Ap2, in paneel B van die figuur gedoen is, kom basies ooreen met bindingspieke 1 en 2 in die histogram in paneel C. Deur hierdie vergelyking kan dus gestel word dat in die histogram van pGEM-BB5(A) met Sp1 en Ap2 (paneel C),

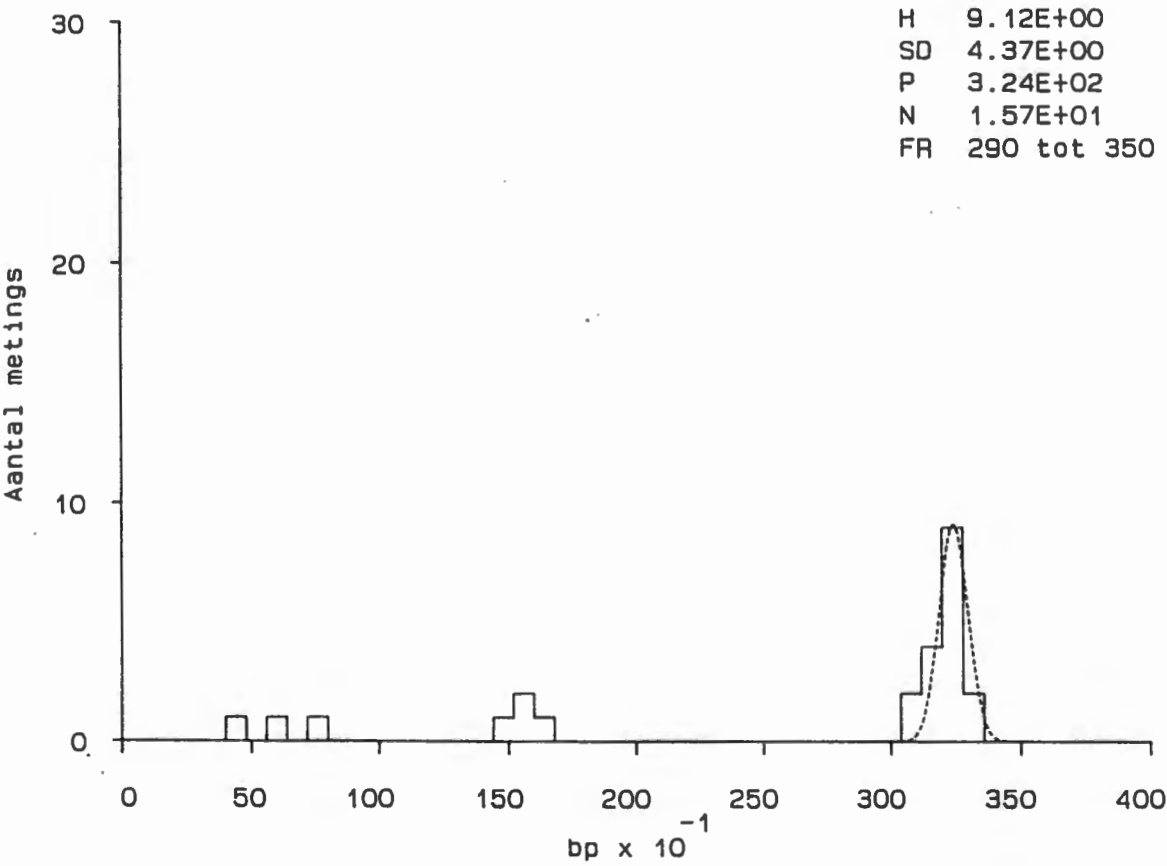
A

pGEM-11zf (+) + Sp1

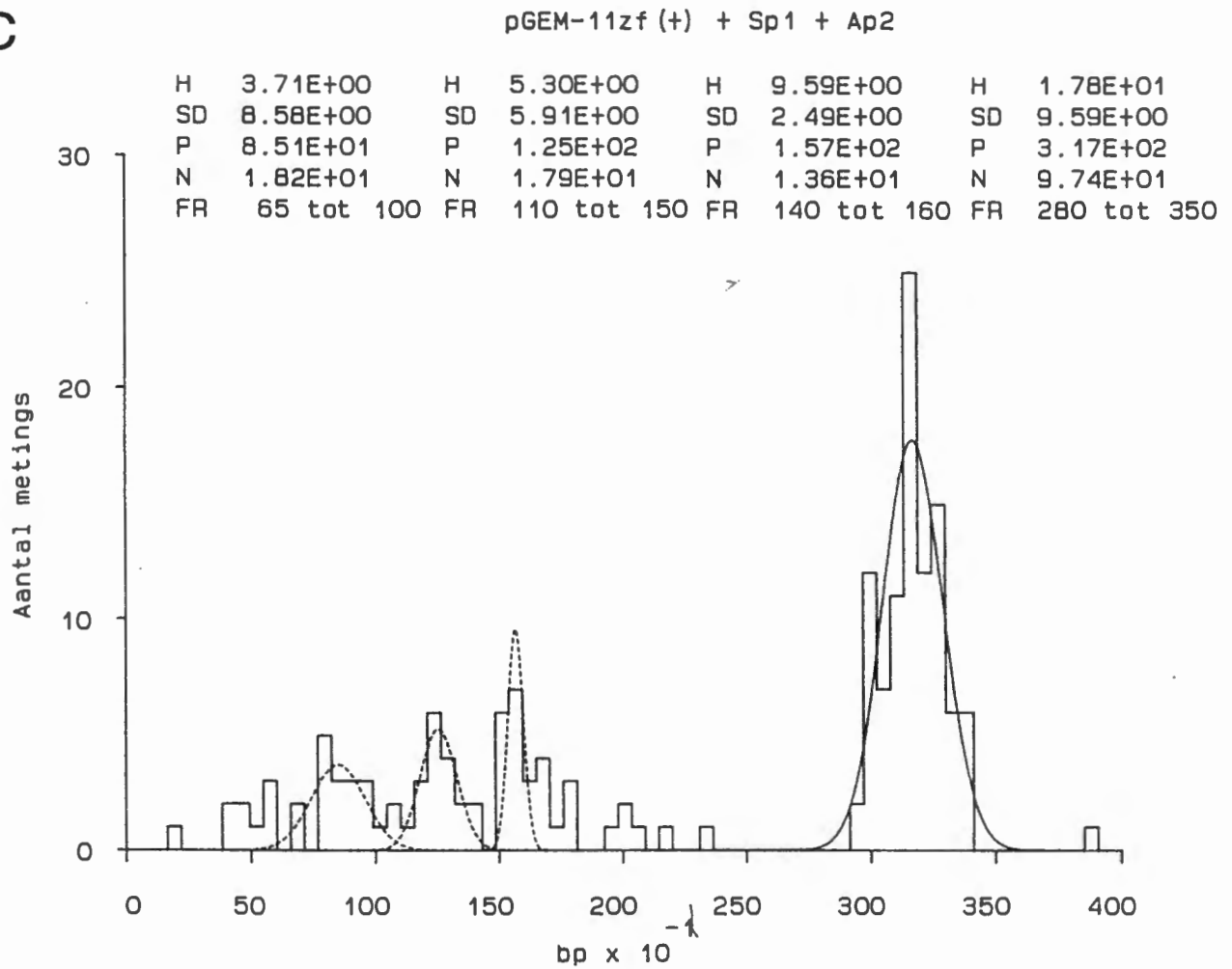


B

pGEM-11zf (+) + Ap2



C



Figuur 8.58: Histogramme van die metings van die pGEM-11zf(+) DNA-molekules in die teenwoordigheid van proteïene.

- A: Metings in die teenwoordigheid van Sp1.
- B: Metings in die teenwoordigheid van Ap2.
- C: Metings in die teenwoordigheid van Sp1 en Ap2.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Sp1 en Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules.



Figuur 8.59: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen beide Sp1 en Ap2 met pGEM-11zf(+) DNA-molekules.

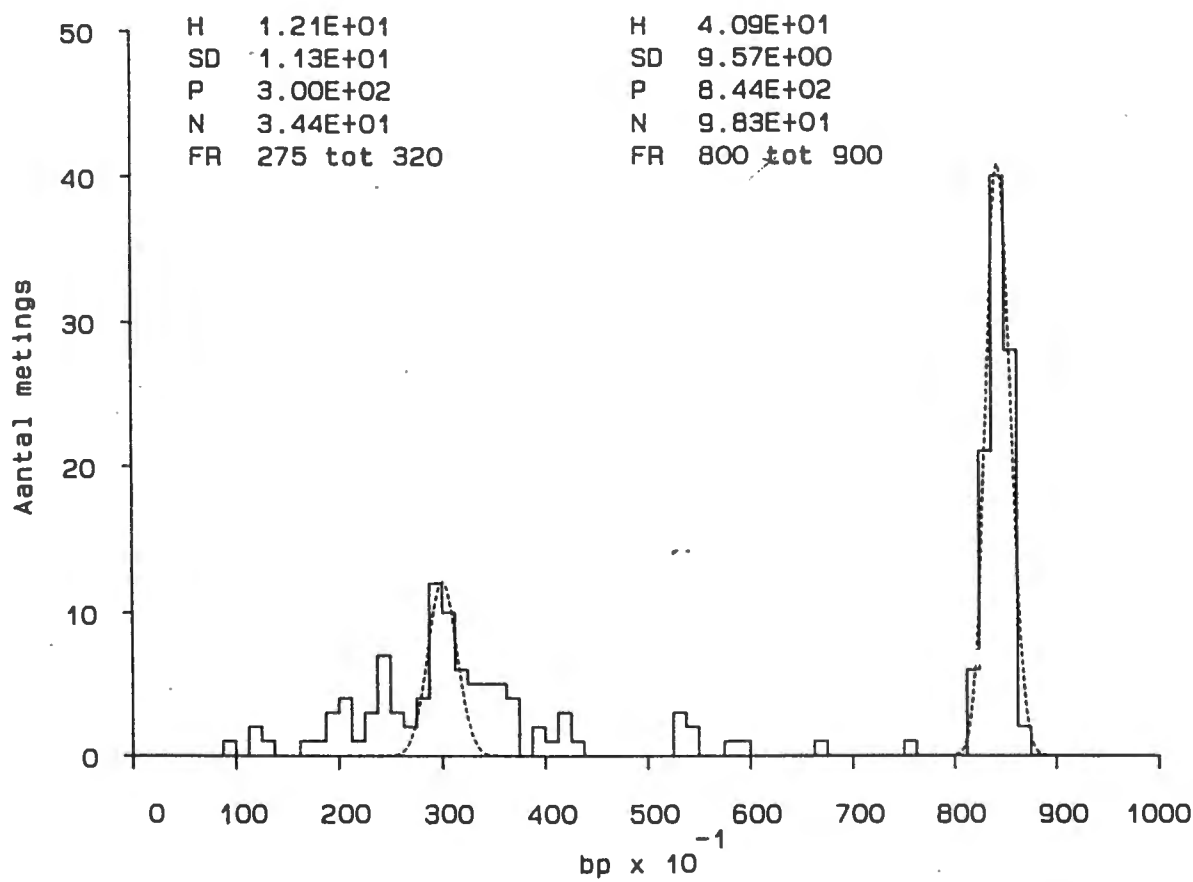
Lusvorming deur die DNA-molekule as gevolg van proteïen-proteïeninteraksie word waargeneem. Twee verskillende enkel proteïenkomplekse op dieselfde DNA-molekule kom ook voor.

bindingspiek 1 hoofsaaklik Ap2-binding verteenwoordig, bindingspiek 2 Sp1- en Ap2-binding verteenwoordig en bindingspieke 3 en 4 hoofsaaklik Sp1-binding verteenwoordig. Interaksie tussen spesifiek Sp1 en Ap2-proteïene kan egter nie uit die histogram afgelei word nie. Vir hierdie doeleindes is die fotografiese afdrucke van die geselekteerde molekules individueel ondersoek. Uit hierdie analise is waargeneem dat lusvorming veral plaasvind tussen bindingspunte in die gebied opstroom van die promotor met gebiede in die tweede intron. Hierdie gebiede lê buite die ondersoekveld van hierdie studie. 'n Aantal lusvormings is egter ook waargeneem tussen die HR295-fragment en die XS-fragment sowel as tussen die Sma I - Rsa I-fragment en die XS-fragment. Of hierdie lusvorming egter as gevolg van Sp1/Ap2-interaksie is of as gevolg van Sp1 of Ap2-selfassosiasie, is nie onderskeibaar nie, aangesien Sp1 en Ap2 nie onder die elektronmikroskoop onderskei kon word nie, tensy van immuno-elektronmikroskopie gebruik gemaak word. Voorbeelde van lusvorming wat waargeneem is, word in Figuur 8.61 paneel A en paneel B gegee. In paneel C van die figuur word 'n voorbeeld van twee bindingskomplekse sonder proteïeninteraksie gegee.

Statistiese analise van 403 molekules toon dat twee molekules (0,5%) nie analiseerbaar is nie, terwyl 154 molekules (38,2%) by kompleksvorming betrokke is. Van hierdie 154 molekules is 33 molekules (21,4%) by enkel proteïenkomplekse, ongeveer 93 molekules (60,4%) by twee proteïenkomplekse of lusvorming en 28 molekules (18,2%) betrokke by meer as twee proteïenkomplekse of lusvorming. 'n Opsomming van die statistiese analyses word in Tabel 8.4 gegee.

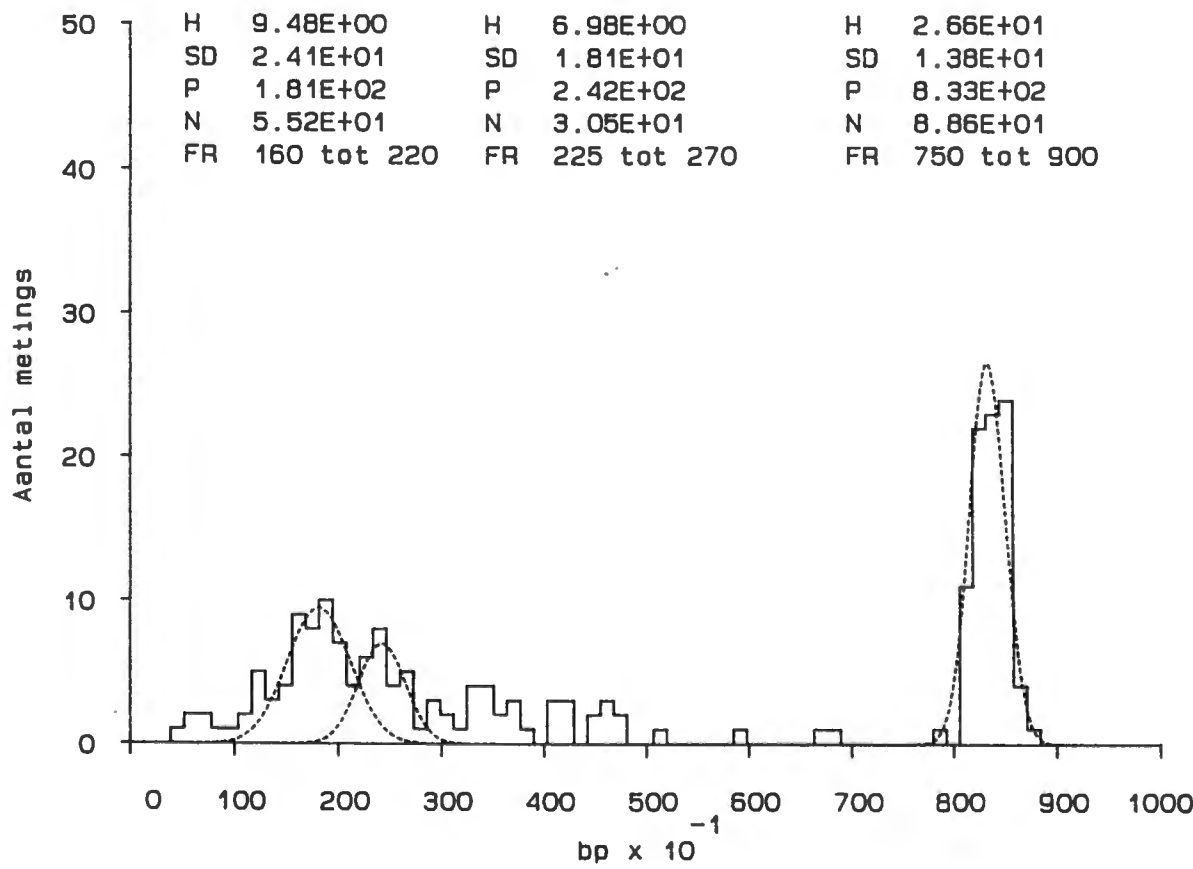
pGEM-BB5 (A) + Sp1

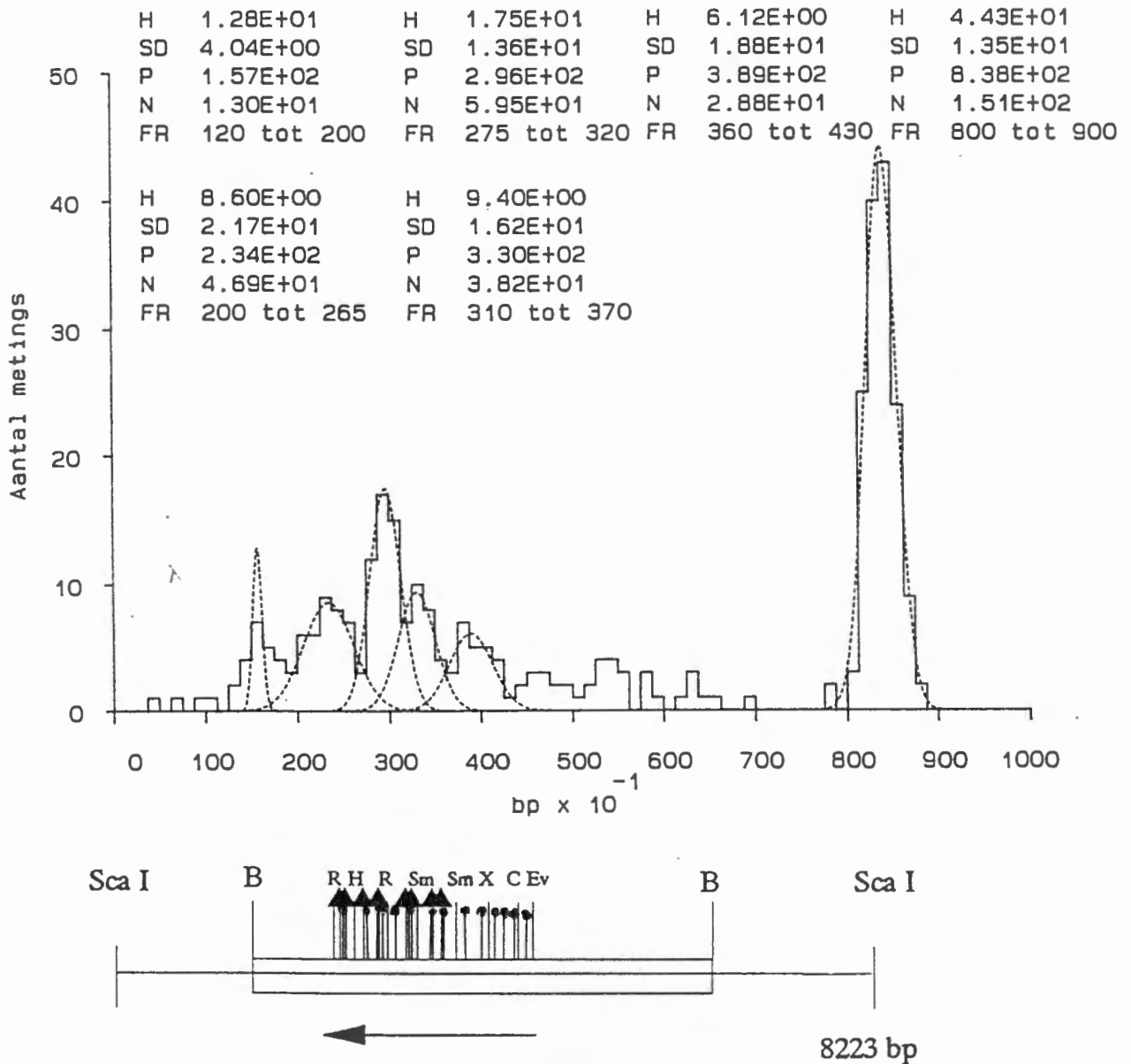
A



pGEM-BB5 (A) + Ap2

B



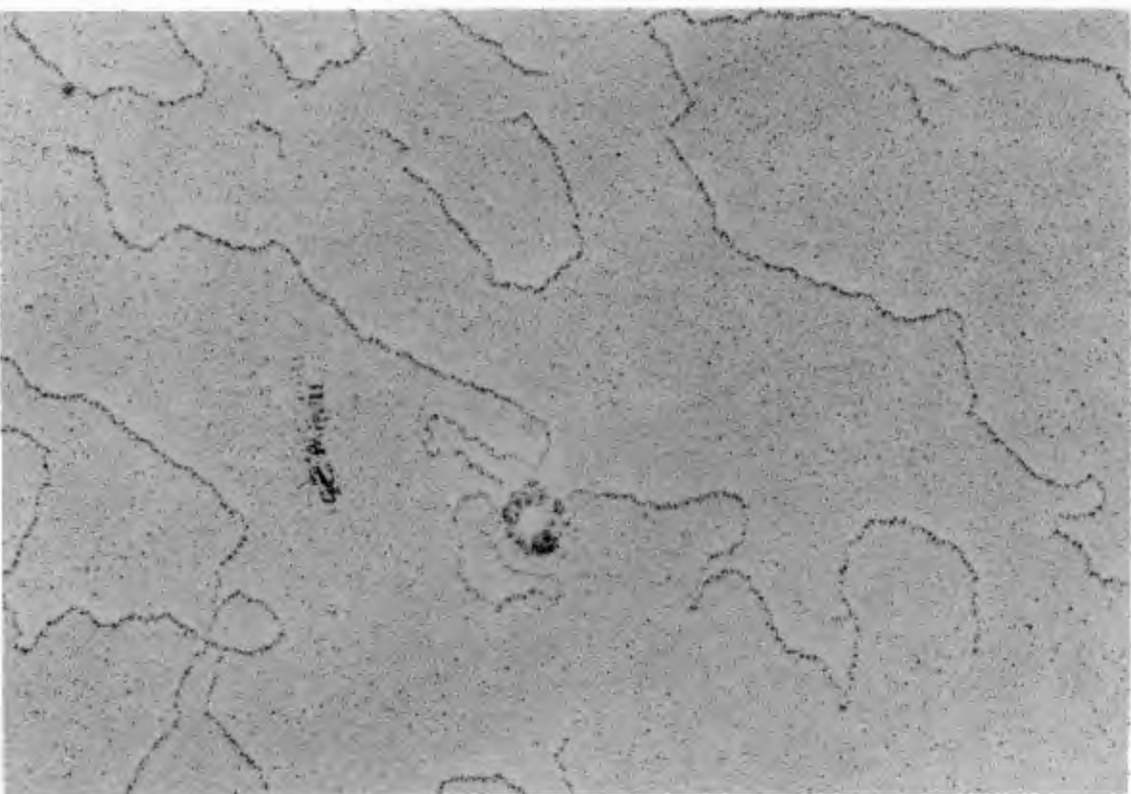


Figuur 8.60: Histogramme van die metings van die pGEM-BB5(A) DNA-molekules in die teenwoordigheid van proteïene.

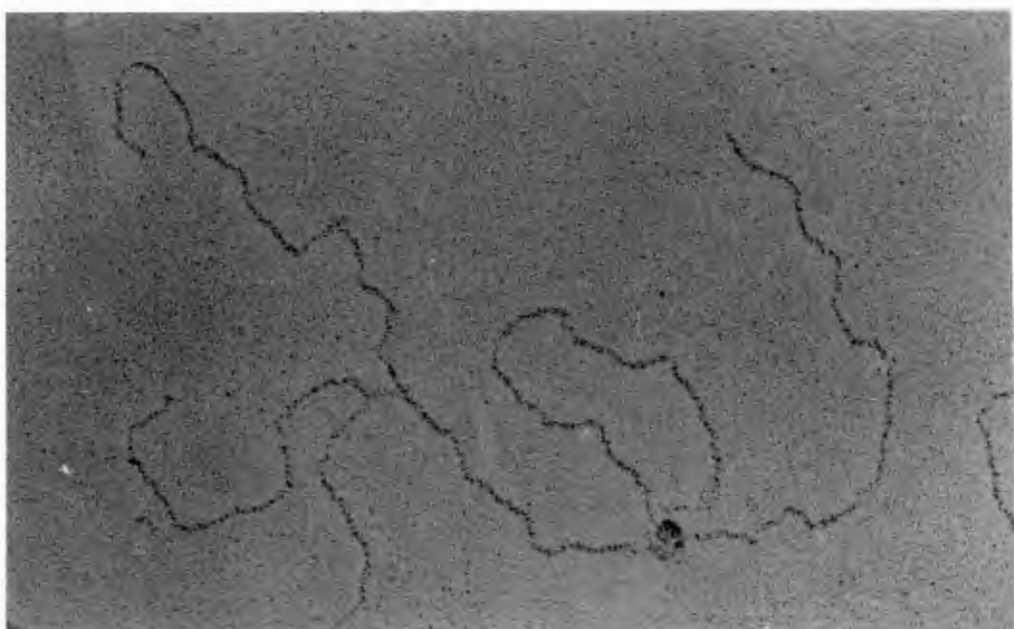
- A: Metings in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene.
- B: Metings in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene.
- C: Metings in die teenwoordigheid van beide Sp1- en Ap2-proteïene.

Die lyndiagram onder die histogram van paneel C toon die 5 kb Bam HI-fragment met Sp1(†) en Ap2(†)-bindingsgebiede aan soos verkry uit die verskeie DNase I-afskermingsanalises.

(B = Bam HI; R = Rsa I; H = Hind III; Sm = Sma I; X = Xba I; C = Cla I; Ev = Eco RV)

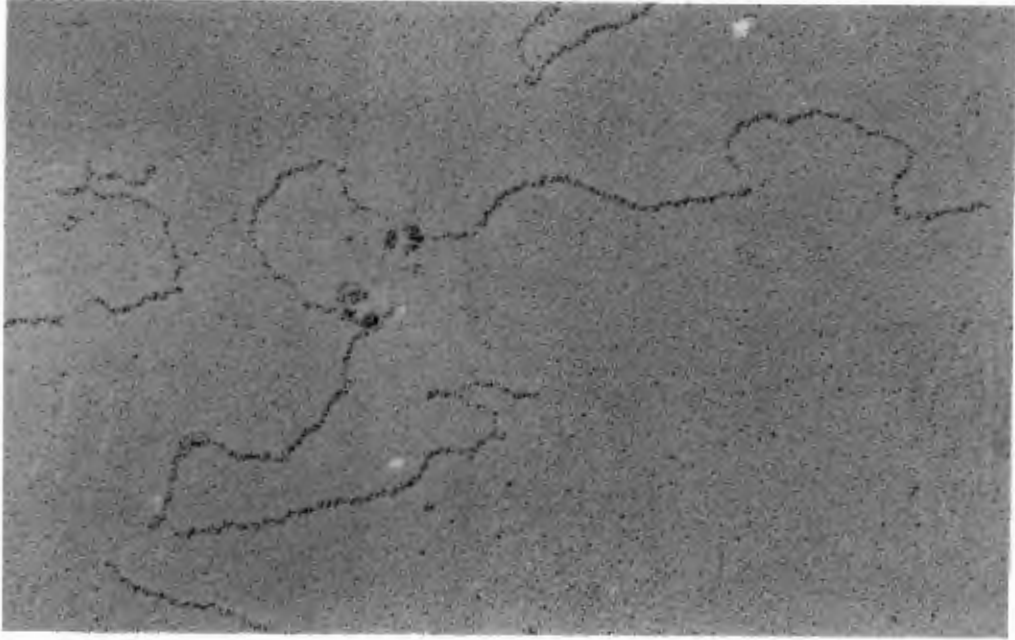


B



A

C



Figuur 8.61: Elektronmikroskopie van DNA-kompleksvorming tussen Sp1 en Ap2 proteïene met pGEM-BB5(A) DNA-molekules.

- A: Lusvorming deur die DNA-molekule as gevolg van proteïen-proteïen-interaksie.
- B: Verskeie proteïen-proteïeninteraksies met gevolglike lusvorming deur die DNA-molekule.
- C: Proteïen kompleksvorming op DNA-molekule sonder proteïen-proteïeninteraksies.

Tabel 8.4 DNA-proteïenkompleksvorming met Sp1 en Ap2 en die kollageenfragment pGEM-BB5(A)

FRAGMENT	GETAL (EN PERSENTASIE) MOLEKULES WAARGENEEM					
	DNA-MOLEKULES SONDER KOMPLEKSE	DNA-MOLEKULES NIE ANALISEERBAAR	DNA-MOLEKULES MET KOMPLEKSE			
				EEN PROTEÏEN- KOMPLEKS	TWEE PROTEÏEN- KOMPLEKSE OF LUSVORMING	MEER AS TWEE PRO- TEÏENKOMPLEKSE OF LUSVORMING
pGEM-11zf(+)	394 (88,4%)	6 (1,3%)	46 (10,3%)	16 (34,8%)	30 (65,2%)	-
pGEM-BB5(A)	247 (61,3%)	2 (0,5%)	154 (38,2%)	33 (21,4%)	93 (60,4%)	28 (18,2%)

8.4 ELEKTRONMIKROSKOPIESE ANALISE VAN LANG KOLLAGEEN-FRAGMENTE

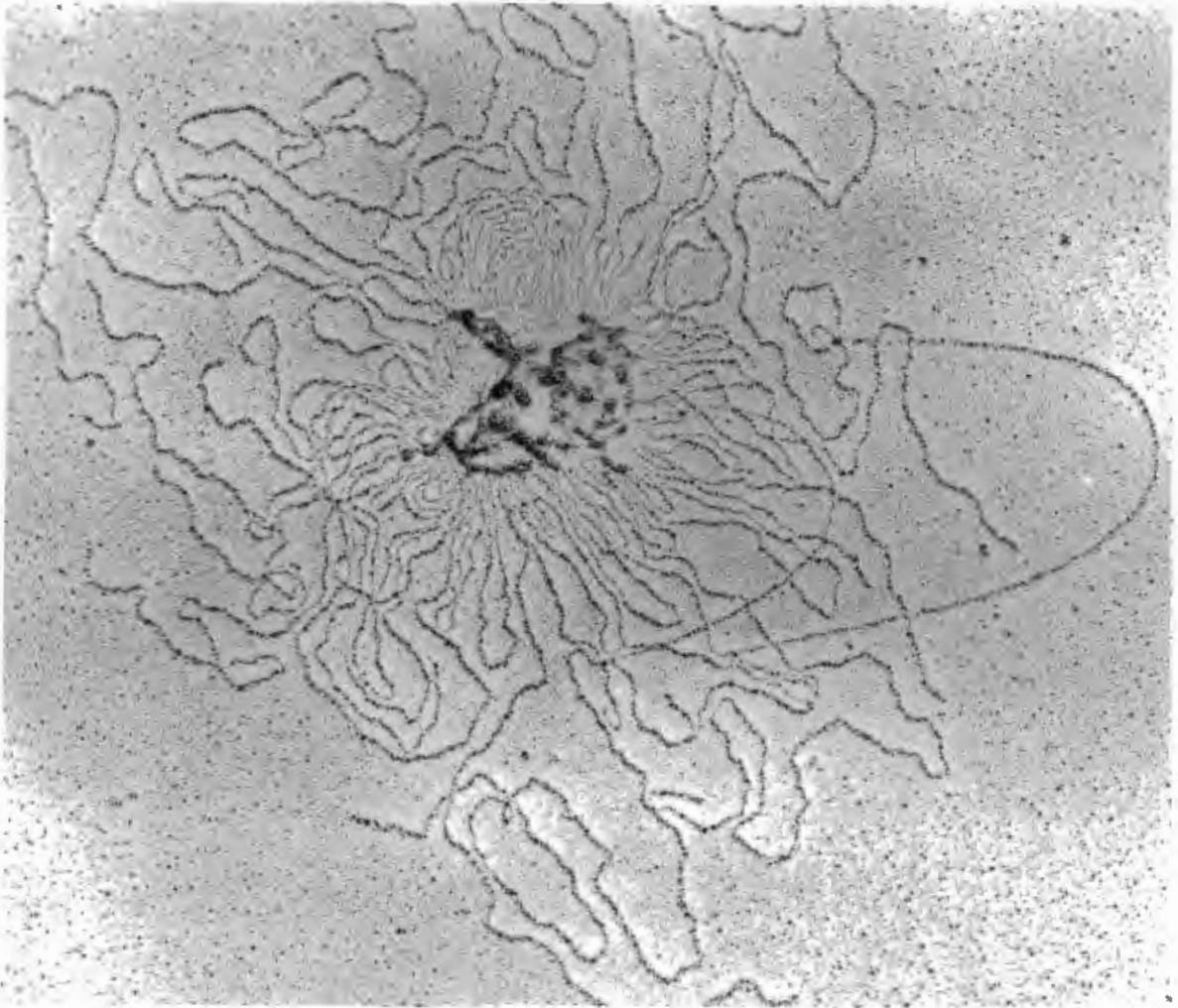
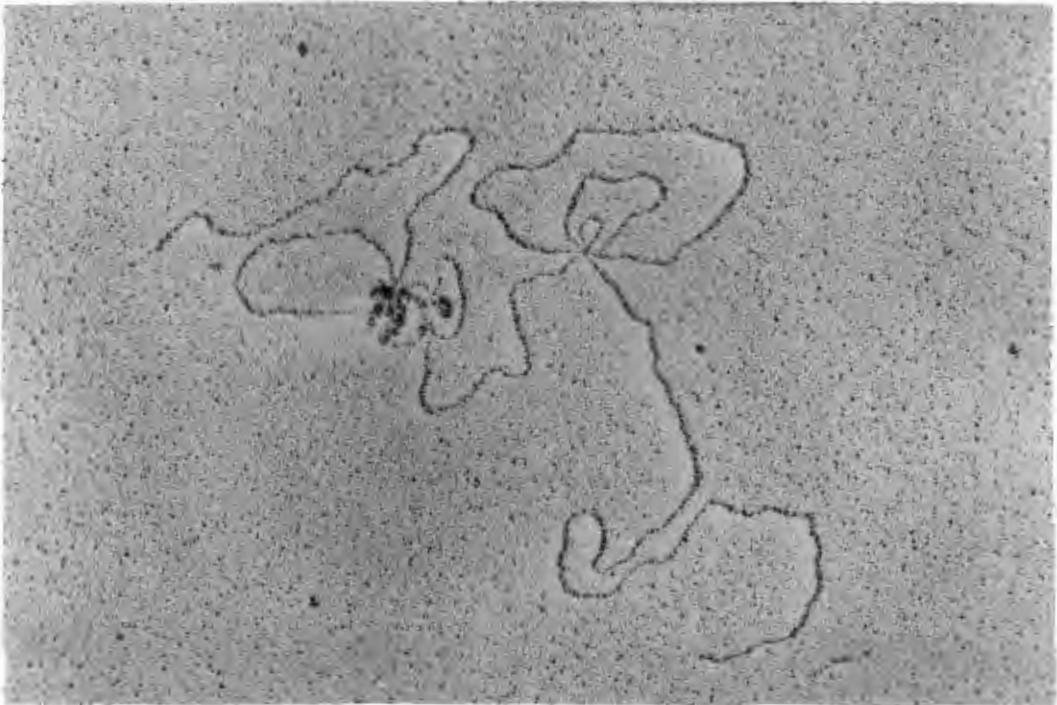
Na die sukses wat behaal is met die elektronmikroskopiese analyses van die DNA-fragmente kleiner as 10 kb, is besluit om die tegniek ook op DNA-fragmente groter as 10 kb te toets. Om te bepaal of elektronmikroskopiese analise 'n bydrae kan lewer tot die identifisering van proteïenbindingsgebiede op lang fragmente, is plasmiede met lengtes tussen 16 en 30 kb ondersoek.

Plasmied C129-10A en C129-10B (ontvang van Leena Ala-Kokko), is twee plasmiede van ongeveer 16 960 bp wat beskik oor 'n 14 kb kollageenfragment van die muis pro- $\alpha 1$ (I)-geen gekloneer in plasmied Bluescript (5 KT). Die kollageenfragment bevat 'n groot gedeelte van die 5'-stroom-op gebied asook volgordes tot die vyfde intron. Beide plasmiede beskik oor dieselfde kollageenfragment, buiten dat C129-10A invoeging in die kloksgewyse-oriëntasie en C129-10B-invoeging in die antikloksgewyse-oriëntasie het. Die plasmiede is altwee lineêr gemaak deur vertering met die restriksie-ensiem Pvu I. Dieselfde eksperimentele kondisies en proteïenkonsentrasies as vir die korter fragmente is vir hierdie eksperimente gebruik (Afdeling 8.3).

Analise van beide plasmiede met Sp1 toon 'n aantal probleme. In baie gevalle was die DNA gebreek. Dit kan te wyte wees aan 'n swak DNA-preparaat of as gevolg van die eksperimentele metode. Aangesien hierdie probleem egter nie voorheen waargeneem is nie, is dit waarskynlik aan 'n swak DNA-preparaat te wyte. 'n Volgende probleem wat voorgekom het, was aggregaatvorming tussen verskeie DNA-molekules en proteïene. Hierdie aggregaatvorming toon dus dat die Sp1-proteïene 'n hoë affiniteit vir hierdie DNA-fragment het, 'n aanduiding dat heelwat Sp1-bindingsgebiede in hierdie DNA voorkom. 'n Voorbeeld hiervan word in Figuur 8.62 (paneel A) gegee. 'n Derde probleem wat waargeneem is, is dat as gevolg van die lengte van die DNA-molekules, die DNA 'n neiging tot verstrengeling het wat die meting van die kontoerlengte van die DNA-molekules bemoeilik of dat tydens lusvorming, proteïeninteraksie sodanig plaasvind dat die posisie van die proteïenbindingskompleks moeilik bepaalbaar is. 'n Voorbeeld van laasgenoemde probleem met

proteïeninteraksie word in paneel B van Figuur 8.62 gegee. As gevolg van al bogenoemde probleme is dit baie moeilik om 'n histogram van die kontoermetings van hierdie DNA-molekules op te stel. In Figuur 8.63 word 'n histogram van C129-10A (paneel A) en C129-10B (paneel B) met Sp1 gegee. Die totale lengte van die molekule vir C129-10A is uit die histogram bepaal as ongeveer $16\,610\text{ bp} \pm 13$ en dié van C129-10B as $16\,400\text{ bp} \pm 74$ teenoor die werklike waarde van $16\,960\text{ bp}$. Hierdie verskil in lengtes kan eerstens toegeskryf word aan die feit dat hoe langer die molekules is, hoe groter is die foutgrens tydens kontoerlengtemeting en tweedens aan die swak kwaliteit van die gebruikte DNA-preparaat. Die voorkeurbinding van Sp1 aan hierdie molekules word op die lyndiagram onder die histogramme aangetoon. Hieruit kan waargeneem word dat Sp1 voorkeur binding veral in die 5'-stroom-op gebied en die eerste intron voorkom. Die resultaat kom goed ooreen met Sp1-binding in die ekwivalente mens DNA-gebied.

Dieselfde probleme as wat by binding met Sp1 aangetref is, is met binding van Ap2 aan hierdie DNA ondervind. Voorbeelde van aggreëatvorming en ook lusvorming tussen verskillende proteïene op dieselfde molekule word in Figuur 8.64 paneel A en paneel B gegee. Histogramme van die twee plasmiede se DNA-molekules met binding van Ap2 is baie bemoeilik deur die gebreke DNA wat dan ook in die histogramme weerspieël word. Die histogramme word in Figuur 8.65 onderskeidelik in paneel A en paneel B gegee. Die totale lengte van die molekule kon nie deur die Gaus-verspreidingskromme uit die histogram bepaal word nie, aangesien te min korrekte DNA-molekules beskikbaar was om 'n goeie bindingspiek daar te stel waarop die Gaus-berekening gedoen kon word. Uit die paar bindingsgebiede wat in die histogram voorkom, blyk dit egter dat beide DNA-fragmente se molekules 'n grootte van ongeveer $17\,000\text{ bp}$ het teenoor die werklike grootte van $16\,960\text{ bp}$. Ap2-voorkeur bindingsgebiede kom soos vir Sp1, hoofsaaklik in die 5'-stroom-op gebied en eerste intron voor. Die ooreenstemmende gebiede in die ekwivalente mens DNA toon ook heelwat Ap2-bindingsgebiede (Figuur 7.52).

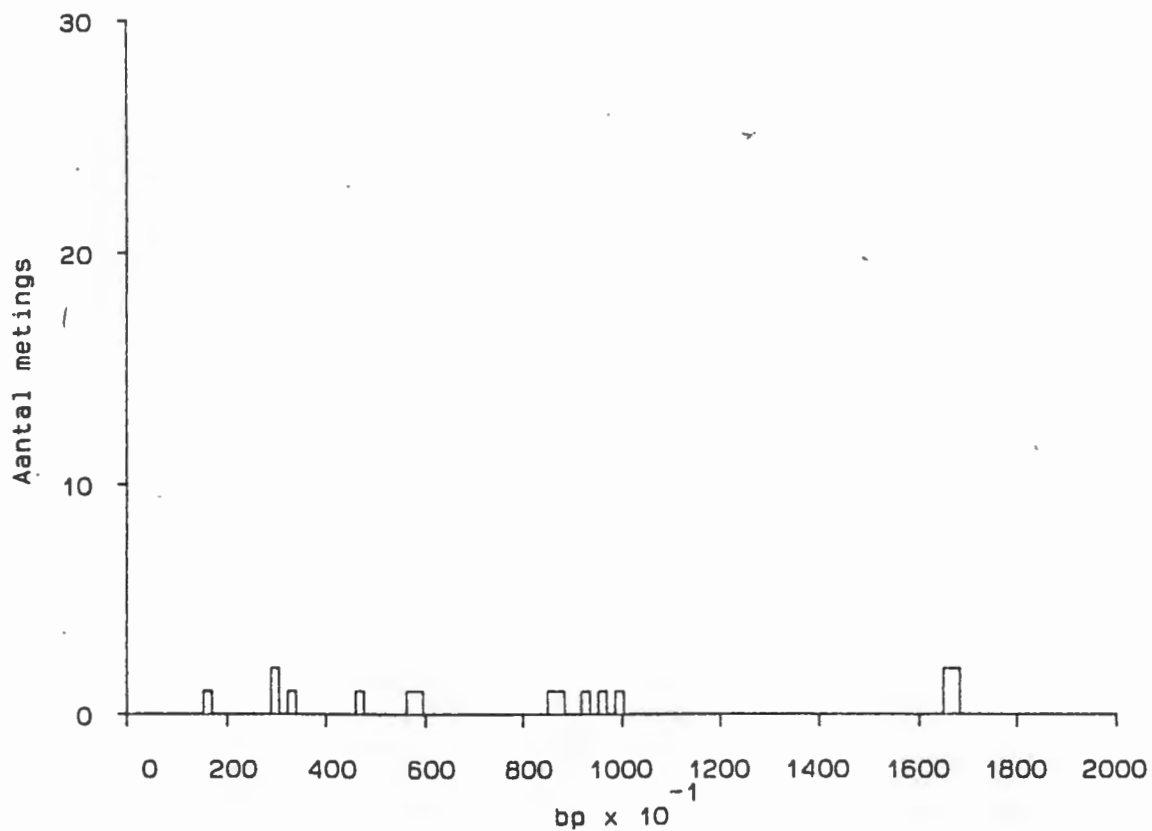
A**B**

Figuur 8.62: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Sp1-proteïene en die 16,9 kb C129-10B DNA-molekules.

- A: Aggregaatvorming tussen Sp1-proteïene en DNA-molekules.
B: Verstregeling van DNA-molekule as gevolg van lengte van DNA.

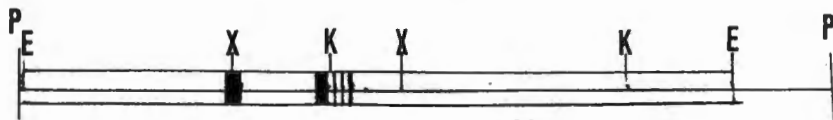
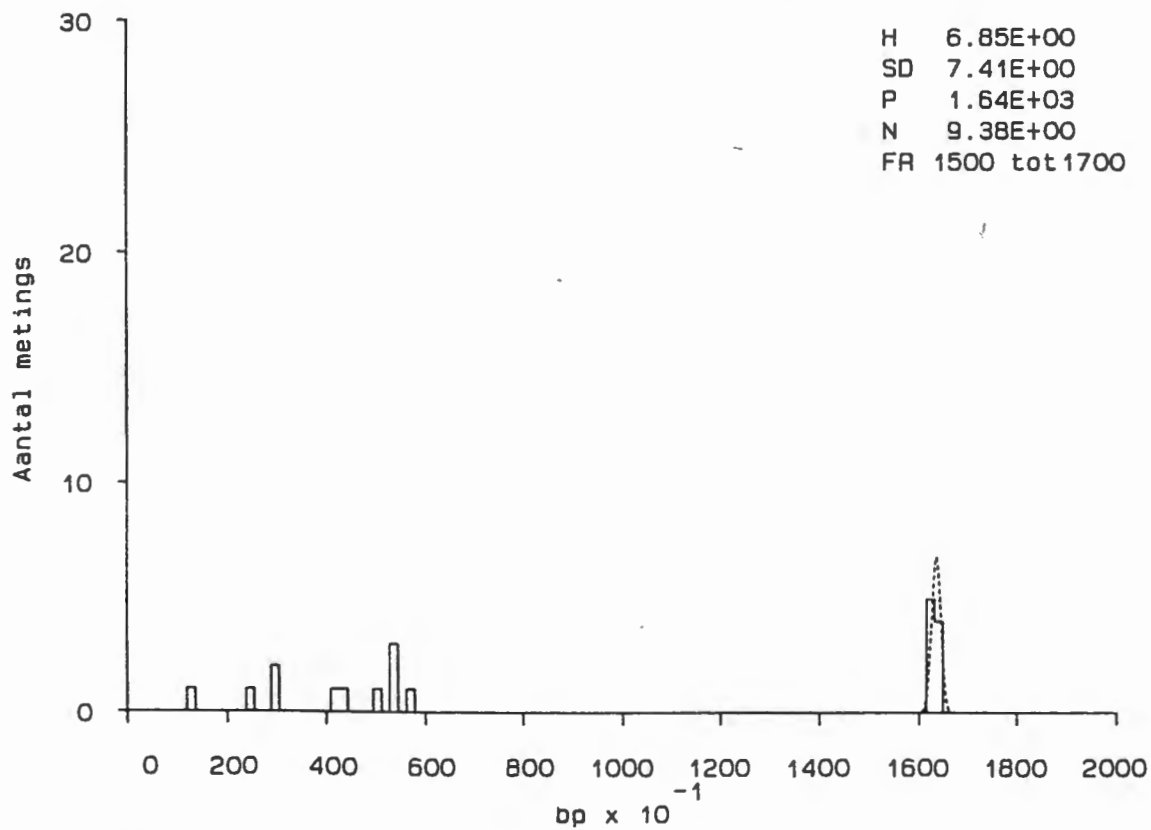
A

Muis Tipe I C129-10A + Sp1



B

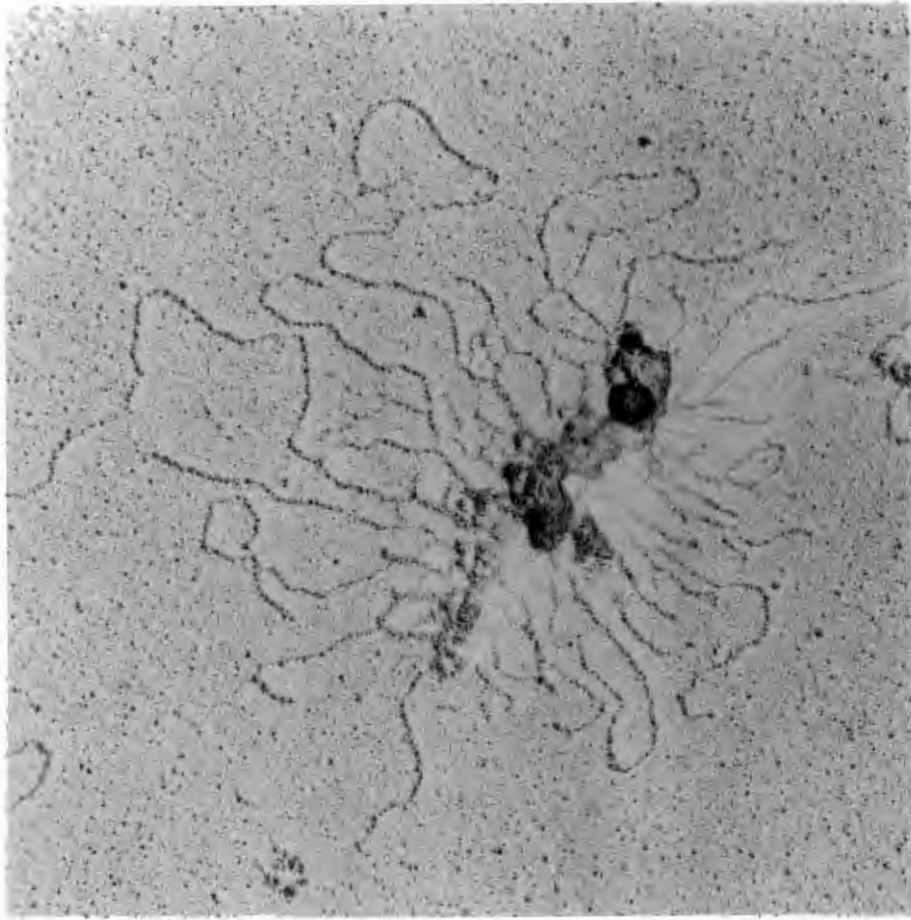
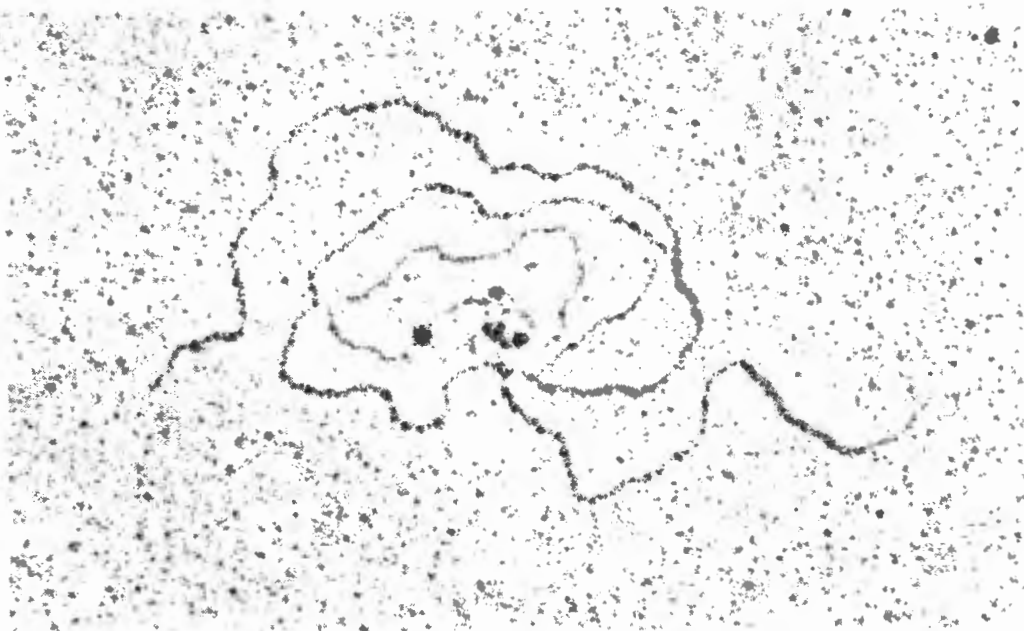
Muis Tipe I C129-10B + Sp1



Figuur 8.63: Histogram van die metings van die 16,9 kb C129-10A (paneel A) DNA-molekules met Sp1-proteïene en C129-10B (paneel B) DNA-molekules met Sp1-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Sp1-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. In die lyndiagram onder paneel B word die DNA-fragment met die vyf eksone aangetoon. Restriksie-ensieme wat aangetoon word, is:

P = Pvu I; X = Xba I; K = Kpn I; E = Eco RI

A**B**

Figuur 8.64: Elektronmikroskopie van Ap2-C129-10 DNA-kompleksvorming.

- A: Aggregaatvorming tussen Ap2-proteïene en DNA-molekules.
B: Proteïen-proteïeninteraksie met gevolglike lusvormings deur die DNA-molekule.

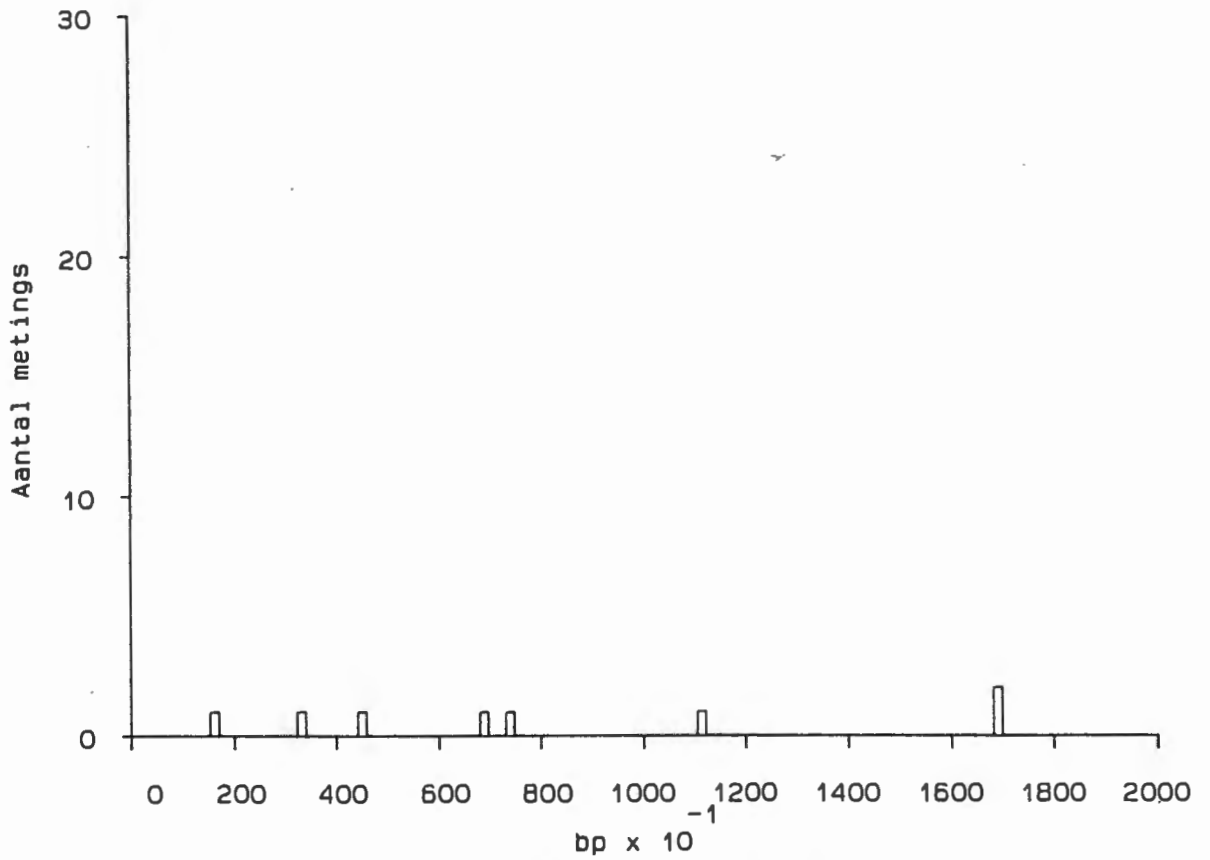
Vir die analise van C129-10A en C129-10B DNA met Ap1 was dit nie moontlik om histogramme op te stel nie. Ap1 het reeds by die korter fragmente getoon dat dit 'n geweldige hoë affiniteit vir ander Ap1-molekules en ook vir die DNA-molekules het. By hierdie DNA-molekules is dieselfde hoë affiniteit weer eens ondervind. Soos uit die voorbeelde in Figuur 8.66 waargeneem kan word, is dit nie moontlik om kontoerlengtemetings vanaf hierdie molekules te doen nie. Geen meetbare molekules waar die proteïen sodanig gebind het dat metings uitgevoer kan word, kon verkry word nie.

Frekwensiebepaling van kompleksvorming met Sp1 is op 200 molekules in plaas van 'n duisend gedoen. Te min molekules was beskikbaar om te tel, aangesien die meeste DNA-molekules betrokke was by aggregaatvorming. Veral by C129-10A was die teenwoordigheid van te veel gebreekte molekules 'n groot faktor. Geen frekwensiebepaling kon as gevolg van die genoemde redes op C129-10A DNA met Sp1 uitgevoer word nie. Uit die analise van 200 molekules van C129-10B is egter gevind dat 21 molekules (10,5%) as gevolg van verstrengeling en aggregaatvorming nie analiseerbaar was nie. Van die orige 179 molekules was 29 betrokke by kompleksvorming, dus 'n frekwensie van 14,5%. Ongeveer 14 molekules (48%) het een kompleks gevorm, terwyl 15 molekules (52%) twee of meer proteïenkomplekse of lusvorming vertoon het.

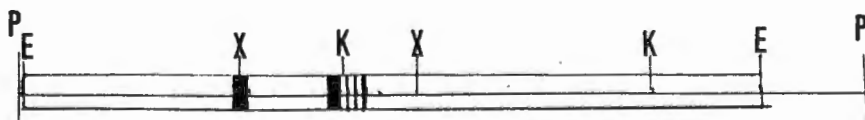
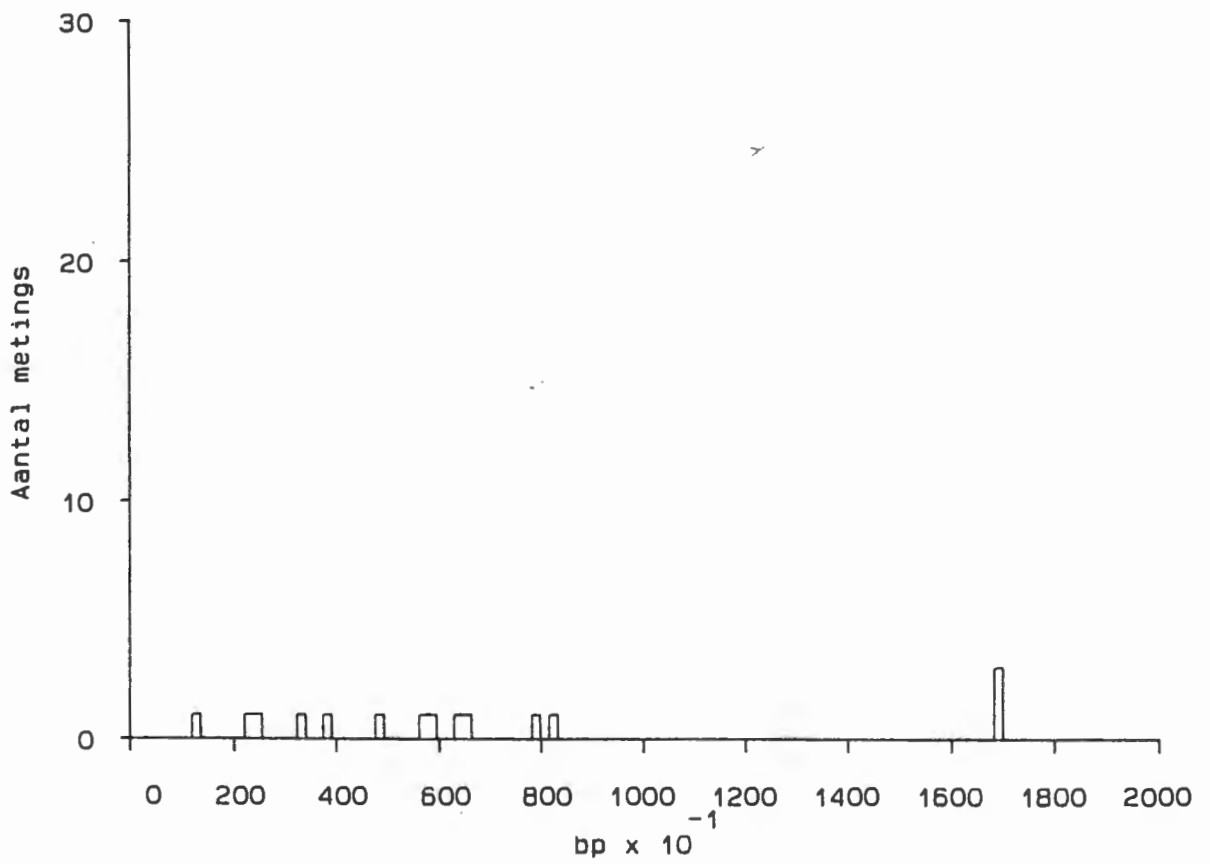
Frekwensiebepaling van kompleksvorming met Ap2 kon as gevolg van aggregaatvorming en te min telbare molekules, nie op C129-10A bereken word nie. Analise van 200 molekules van C129-10B toon egter dat 14 molekules (7%) nie analiseerbaar is nie. Ongeveer 143 molekules van die orige 186 is by kompleksvorming betrokke. Dit is 'n frekwensie van 71,5%. Van hierdie 143 molekules vorm 33 (23%) slegs enkel proteïenkomplekse, 38 (26,5%) vorm twee proteïenkomplekse of is betrokke by lusvorming en 72 molekules (50,5%) vorm meer as twee proteïenkomplekse of is by lusvorming betrokke.

Frekwensiebepaling van kompleksvorming met Ap1 was nie moontlik nie, aangesien die molekules wat nie gebreek was, nie by aggregaatvorming betrokke was.

Muis Tipe I C129-10A + Ap2



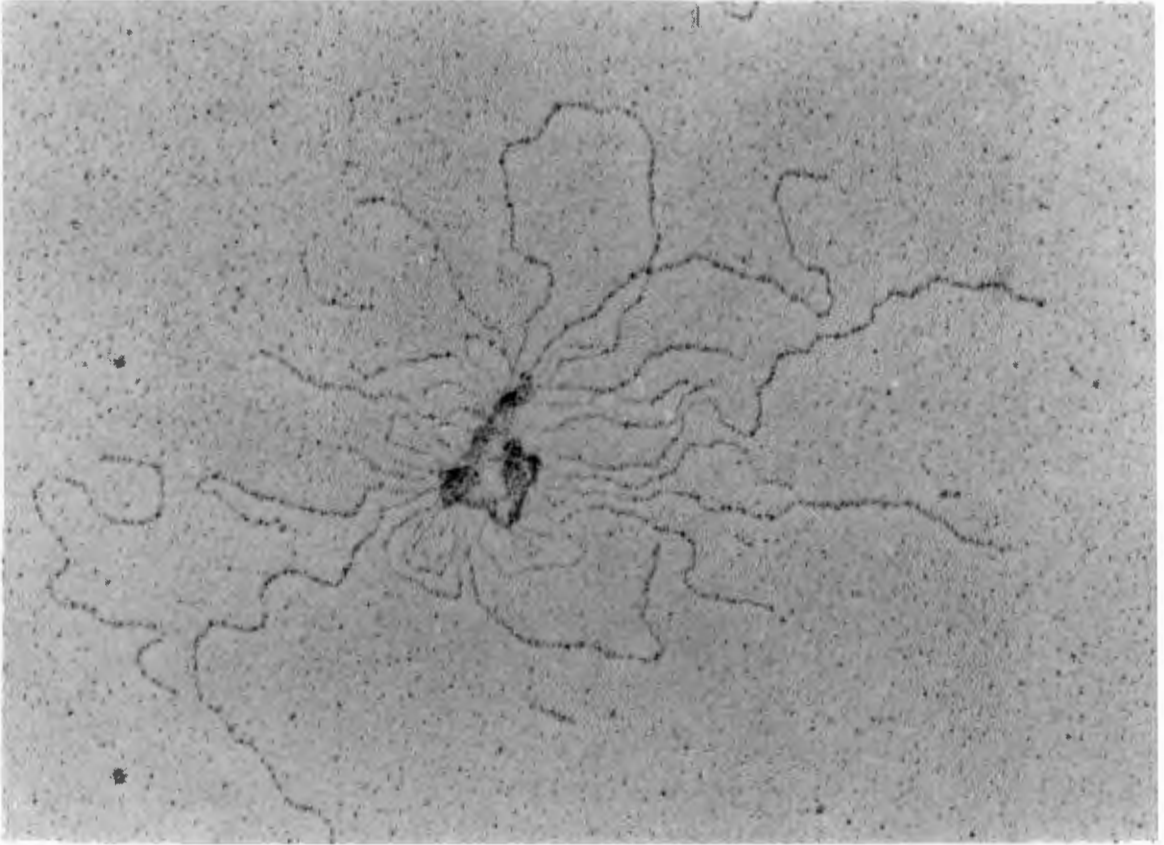
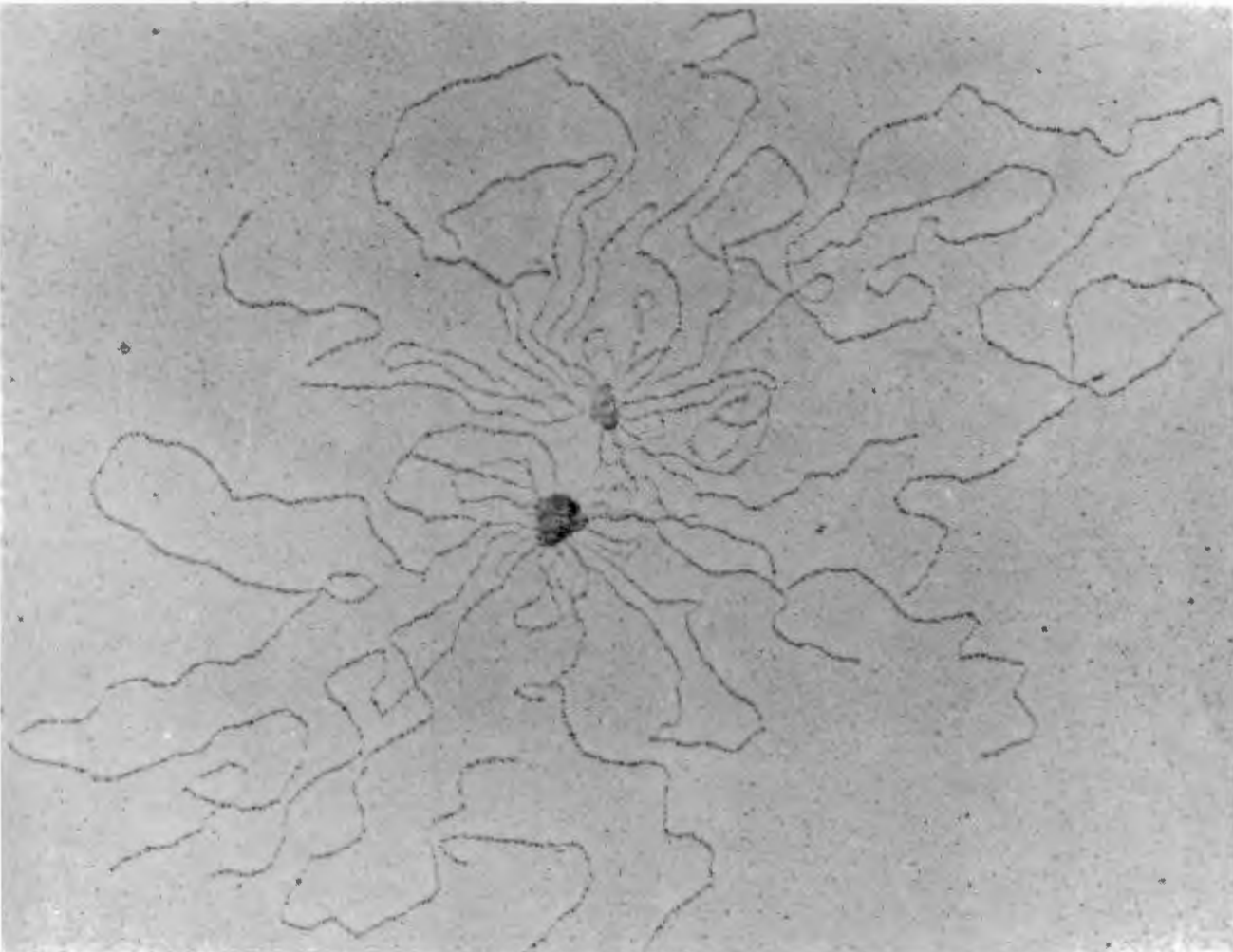
Muis Tipe I C129-10B + Ap2



Figuur 8.65: Histogramme van die metings van die 16,9 kb C129-10A (paneel A) DNA-molekules met Ap2-proteïene en C129-10B (paneel B) DNA-molekules met Ap2-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules. In die lyndiagram onder paneel B word die DNA-fragment getoon. Restriksie-ensiempunte wat aangetoon word, is:

P = Pvu I; X = Xba I; K = Kpn I; E = Eco RI

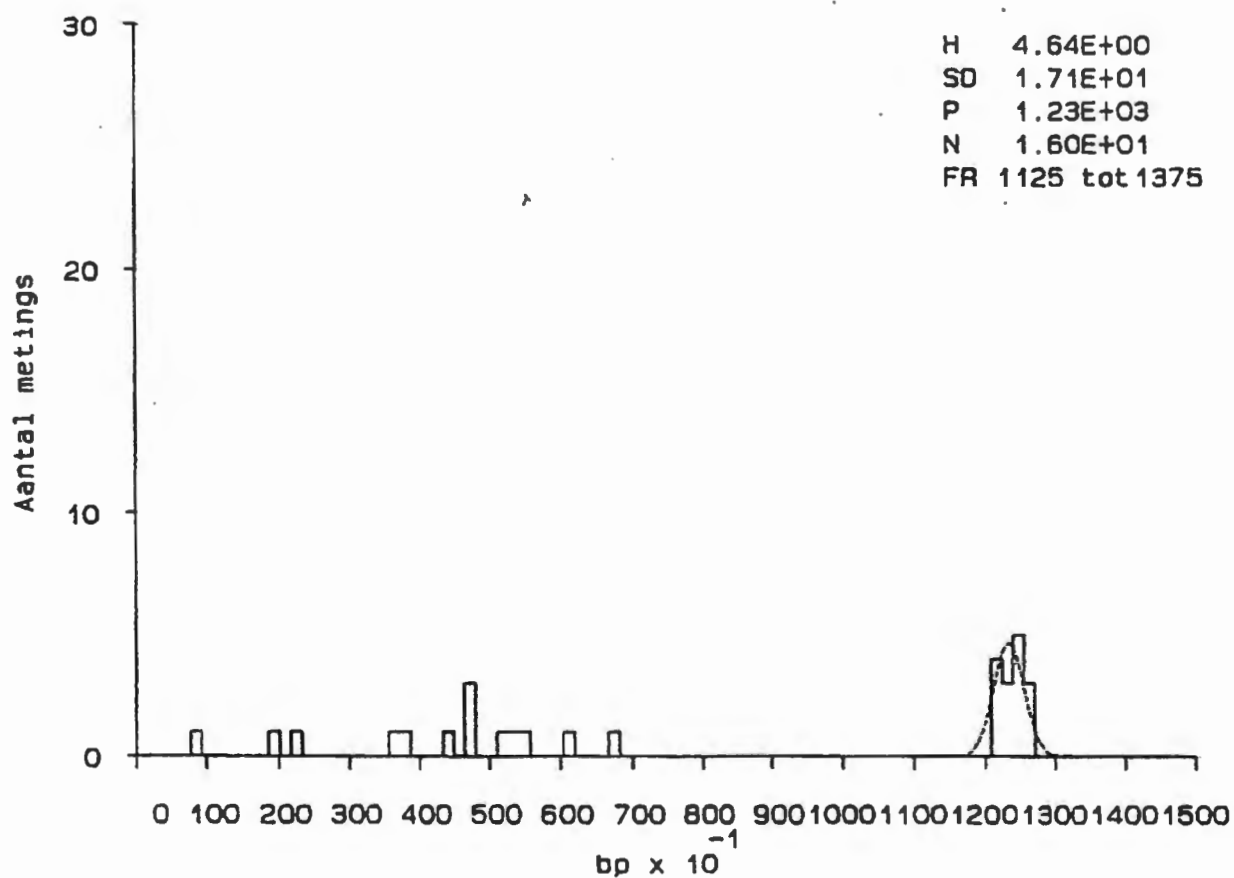
A**B**

Figuur 8.66: Twee voorbeelde van Aggregaatvorming tussen Ap1-proteïene en C129-10 DNA-molekules.

Om te bepaal of enige interaksie tussen Sp1 en Ap2-proteïene voorkom, is 'n eksperiment met C129-10B en Sp1 en Ap2 uitgevoer. Soos in die gevalle waar enkel proteïene by hierdie DNA bygevoeg is, het die gesamentlike byvoeging van Sp1- en Ap2-proteïene ook aanleiding gegee tot groot aggregaatvorming. Hierdie aggregaatvorming het weer eens verhoed dat 'n histogram van die molekules opgestel kon word of frekwensie van kompleksvorming bereken kon word.

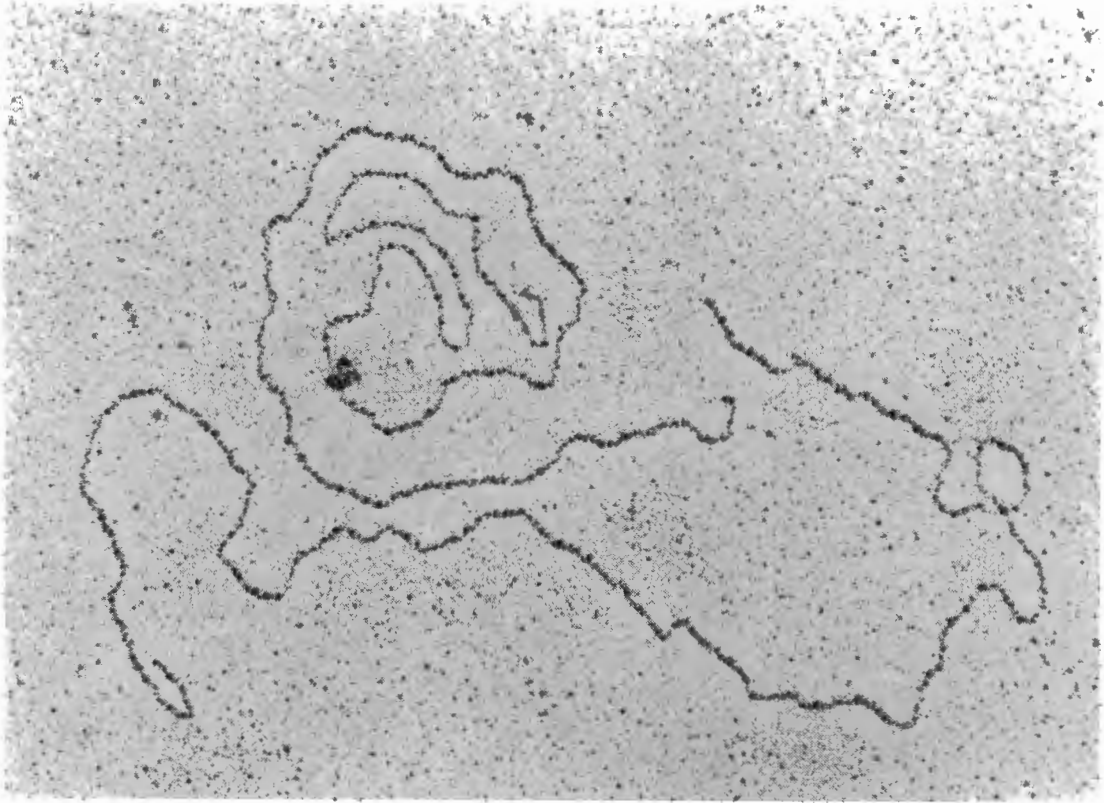
Twee volgende plasmiede met lang kollageenfragmente is elektronmikroskopies geanaliseer. Die een plasmied sluit 'n 18 kb Sal I - Sph I-fragment van die mens tipe II kollageen in en die tweede plasmied sluit 'n 30 kb Sal I - Sal I-fragment van die mens Tipe II kollageen in. Die 18 kb-fragment beskik oor die promotor en die eerste intron van die Tipe II-geen en is in plasmied pUC19 ingevoeg. Vir elektronmikroskopiese analise is hierdie plasmied lineêr gemaak deur vertering met die restriksie-ensiem Sal I. Dieselfde eksperimentele toestande as vir die vorige fragmente is weer eens gebruik.

'n Histogram van die kontoerlengtemetings van die 18 kb DNA-fragmente met Sp1 word in Figuur 8.67 weergegee. Uit die histogram is die totale grootte van die DNA-molekule bereken as $14\,300 \pm 17$ bp teenoor die verwagte lengte van ongeveer 18 kb. Die verskil in lengte kan aan die groter foutgrens by meting van langer molekules te wyte wees. Dikwels is die DNA-molekules so verstrengel dat dit moeilik is om die kontoere te volg. Voorkeurbindingsgebiede vir Sp1 word uit die histogram verkry. Aggregaatvorming is ook by DNA-molekules in hierdie eksperiment waargeneem, maar nie in so 'n groot mate as by C129-10A en C129-10B nie. Frekwensiebepaling van kompleksvorming toon dat ongeveer 1% van die molekules nie analiseerbaar is nie, terwyl ongeveer 5% van die molekules by kompleksvorming betrokke is. Van die 25 molekules is 15 (60%) betrokke by enkel proteïenkomplekse terwyl 10 (40%) betrokke is by die twee komplekse of lusvorming. 'n Voorbeeld van 'n enkelproteïenkompleks op die DNA-molekule met 'n DNA-molekule sonder proteïenkompleks as interne standaard word in Figuur 8.68 gegee.

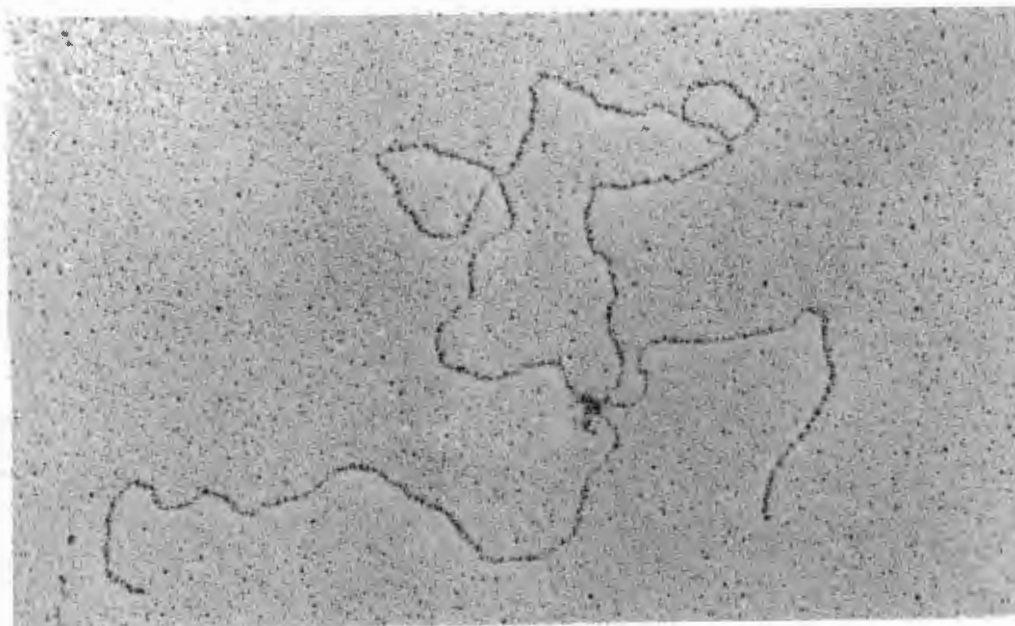


Figuur 8.67: Histogram van die metings van die 18 kb Tipe II kollageen DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Sp1-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules.

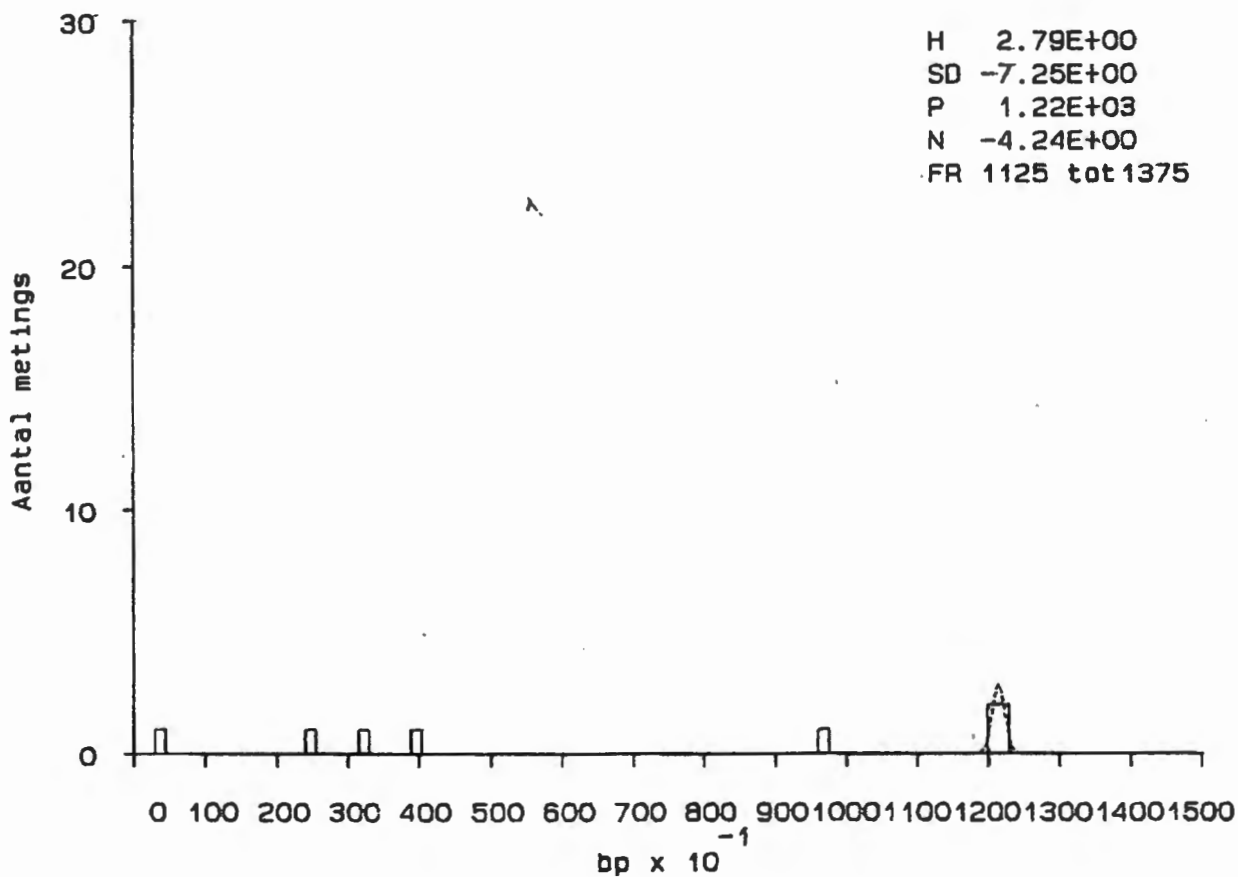


Figuur 8.68: Elektronmikroskopie van Sp1-18 kb Tipe II kollageen-DNA-kompleks-vorming.



Figuur 8.69: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap2-proteïene en 12 kb Tipe II kollageen DNA-molekules.

Lusvorming deur die DNA-molekule vind plaas as gevolg van proteïen-proteïeninteraksie.



Figuur 8.70: Histogram van die metings van die 18 kb Tipe II kollageen DNA-molekules in die teenwoordigheid van Ap2-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules.

Tydens analise van die 18 kb fragment met Ap2 is weer eens 'n groot aantal proteïenaggregate waargeneem. Frekwensie-analise van 212 molekules toon dat 24,6% van die molekules as gevolg van aggregaatvorming of verstrengeling nie analiseerbaar is nie. Van die orige 160 molekules was 104 (49%) by kompleksvorming betrokke. Ongeveer 24 molekules (23%) van die 104 molekules vorm een proteïenkompleks, 16 molekules (15%) vorm twee proteïenkomplekse op die DNA-molekules of is by lusvorming betrokke, terwyl 64 molekules (62%) meer as twee proteïenkomplekse vorm of twee verskillende lusse op dieselfde DNA-molekule vorm. 'n Voorbeeld van 'n enkel lusvorming word in Figuur 8.69 gegee.

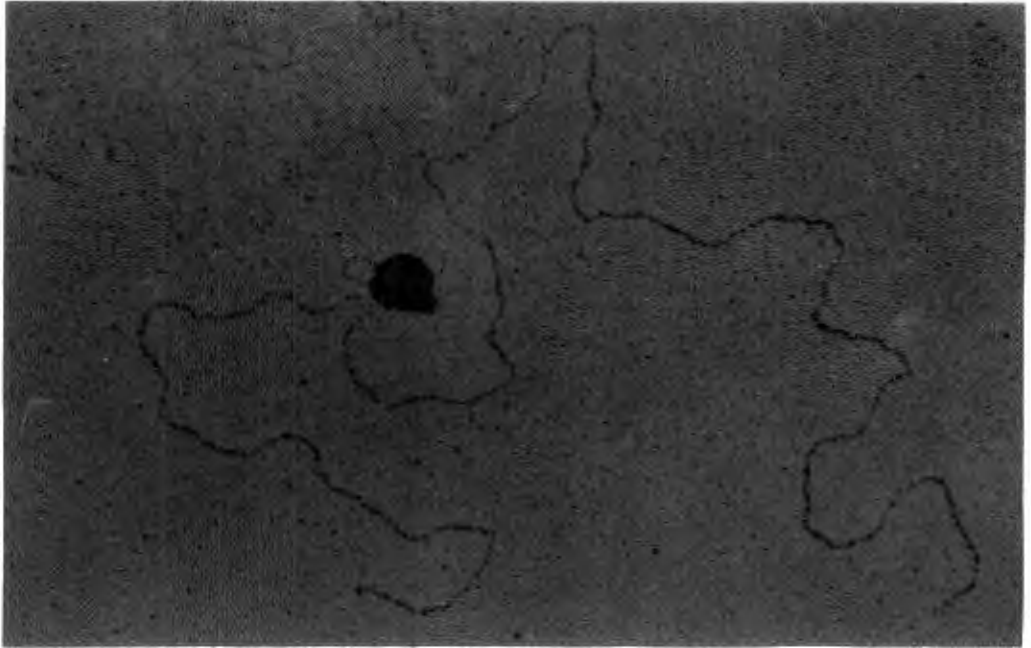
Weens die hoë mate van aggregaatvorming was dit moeilik om 'n histogram van die metings weer te gee, soos waargeneem kan word in Figuur 8.70. Slegs enkele voorkeurbindingsgebiede word op die histogram weergegee. Meer molekules sal geanaliseer moet word om meer spesifieke bindingspunte waar te neem. Die totale lengte van die DNA-molekule soos bereken uit die histogram is ongeveer 14 200 bp teenoor die werklike waarde van 18 674 bp. Die verskil in lengte kan daaraan te wyte wees dat die proteïenkomplekse so groot is dat dit moeilik is om die kontoer van die DNA-molekule tydens metings te volg. Met langer DNA-fragmente is dit ook moeilik om te bepaal of volledige fragmente en nie gebreekte fragmente gemeet word.

Soos verwag is die analise van die 18 kb-fragment met Ap1 weer eens baie bemoeilik deur aggregaatvorming en die affiniteit van die proteïen vir ander Ap1-proteïene. Kompleksvorming, benewens aggregate wat verkry is, is meestal soos dié wat as voorbeeld in Figuur 8.71 gegee is. Ap1-proteïene bind met so 'n affiniteit aan mekaar, dat dit moeilik is om die kontoerlengte van die molekules te volg of om die bindingsgebied waar te neem. As gevolg hiervan kon daar nie 'n histogram opgestel word nie. Frekwensiebepaling van kompleksvorming toon dat slegs 3,2% van die molekules betrokke is by kompleksvorming, maar dat geeneen van die molekules egter analiseerbaar is nie as gevolg van te veel proteïenkomplekse by mekaar. Die feit dat daar so baie molekules sonder komplekse is, is waarskynlik te wyte aan die feit dat die proteïene met mekaar assosieer as gevolg van die hoë affiniteit vir ander Ap1-proteïene sodat minder proteïene beskikbaar is om aan die DNA-molekules te bind.

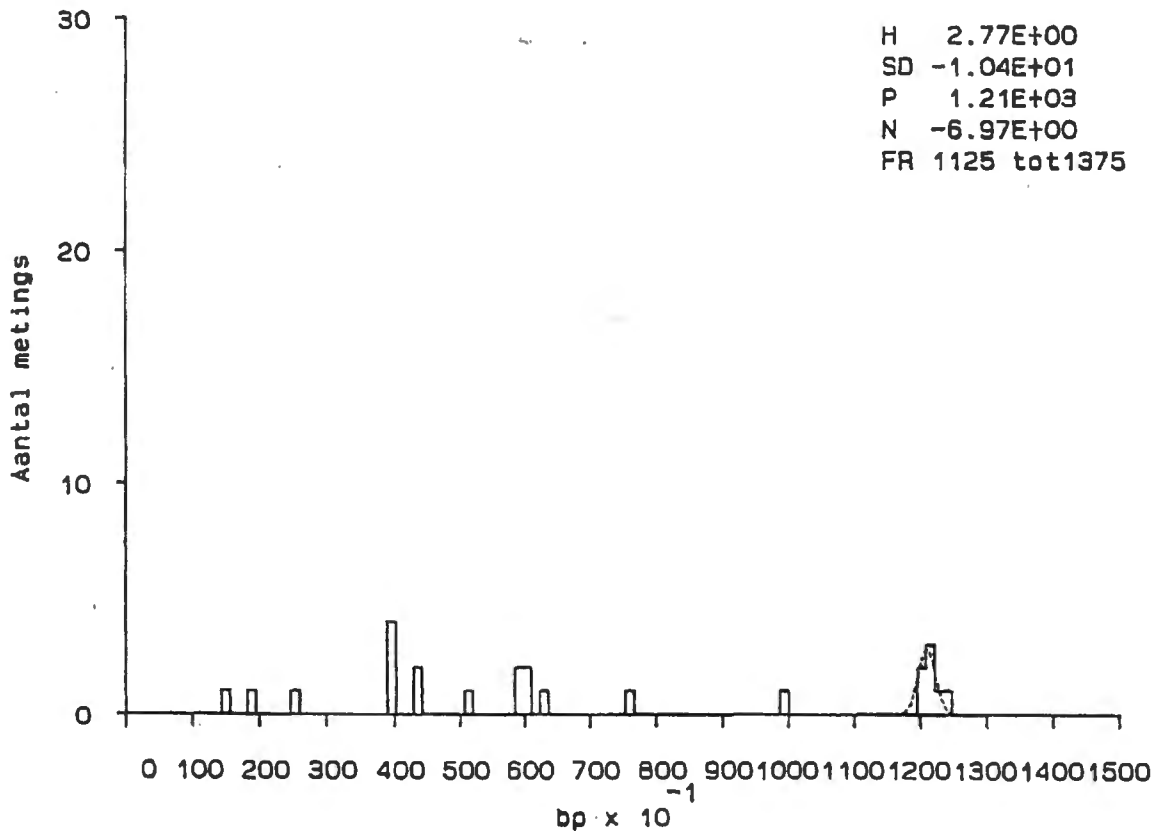
Elektronmikroskopiese analise van die 18 kb DNA-molekule met Sp1 en Ap2 tesame, toon slegs enkele proteïen-proteïeninteraksies. Die gebiede van interaksie tussen die proteïene en DNA wat voorkom, word aangetoon in die histogram in Figuur 8.72. Watter van hierdie proteïene egter werklik Sp1 en Ap2 interaksies is, sal slegs met immunologiese elektronmikroskopie vasgestel kan word. Frekwensiebepalings van kompleksvorming tydens die analise van 200 molekules van die 12 kb DNA met Ap2 en Sp1 toon dat vyf molekules (2,5%) nie analiseerbaar is nie. Van die orige 195 molekules is 96 (48%) betrokke by kompleksvorming. Ongeveer 44 (46,8%) van die 96 molekules is by enkel proteïenkomplekse betrokke terwyl 42 molekules (43,7%) twee komplekse vorm of aan lusvorming deelneem en by tien (10%) kom twee lusse op 'n enkel molekule voor.

Die 30 kb DNA-fragment wat die mens Tipe II-geen bevat, is in plasmied PJB8 ingevoeg en is vir elektronmikroskopiese analise lineêr gemaak deur vertering met die restriksie-ensiem Cla I. Analise van Sp1-binding aan die 30 kb fragment is uitgevoer op verskeie geselekteerde molekules, waarna die data in die histogram in Figuur 8.73 gegee word. 'n Voorbeeld van drie verskillende Sp1-bindingspunte op dieselfde molekules word in Figuur 8.74 (paneel A) gegee. Selfassosiasie tussen Sp1-molekules lei tot lusvorming van die DNA. 'n Voorbeeld van lusvorming tussen verskillende Sp1-proteïen word in paneel B van Figuur 8.74 aangetoon.

Uit die histogram in Figuur 8.73 kan waargeneem word dat daar verskillende voorkeurbindingspieke vir Sp1 in hierdie DNA-fragment is. Die totale lengte van die molekule soos uit die Gaus-kromme op die histogram bepaal is, is bereken as 30 500 bp $\pm$ 244 teenoor die werklike waarde van ongeveer 31 kb. Oriëntasie van hierdie molekule is in hierdie geval moeilik, aangesien geen merkerogene in die plasmied waarin die fragment ingevoeg is, voorkom nie. Frekwensiebepaling van die Sp1-kompleksvorming in hierdie DNA-molekules toon dat van die 219 molekules wat geanaliseer is elf molekules (5%) as gevolg van verstrengeling van die DNA nie analiseerbaar is nie. By die lang fragmente is dit dikwels die probleem dat die DNA-molekules so verstrengel raak, dat dit nie analiseerbaar is nie. Van die orige 208 molekules is 121 molekules (58%) by kompleksvorming betrokke.



Figuur 8.71: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap1-proteïene en die 18 kb Tipe II kollageen DNA-molekules.



Figuur 8.72: Histogram van die metings van die 18 kb Tipe II kollageen DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1- en Ap2-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Sp1 en Ap2-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules.

Ongeveer 64 molekules (52,9%) is by enkel proteïenkomplekse betrokke, 26 molekules (21,5%) by twee komplekse of lusvorming en 31 molekules (25,6%) by drie komplekse of is betrokke by meer as twee lusvormings op dieselfde DNA-molekule. 'n Voorbeeld van die komplekse word in Figuur 8.74 paneel A aangetoon.

Die 30 kb DNA-fragment met Ap2 het óf aggregaatvorming ondergaan óf molekules vertoon soortgelyk aan dié in Figuur 8.75. In die meeste gevalle is drie gebiede met lusvorming aangetoon, maar kontoerlengtes kon nie gevolg word om voorkeurpiekposisies te bepaal nie, omdat die DNA-molekules te verstrengel was. Derhalwe kon geen histogram opgestel word nie. Frekwensiebepaling van kompleksvorming was ook nie moontlik nie, omdat die meeste van die molekules nie analiseerbaar is nie.

Soortgelyke waarnemings as vir Ap2 is ook vir die 30 kb DNA-fragment met Ap1 waargeneem. Twee voorbeelde van binding met Ap1 word in Figuur 8.76 panele A en B weergegee. In die meeste gevalle het DNA-molekules aggregaatvorming soortgelyk aan die in paneel A ondergaan. Indien molekules voorkom wat meer analiseerbaar is soos dié in paneel B, is dit egter dikwels die geval dat die kontoerlengte nie na behore gevolg kan word nie as gevolg van te veel lusvormings of verstrengeling van die DNA-molekule. Frekwensiebepaling van Ap1-kompleksvorming by die 30 kb-fragment is ernstig gekortwiek deur die verstrengeling en lusvorming van die DNA sodat die meeste molekules nie analiseerbaar was nie.

Elektronmikroskopiese analise van die 30 kb DNA-fragment in die gelyktydige teenwoordigheid van Sp1 en Ap2 is soos vir die ander eksperimente uitgevoer. Heelwat nie-analiseerbare molekules kom voor, maar in molekules wat wel analiseerbaar is, is oor die algemeen tussen twee en drie lusse op dieselfde molekule waargeneem. Spesifieke onderskeid tussen Sp1 en Ap2 kon egter weer eens nie met hierdie tegniek onder die elektronmikroskoop gemaak word nie. Statistiese analise van 200 molekules toon dat 28 molekules (14%) nie analiseerbaar is nie, terwyl 176 molekules (88%) by kompleksvorming betrokke is. Van hierdie 176 molekules is 46 (26,4%) betrokke by enkel proteïenkomplekse, terwyl 57 molekules (32,7%) deur proteïen-proteïeninteraksie 'n enkel lus vorm. Verder is gevind dat 42 molekules

(24,2%) betrokke is by twee lusvormings op 'n molekule en 29 molekules (16,7%) betrokke is by ten minste drie of meer lusvormings op 'n enkele molekule.

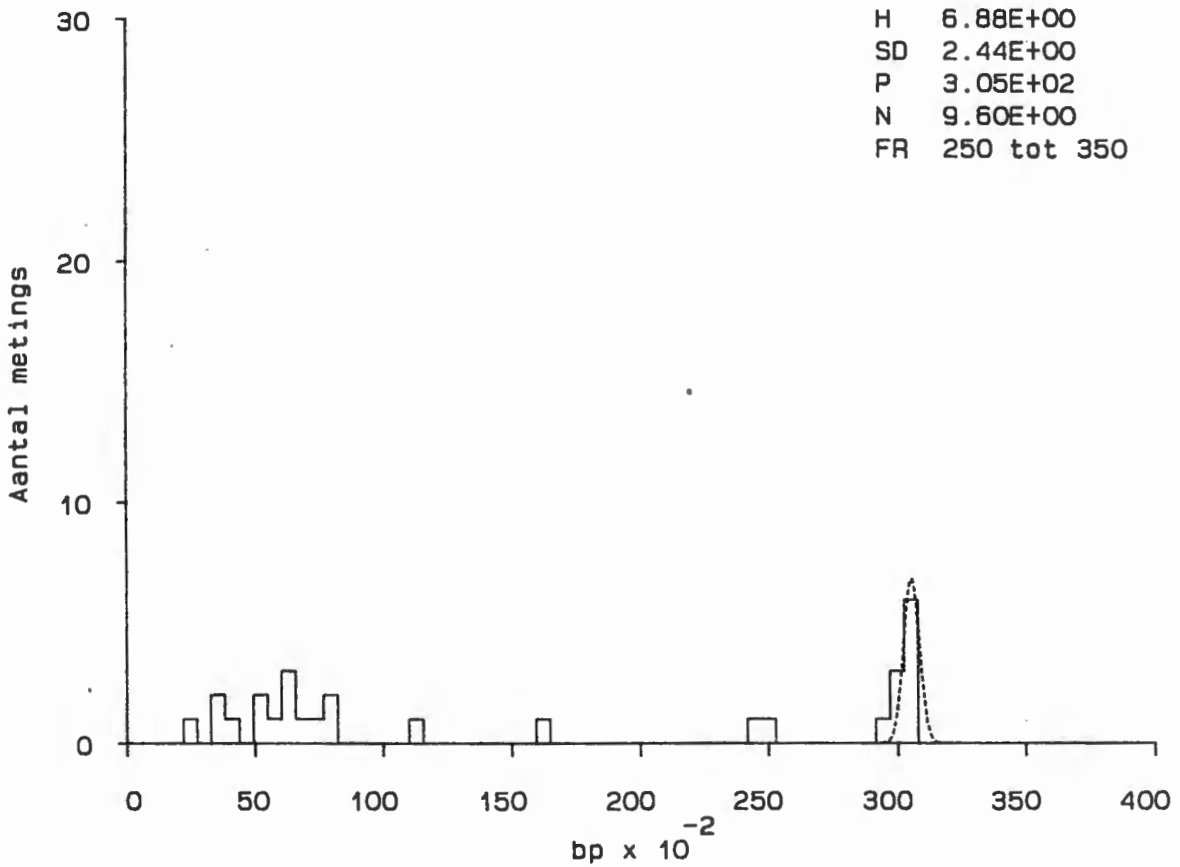
8.4.1 SAMEVATTING

Frekwensiebepaling van kompleksvorming by die langer kollageenfragmente is deur die nie-analiseerbare molekules beïnvloed, soos waargeneem kan word uit die opsomming van die statistiese analyses van die verskillende DNA-fragmente in Tabel 8.5. Veral die hoë affiniteit van Ap1 vir ander Ap1-proteïene asook vir die DNA-molekules, het tot gevolg gehad dat geen frekwensiebepaling enigsins vir Ap1 uitgevoer kon word nie. Voorkeur bindingspieke vir Sp1 en ook vir Ap2 is egter wel vir van die langer fragmente waargeneem. 'n Hoë mate van kompleksvorming is by die langer fragmente waargeneem, veral by die 30 kb DNA-fragment met beide Sp1- en Ap2-proteïene. Hier is kompleksvorming selfs so hoog as 87%.

8.5 BESPREGING

Elektronmikroskopiese analise van die verskillende kollageengeenfragmente met Sp1, Ap2 en Ap1 het getoon dat al drie hierdie proteïene verskillende affiniteite vir die DNA en vir hulself het. Sp1-proteïene het nie 'n hoë affiniteit vir ander Sp1-proteïene nie en baie min aggregaatvorming kom voor waar die binding van Sp1 aan die DNA-fragmente bestudeer is. 'n Meetbare affiniteit van Sp1 vir nie-spesifieke DNA is in die literatuur deur Li *et al.* (1991) beskryf. In hierdie studie is die waarneming nie net vir Sp1 niw, me in 'n selfs groter mate vir Ap1 en Ap2 verkry. Die hoë affiniteit van Ap1 en Ap2 vir hulself en die DNA dra waarskynlik by tot die nie-spesifieke binding van hierdie twee proteïene aan die DNA. Nie-analiseerbare molekules het in 'n weglaatbare klein frekwensie voorgekom, sodat die opsomming van die frekwensie van Sp1-kompleksvorming soos in Tabel 8.6 saamgevat is, die relatiewe tendens van Sp1-binding by elke fragment gee. Die frekwensie van Sp1-kompleksvorming by die kontrole fragmente is almal min of meer in dieselfde orde grootte van <4%.

Tipe II 30kb + Sp1



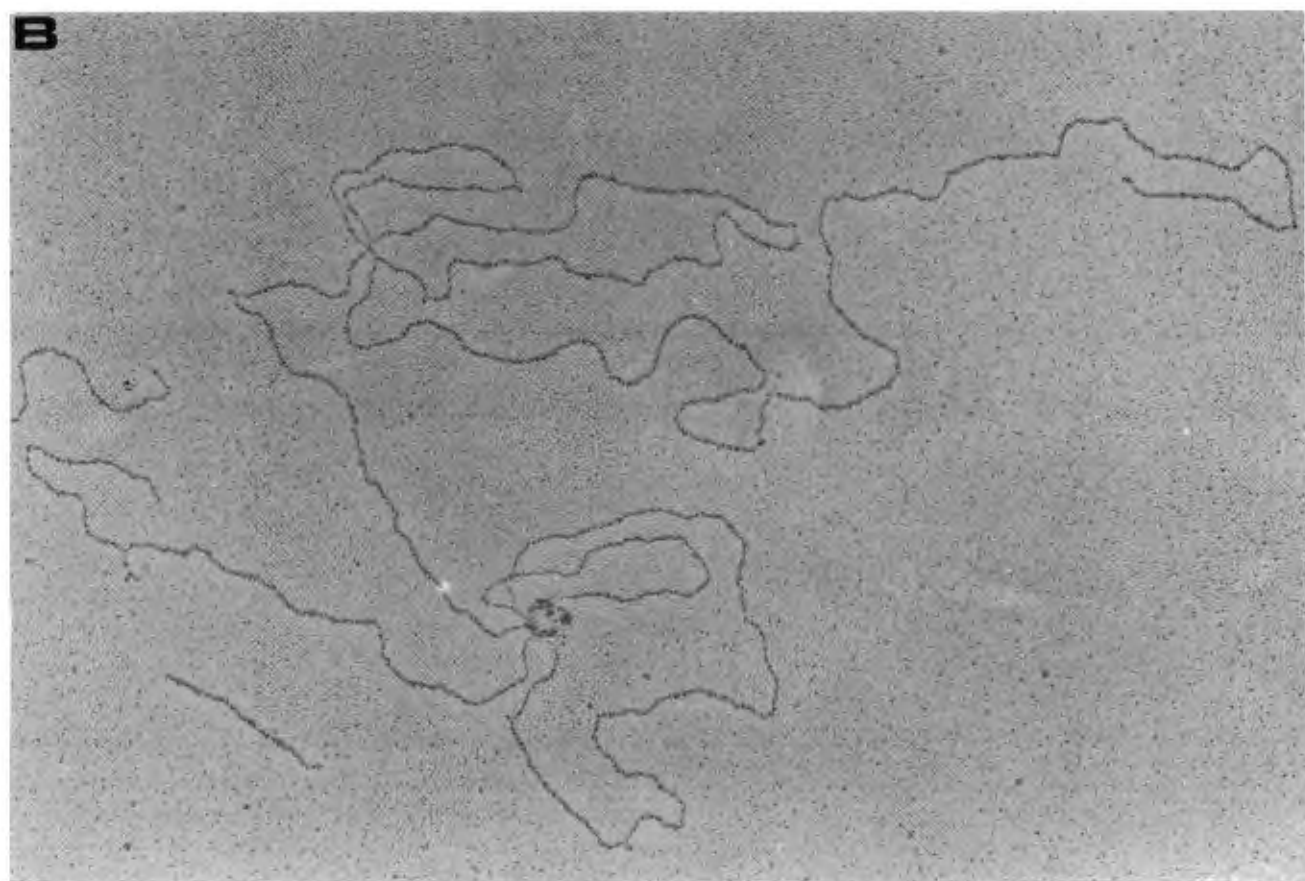
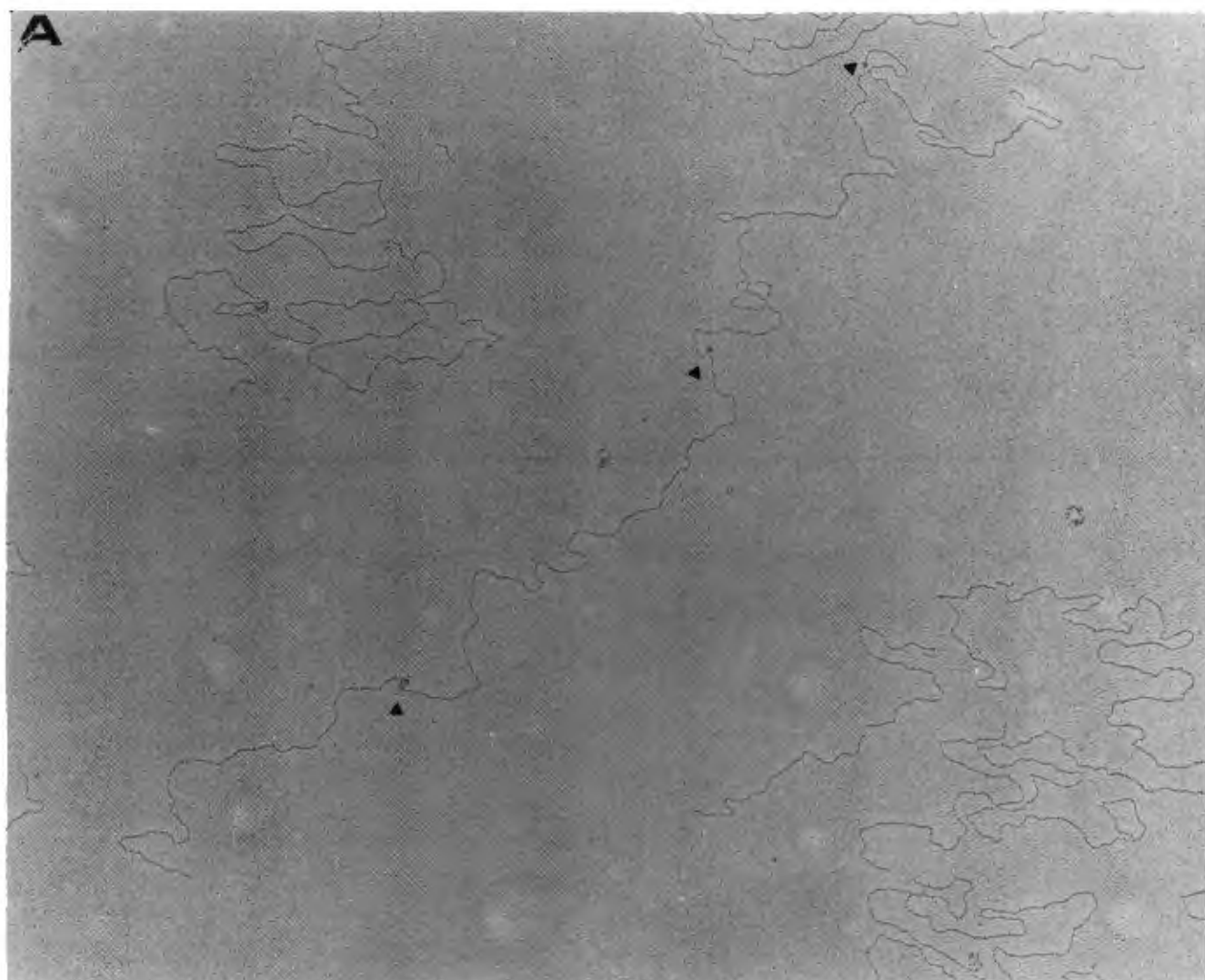
Figuur 8.73: Histogram van die metings van die 30 kb Tipe II kollageen DNA-molekules in die teenwoordigheid van Sp1-proteïene.

Die linkerkant van die histogram toon die metings vanaf die eindpunt van die DNA-molekules tot die middel van die gebonde Sp1-proteïene. Die piek aan die regterkant van die histogram toon metings van die totale lengte van die DNA-molekules.

'n Vergelyking van die frekwensie van Sp1 kompleksvorming by die kollageenfragmente toon 'n duidelike toename in binding namate groter dele van die aktiveringsvolgorde in die eerste intron van die mens pro- α 1(I)-geen in die DNA-fragmente ingesluit word. Die twee fragmente pRS en pHR295 wat die aktiveringsvolgorde insluit, vertoon dan ook 'n frekwensie van Sp1-binding soortgelyk aan die wat vir die SV40-fragment verkry is.

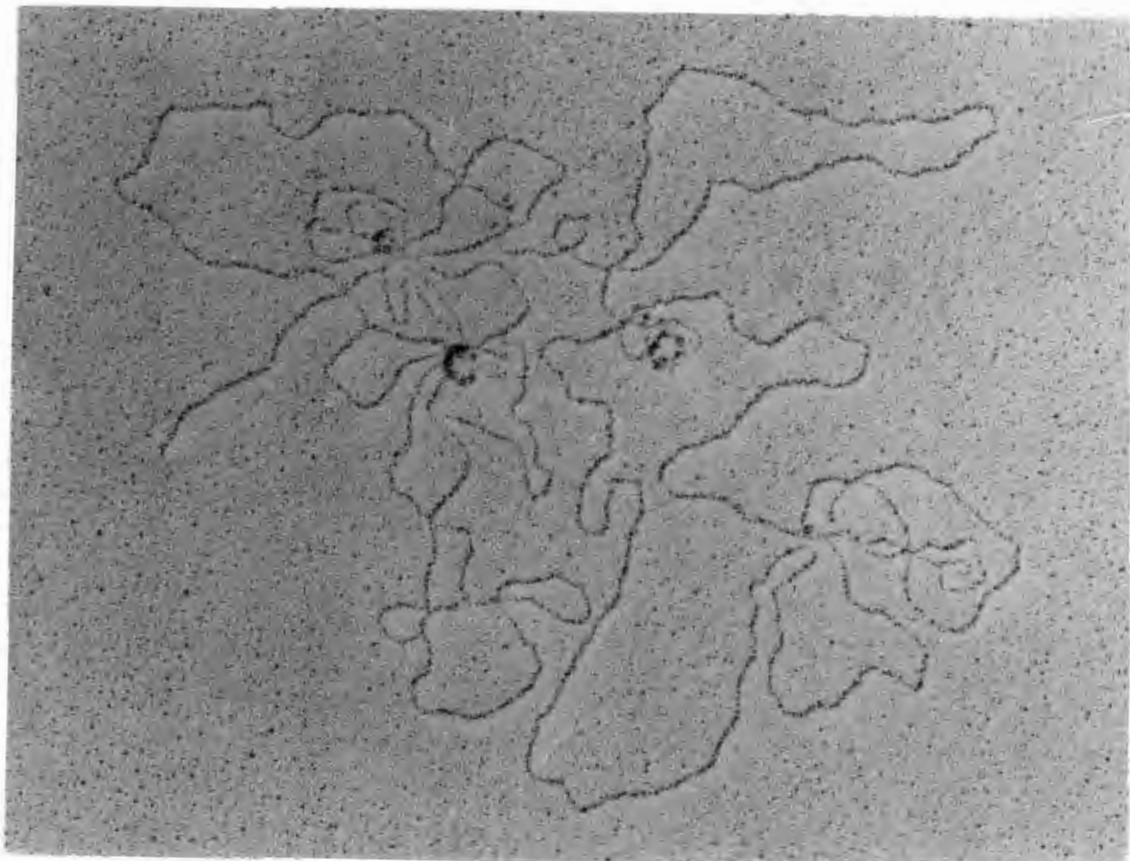
Ap2-proteïene het 'n heelwat hoër affiniteit as Sp1 vir die DNA en vir ander Ap2-proteïene met gevolglike vorming van aggregate. Die persentasie nie-analiseerbare molekules het gewissel van fragment tot fragment. Die DNA-molekules wat 'n hoë affiniteit vir Ap2 getoon het, het ook meer aggregaatvorming en nie-analiseerbare molekules vertoon soos in die geval van die SV40 en pHR295 DNA's. Indien die tendens van Ap2-binding, soos opgesom in Tabel 8.6 geanaliseer word, word waargeneem dat die bindingsfrekwensie van Ap2 aan die promotorfragmente pEP, pCX en pXS gelykmatig verhoog namate dit nader aan die eerste intron kom. Die bindingsfrekwensie van Ap2 in die intronfragment pHR295 toon 'n baie hoë affiniteit vir Ap2 soortgelyk aan die frekwensie verkry by die SV40-fragment en kan waarskynlik toegeskryf word aan die teenwoordigheid van vyf Ap2-bindingspunte in die gebied (Figuur 7.52).

Ap1-proteïene het 'n baie hoë affiniteit vir ander Ap1-proteïene sowel as vir sekere DNA-molekules vertoon. Kompensasie vir hierdie hoë affiniteit deur die Ap1 konsentrasie te verlaag, het egter daartoe gelei dat 'n lae bindingsfrekwensie by die meeste DNA-molekules voorgekom het. Die intronfragment pSS wat oor 'n enkele Ap1-bindingspunt beskik, het 'n hoë affiniteit vir die proteïene getoon. Die werklike frekwensie van Ap1-binding kan egter nie uit die statistiese analise verkry word nie, aangesien heelwat van die Ap1-proteïene wat aan die DNA-molekules kan bind, vasgevang is in die groot aggregaatkomplekse wat gevorm word.



Figuur 8.74: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen die Sp1-proteïene en die 30 kb Tipe II kollageen DNA-molekules.

- A: Drie afsonderlike Sp1-komplekse word op dieselfde molekule aangetref.
- B: Proteïen-proteïeninteraksies gee aanleiding tot lusvorming van die DNA-molekule.



Figuur 8.75: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen die Ap2-proteïene en die 30 kb Tipe II kollageen DNA-molekules.

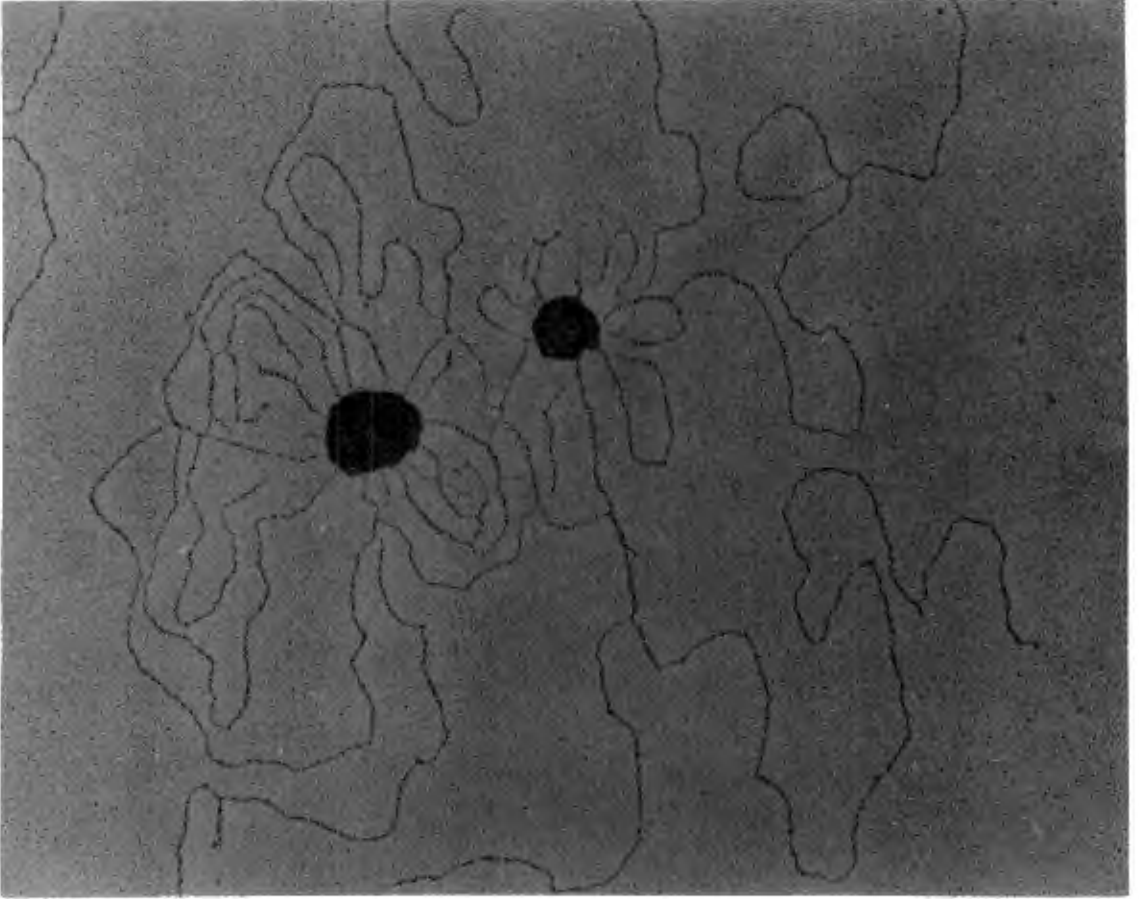
Proteïen-proteïeninteraksies lei tot die vorming van verskeie lusse op dieselfde DNA-molekule.

Tabel 8.5 DNA-proteïenkompleksvorming met Sp1, Ap2 en Ap1 en die langer kollageenfragmente

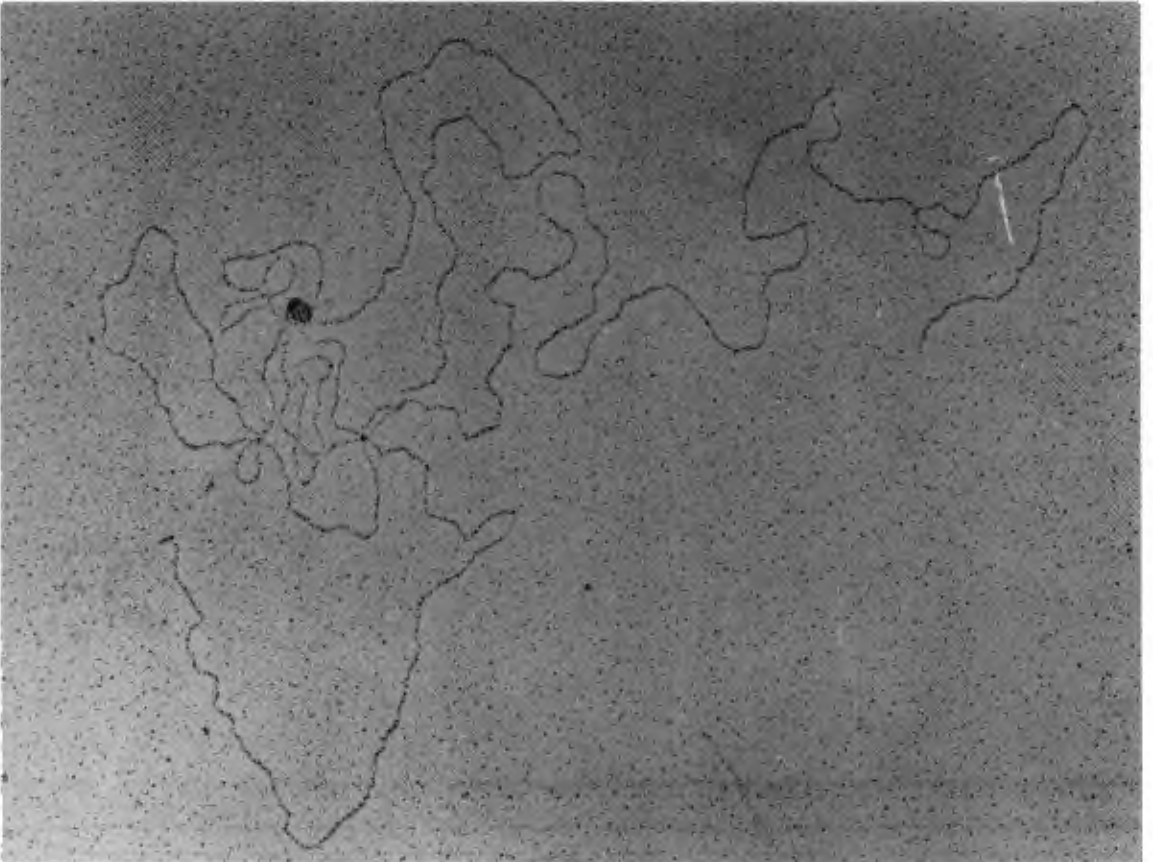
FRAGMENT	GETAL (EN PERSENTASIE) MOLEKULES WAARGENEEM						
	DNA-MOLEKULES SONDER KOMPLEKSE	DNA-MOLEKULES NIE ANALISEERBAAR	DNA-MOLEKULES MET KOMPLEKSE				
				EEN PROTEÏEN- KOMPLEKS	TWEE PROTEÏEN- KOMPLEKSE OF LUSVORMING	MEER AS TWEE PRO- TEÏENKOM- PLEKSE OF LUSVORMING	DRIE OF MEER LUSSE
Sp1 C129-10B/PvuI 18 kb/SalI 30 kb/ClaI	150 (75 %) 470 (84 %) 87 (38,7 %)	21 (10,5 %) 5 (1 %) 11 (5 %)	29 (14,5 %) 25 (5 %) 121 (55,3 %)	14 (48 %) 15 (60 %) 64 (52,9 %)	15 (52 %) 10 (40 %) 26 (21,5 %)	- - 31 (25,6 %)	- - -
Ap2 C129-10B/PvuI 18 kb/SalI 30 kb/ClaI	43 (21,5 %) 56 (26,4 %) N	14 (7 %) 53 (24,6 %) N	143 (71,5 %) 104 (49 %) N	33 (23 %) 24 (23 %) N	38 (26,5 %) 16 (15 %) N	72 (50,5 %) 64 (62 %) N	- - N
Ap1 C129-10B/PvuI 18 kb/SalI 30 kb/ClaI	N N N	N N N	N N N	N N N	N N N	N N N	N N N
Sp1 en Ap2 C129-10B/PvuI 18 kb/SalI 30 kb/ClaI	N 99 (49,5 %) 0 (0 %)	N 5 (2,5 %) 26 (13 %)	N 96 (48 %) 174 (87 %)	N 44 (46,8 %) 46 (26,4 %)	N 42 (43,7 %) 57 (32,7 %)	N 10 (10 %) 42 (24,2 %)	N - 29 (16,7 %)

N = nie analiseerbaar nie

A



B



Figuur 8.76: Elektronmikroskopie van kompleksvorming tussen Ap1-proteïene en die 30 kb Tipe II kollageen DNA-molekule.

- A: Aggregaatvorming tussen die Ap1-proteïene en die DNA-molekules as gevolg van die hoë affiniteit van die proteïene vir die DNA.
- B: Lusvorming deur die DNA-molekule as gevolg van proteïen-proteïen-interaksie. Verstrengeling van die DNA-molekule as gevolg van die lengte van die DNA word ook waargeneem.

Tabel 8.6: Frekwensie van kompleksvorming by die verskillende kollageenfragmente

KONTROLE- FRAGMENTE	SP1	AP2	AP1	SP1 & AP2	KOLLAGEEN- FRAGMENTE	SP1	AP2	AP1	SP1 & AP2
pSP72	3,3%	15,4%	N	-	pSV40	16%	41,8%	5,8%	-
pSP65	3,7%	8,5%	1,3%	-	pEP	3,4%	12,1%	-	-
					pCX	4,5%	15,3%	-	-
					pXS	2,5%	17,0%	-	-
					pSS	6,4%	8,2%	56,2%	-
					pRS	17,2%	10,1%	-	-
					pHR295	17,2%	32,5%	-	-
					pHR3'	9,8%	15,6%	-	-
					pHS-ex1	8,7%	19,4%	2,8%	-
					pHS-int1	10%	23,8%	5,6%	-
pGEM-11zf(+)	3,8%	15,9%	1,2%	10,3%	pGEM-BB5(A)	12,9%	38,7%	5,9%	38,2%
					C129-10B/PvuI				
					18 kb/SalI	14,5%	71,5%	N	N
					30 kb/ClaI	5%	49%	N	48%
						55,3%	N	N	87%

N = nie analiseerbaar nie

Die plasmiede met die langer kollageenfragmente, naamlik pHS-ex1, pHS-int1 en pGEM-BB5(A), het oor die algemeen dieselfde tendens van bindingsfrekwensie weerspieël as wat deur die afsonderlike fragmente waaruit hierdie plasmiede saamgestel is, vertoon word. Die doelwit om te bepaal of elektronmikroskopiese analise dieselfde bindingsgebiede aantoon as dié geïdentifiseer tydens DNase I-afskermingsanalise, was suksesvol. Op een uitsondering na is dieselfde bindingsgebiede vir Sp1, Ap1 en Ap2 op die kollageenfragmente met behulp van die mikrotegniek onder die elektronmikroskoop verkry. Die enigste uitsondering is die waarneming van 'n Sp1-bindingsgebied in die promotorfragment pCX. Uit die gegewens wat beskikbaar is, is dit duidelik dat Sp1 teen 'n baie lae affiniteit wel aan die 5'-GGCGG-3'-gebied geleë langs die proksimale CCAAT-motief bind. Slegs een navorsingsgroep (Nehls *et al.*, 1991) het Sp1-binding aan hierdie gebied waargeneem na 'n verandering in die DNase I-afskermingskondisies. Laasgenoemde is waarskynlik ook die rede waarom Sp1-binding aan hierdie gebied selfs na drie herhalings van DNase I-afskermingsanalise (Figuur 7.5) en 'n Sp1-konsentrasiereeks (Figure 7.19 en 7.20) nie verkry is nie.

Die tweede doelwit van die elektronmikroskopiese analise was om te bepaal of langer DNA-fragmente vir proteïenbinding geanaliseer kan word. Hoewel die langer fragmente wat in hierdie ondersoek gebruik is nie in diepte geanaliseer is nie weens 'n tekort aan genoeg korrekte molekules, is analiseerbare molekules wel met Sp1-bindingskomplekse verkry. 'n Probleem wat egter ervaar is, is dat die langer molekules 'n neiging het om met hulself verstrengel te raak sodat kontoerlengtemetings om histogramme te verkry waaruit bindingsgebiede geïdentifiseer kan word, bemoeilik word. Ap1- en Ap2-proteïene wat 'n hoë affiniteit vir dieselfde proteïene en die DNA het, veroorsaak ook nog verdere aggreëatvorming wat die metings verder bemoeilik en die frekwensie van nie-analiseerbare molekules verhoog. Indien hierdie tipe elektronmikroskopiese analyses gebruik moet word vir lang DNA-fragmente, is hierdie tegniek slegs geskik indien dit gebruik word om bindingsgebiede in die algemeen op die lang fragmente te identifiseer. Geïdentifiseerde bindingsgebiede kan dan aan DNase I-afskermingsanalise onderwerp word om die bindingsgebiede meer spesifiek in die DNA te identifiseer. Uit hierdie studie kan dus gestel

word dat fragmente langer as 10 kb nie geskik is om spesifieke kartering van bindingsgebiede met die elektronmikroskoop te doen nie, maar wel om 'n aanduiding van bindingsgebiede in die algemeen te verkry.

Elektronmikroskopiese analise van fragmente in die gelyktydige teenwoordigheid van sowel Sp1 as Ap2-proteïen het 'n verhoging in lusvorming deur middel van proteïen-proteïeninteraksies by die verskillende fragmente teweeggebring. Ongelukkig is die Sp1- en Ap2-bindingsgebiede by die meeste fragmente naby mekaar geleë en is die Sp1- en Ap2-proteïene onder die elektronmikroskoop as gevolg van die lae resolusie nie van mekaar onderskeibaar nie. Die gevolg hiervan is dat proteïen-proteïeninteraksies wel plaasvind, maar dat daar nie onderskei kan word of dit selfassosiasie van Sp1 of Ap2 is en of dit Sp1/Ap2-interaksies is nie. Hierdie probleem sou opgelos kon word deur van immuno-elektronmikroskopiese tegnieke gebruik te maak.

Oor die algemeen was die elektronmikroskopiese analise suksesvol om bindingsgebiede te identifiseer, ten spyte daarvan dat merkerogene nie gebruik kon word nie. Die gebruik van repliserende molekules het egter bevredigende resultate getoon. Bevestiging van en verdere spesifieke bepalinge van die verskillende bindingspunte op die DNA-molekule sou verkry kan word deur van ander fragmente van dieselfde DNA-gebied gebruik te maak. Deur van verskillende restriksie-ensiem snitpunte in 'n bepaalde fragment gebruik te maak, is dit moontlik om die bindingsgebiede meer of minder asimmetries tot die beginpunt van die molekule te oriënteer en op so 'n wyse die bindingsgebiede van proteïene op 'n meer spesifieke wyse aan te toon.

HOOFSTUK 9

BESPREKING

9.1 INLEIDING

Die spesifisiteit en vlak van geenuitdrukking word deur die aard en rangskikking van *cis*-werkende DNA-elemente in en om 'n geen bepaal. *Trans*-werkende volgorde-spesifieke DNA-bindingsproteïene wat meestal as transkripsiefaktore optree, herken hierdie *cis*-werkende DNA-elemente en reguleer dan op 'n samewerkende wyse die differensiële uitdrukking van 'n geen (Jones *et al.*, 1988; Mitchell en Tjian, 1989). In die literatuuroorsig (Hoofstuk 2) wat handel oor die transkripsionele regulering van die kollageengene, is 'n opvallende leemte aangetoon ten opsigte van die kennis aangaande die interaksie van die *trans*-werkende bindingsproteïene met die geïdentifiseerde *cis*-werkende DNA-elemente in die mens pro- α 1(I)-geen. Derhalwe is die volgende doelwit vir hierdie studie geformuleer: om met behulp van twee verskillende funksionele metodes die onderskeie reguleringsgebiede in die mens pro- α 1(I)-kollageengeen te identifiseer (Hoofstuk 5), en om dan op 'n sistematiese wyse ondersoek in te stel na die teenwoordigheid van bindingsvolgordes vir die drie transkripsiefaktore Sp1, Ap1 en Ap2 in die geïdentifiseerde reguleringsgebiede. Spesifieke bindingspunte van die drie faktore asook die affiniteit waarmee hierdie faktore aan die *cis*-elemente bind, is in hierdie studie ondersoek en voortvloeiend hieruit kon 'n kaart van Sp1-, Ap1- en Ap2-binding aan die mens pro- α 1(I)-kollageengeen opgestel word (Figuur 7.52). Die moontlike wyse waarop hierdie geïdentifiseerde *trans*-werkende bindingsproteïene 'n bydrae tot die regulering van die geen kan maak, word in 'n model aan die einde van hierdie hoofstuk voorgestel.

9.2 IDENTIFISERING VAN REGULERINGSGEBIEDE

Die posisie van die promotorgebied van die mens pro- α 1(I)-geen is reeds in 1985 met behulp van elektronmikroskopie en S1-nuklease-analise in 'n 2,2 kb-subkloon van die genomiese kloon RMS-8 gelokaliseer (Chu *et al.*, 1985). Uit volgorde-analises is die posisies van die TATTA- en CCAAT-homologieë sowel as die inisiasiepunt vir

transkripsie vasgestel (Chu *et al.*, 1985; Dickson *et al.*, 1985). Tot voor die publiserings van die resultate van die funksionele analise van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen (Rossouw *et al.*, 1987) wat kortliks weer in Hoofstuk 5 beskryf is, was min nog bekend oor die transkripsionele reguleringsvolgordes in veral die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen.

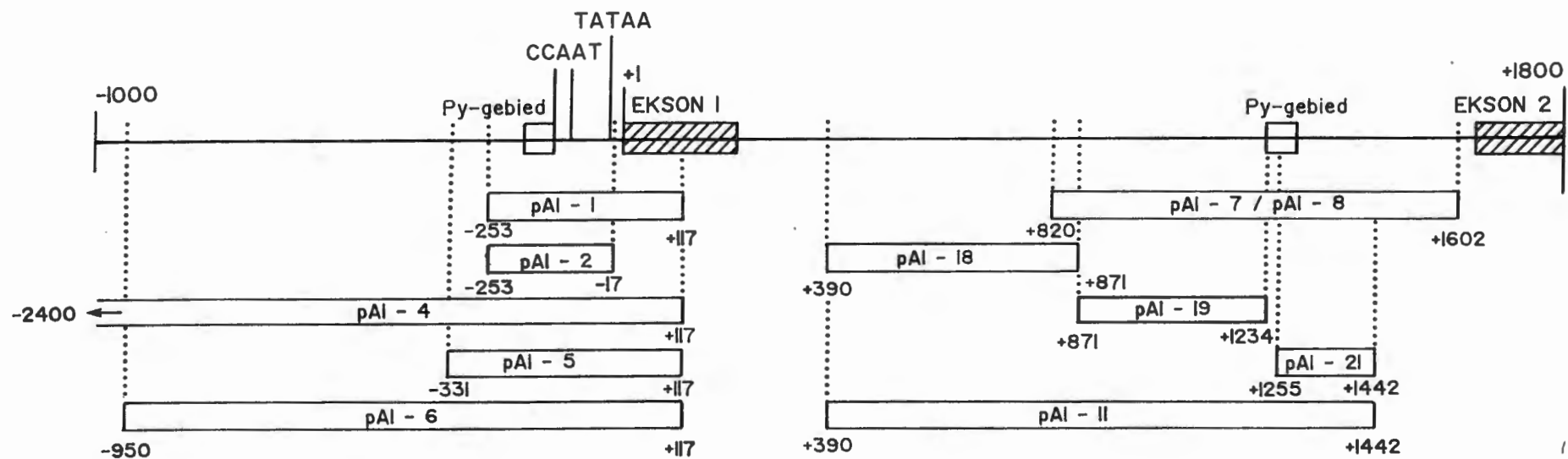
Om die akkuraatheid en effektiwiteit van transkripsie van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen te bestudeer, is fragmente van die promotorgebied aan die promotorlose $\alpha 1$ -globiengene, wat as merkergeen gebruik is, gekoppel om sodoende die bydrae van elke fragment tot transkripsie te bepaal. Hierdie funksionele toetse is in die *X. laevis* oösietsisteem en in die meer homoloë transfeksiesisteem uitgevoer. Die verskillende gebiede wat tydens die funksionele analise in hierdie studie ondersoek is, word in Figuur 9.1. gegee. In 'n eerste reeks eksperimente is 'n chimeriese geen met 'n promotorgebied (-253 tot +117) stapsgewys verleng tot -2400 bp stroom-op van die transkripsie-inisiasiepunt (pAI-1 tot pAI-6). In 'n tweede reeks eksperimente is die 782 bp Sma I-fragment van die eerste intron van die pro- $\alpha 1$ (I)-geen ondersoek deur dit in die eerste intron van die $\alpha 1$ -globiengene in te voeg sodat die posisie van die intron relatief tot die promotor nageboots kon word (pAI-7 tot pAI-10). In samehang met die resultate in Tabel 5.1 en Tabel 5.2 is die volgende waarnemings gemaak:

1. Die relatiewe transkripsiewaardes van pAI-1 (-253 tot +117) en pAI-2 (-253 tot -17) is bykans dieselfde, naamlik $0,49 \pm 0,16$. Die gebied tussen -17 en +117 is dus 'n relatief neutrale gebied waarin geen *cis*-werkende elemente voorkom wat 'n positiewe of negatiewe invloed op die vlakke van transkripsie kan uitoefen nie.
2. Die gebied tussen -253 en -17 (pAI-2) bevat genoegsame inligting om transkripsie te bewerkstellig en kan daarom as die minimale promotor beskou word.

3. Verlenging van die promotorgebied na -331 (pAI-5) en na -950 (pAI-6) het slegs 'n matige toename in die relatiewe transkripsievlaakke tot gevolg gehad. Die gebied tussen -950 en -253 beskik dus nie oor sterk inhiberende of aktiverende elemente nie.
4. Verdere verlenging van die promotorgebied na -2400 (pAI-4) resulteer in 'n relatiewe transkripsiewaarde van $6,3 \pm 1,5$, wat 'n vyftienvoudige verhoging in transkripsiewaarde is. Die gebied tussen -2400 en -950 beskik dus oor *cis*-werkende elemente wat as aktiveerders kan optree en die transkripsievlaakke oor 'n betreklike groot afstand kan beïnvloed.
5. ***Bona fide***-gebiede vir die inisiasie van transkripsie sowel as translasie, word benodig soos uit die relatiewe transkripsiewaarde van $0,06 \pm 0,04$ van pAI-3 (wat nie oor hierdie punte beskik nie), afgelei kan word.
6. 'n Sestigvoudige verhoging in die relatiewe transkripsiewaarde is verkry wanneer die 782 bp Sma I-fragment (+820 tot +1602) op 'n kloksgewyse-oriëntasie (pAI-7) ingevoeg word. 'n Tienvoudige toename in relatiewe transkripsiewaarde is met die antikloksgewyse-oriëntasie (pAI-8) verkry.
7. Bykans geen verhoging in die relatiewe transkripsiewaarde is waargeneem wanneer die 782 bp Sma I-fragment 950 bp stroom-op van die transkripsie-inisiasiepunt (pAI-9) ingevoeg word nie. 'n Agtienvoudige toename in die relatiewe transkripsiewaarde is egter met die antikloksgewyse-oriëntasie (pAI-10) verkry.
8. 'n Honderdvoudige verhoging in die relatiewe transkripsiewaarde van pAI-7 (pW1001) is verkry na transfeksie in NIH 3T3-fibroblaste en 'n twaalfvoudige verhoging van die relatiewe transkripsiewaarde in die omgekeerde oriëntasie (pW1002).

9. Uit die vyf verskillende sellyne wat tydens die transfektiesistiem getoets is, toon die promotor 'n uitdrukkingspesifisiteit vir NIH-3T3 fibroblaste, terwyl bykans geen uitdrukking in C127 muis fibroblastagtige selle plaasvind nie.
10. Die waarnemings in punte 6 tot 9 kan saamgevat word deur te stel dat die 782 bp Sma I-fragment (+820 tot +1602) as aktiveringsvolgorde optree op 'n oriëntasievoorkeurbasis en op 'n selspesifieke wyse. Soortgelyke voorkeure van posisie is ook al by ander sellulêre aktiveringsvolgordes waargeneem (Serfling *et al.*, 1985a). Reguleringselemente wat weefsel- en selspesifieke uitdrukking van gene beheer, is meestal 5' tot die inisiasiepunt vir transkripsie gelokaliseer (Maniatis *et al.*, 1987). Soortgelyke elemente kom waarskynlik in die minimale promotor voor wat saam met pAI-7/8 getoets is en kan 'n moontlike verklaring vir die selspesifieke uitdrukking van die geen in NIH-3T3 fibroblaste wees.

In teenstelling met die resultate van hierdie funksionele ondersoek, het ander navorsers negatiewe reguleringsgebiede in sowel die promotorgebied as die geïdentifiseerde aktiveringsvolgorde waargeneem. Eksperimentele gegewens wat met die resultate van hierdie studie ooreenstem, is egter ook waargeneem. Die resultate van al hierdie navorsers, soos verkry uit die literatuur, is in Afdeling 2.3.3.2 bespreek en in Figuur 2.3 saamgevat. Hiervolgens het Karsenty en De Crombrughe (1990) en Rippe *et al.* (1989), net soos in hierdie studie (punt 1), vergelykbare transkripsionele aktiwiteit in die gebiede -222 en +16 en -222 en +116 van die muis pro- $\alpha 1$ (I)-geen se promotorgebied waargeneem. Hierdie twee groepe het die gebied tussen -220 en +16 ook as 'n minimale promotor geïdentifiseer. Vergelyking tussen die 5'-oorvleuelende gebied van die mens en muis pro- $\alpha 1$ (I)-geen toon 'n 80% homologie in die DNA-volgorde, terwyl die gebied tussen -125 en -1 slegs 'n 9% afwyking tussen die twee spesies toon (Ramirez *et al.*, 1985). Hierdie hoë mate van homologie maak dit dus moontlik om die muis-en mensresultate te vergelyk.



Figuur 9.1 Gebiede van die mens pro- $\alpha 1(I)$ -geen wat met behulp van funksionele analyses ondersoek is om reguleringsgebiede te identifiseer.

'n Tienvoudige afname in transkripsie-aktiwiteit is deur Karsenty en De Crombrughe (1990) en Rippe *et al.* (1989) in die gebied tussen -220 en -2500 waargeneem. Dit staan duidelik in teenstelling met die resultate van hierdie studie (punte 3 en 4). Hierdie navorsers het egter in teenstelling met hierdie studie waar die resultate ten opsigte van dieselfde gebied slegs met data uit die oösietsisteem verkry is, van die transfeksiesisteem met NIH-3T3 fibroblaste gebruik gemaak. Hoewel die resultate van hierdie groep verkry is uit meer homoloë sisteem as in hierdie studie, en daar 'n moontlikheid bestaan dat daar 'n sterk inhibeerder in die gebied tussen -2500 en -2400 bestaan (die verskil tussen die twee resultate), is daar 'n groter waarskynlikheid dat hierdie afname te wyte is aan selspesifieke uitdrukking, veral as die transfeksieresultate van hierdie studie (punt 8) in ag geneem word. Die gebied van -2500 tot -220 beskik dus waarskynlik oor ('n) positiewe en negatiewe element(e) wat op 'n selspesifieke wyse funksioneer.

Publisering van die resultate van hierdie funksionele ondersoek en die identifisering van aktiveringsaktiwiteit in die eerste intron (Rossouw *et al.*, 1987) het tot heelwat teenstrydighede gelei ten opsigte van die aktiveringsvolgorde in die eerste intron van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen. Ander navorsers het egter onafhanklik van bogenoemde ondersoek, ook aktiveringsvolgordes in die eerste intron van die muis pro- $\alpha 2$ (I)-geen (Rossi en De Crombrughe, 1987) en die muis pro- $\alpha 1$ (I)-geen (Horton *et al.*, 1987) waargeneem, wat aantoon dat die eerste intron beslis 'n bydrae tot aktivering van transkripsie lewer. Die navorsingsgroep van Bornstein kon nie deur middel van CAT-aktiwiteitbepalings, enige aktiveringsaktiwiteit in die geïdentifiseerde aktiveringsvolgordegebied in die mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen waarneem nie. Daarteenoor het hierdie groep 'n sterk inhiberende element van 274 bp wat binne die waargenome aktiveringsvolgorde geleë is, geïdentifiseer. Hierdie 274 bp-gebied is geleë tussen +820 en +1093 (Bornstein *et al.*, 1987). Verdere ondersoek van hierdie groep het egter aan die lig gebring dat sterker inhibisie van transkripsie voorkom in die antikloksgewyse-oriëntasie as die natuurlike oriëntasie en dat inhibisie in 'n baie kleiner mate by BHK- en HeLa-selle as in CTF-selle waargeneem word. Hierdie tendens bevestig die waargenome selspesifisiteit van die promotor soos waargeneem in die transfeksie-eksperimente in hierdie studie (Tabel 5.2). In 'n ondersoek na die

274 bp inhiberende element het die groep van Bornstein egter verder bevind dat by langer fragmente (+544 tot +1407) wat die 274 bp-gebied insluit, die inhiberende effek opgehef word. Die naasliggende gebiede speel dus 'n rol in die regulering van die inhiberingsaktiwiteit. Hulle het verder waargeneem dat slegs matige inhibisie met die +855 tot +1407-fragment in die omgekeerde oriëntasie voorkom en dat die gebied tussen +1093 en +1407 oor positiewe elemente beskik. Die gebied tussen +544 en +855 het in enige oriëntasie 5' tot die kollageenpromotor 'n tweevoudige aktivering tot gevolg gehad. Verder het 'n ondersoek met die hele intronsegment verhoging in transkripsie veroorsaak (Bornstein en McKay, 1988). Die moontlikheid bestaan dus dat 'n negatiewe element in die gebied tussen +820 en +1093 geleë is. Die aangrensende gebiede kan egter die inhiberingseffek ophef deur moontlike positiewe elemente geleë tussen +1093 en +1407. Die aktiveringsaktiwiteit tussen +820 en +1607 soos in hierdie studie waargeneem is, kan dan verklaar word deur opheffing van die inhibisie effek deur faktore geleë in die gebied vanaf +1093 tot +1602. Die laer waarde wat in hierdie studie in die omgekeerde oriëntasie voorkom (pAI-8), kan moontlik verder toegeskryf word aan die hoër inhiberende effek van die negatiewe element in die omgekeerde oriëntasie. Bornstein en McKay (1988) het verder waargeneem dat die 5'-gebied geleë tussen -800 en -300 bydra tot die inhiberingseffek van die 274 bp-element. In hierdie studie is egter slegs 'n promotorgebied van -253 tot -17 gebruik, wat 'n verdere rede is waarom die inhiberende effek soos deur Bornstein se groep waargeneem, nie in hierdie studie waargeneem is nie.

In 'n verdere ondersoek na reguleringsgebiede in die eerste intron van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen is vier intronfragmente op soortgelyke wyse as die ander fragmente, in die oösietsisteem bestudeer. Uit die resultate wat in Tabel 5.1 gegee word, kan die volgende waarnemings gemaak word:

- * 'n Bykans sestienvoudige en agt-en-twintigvoudige verhoging in relatiewe transkripsiewaardes is onderskeidelik met pAI-19 (+871 tot +1234) en pAI-21 (+1234 tot +1442) waargeneem. Beide gebiede is binne die waargenome aktiveringsvolgorde geleë. Die laer waarde van pAI-19 as in pAI-21 kan

miskien toegeskryf word aan die 274 bp negatiewe element (+820 tot +1093) wat Bornstein waargeneem het en wat deur die aangrensende volgorde tussen +1093 en +1234 opgehef word. Hierdie resultate impliseer verder dat sterk positiewe elemente in die gebied tussen +1442 en +1602 geleë is om tot die sestigvoudige verhoging in aktiwiteit tussen +820 en +1602 by te dra.

- * Die gebied geleë tussen +390 en +1442 (pAI-11) het slegs 'n twaalfvoudige verhoging in die relatiewe transkripsiewaardes tot gevolg. Indien die resultate van pAI-7, pAI-19 en pAI-21 in ag geneem word, wil dit dus voorkom of 'n negatiewe element tussen +390 en +871 geleë is. Die relatiewe transkripsiewaarde van hierdie gebied alleen (pAI-18) toon 'n sestenvoudige toename in transkripsiewaarde. Uit hierdie resultate en die resultaat van Bornstein *et al.* (1987) dat 'n negatiewe element tussen +820 en +1093 geleë is, kan die gevolgtrekking gemaak word dat daar wel 'n negatiewe element in die gebied soos deur Bornstein *et al.* (1987) geïdentifiseer is, voorkom, maar dat die inhiberende effek van hierdie element deur die kondisies gebruik in hierdie studie deur die naasliggende gebiede opgehef word, sodanig dat slegs 'n effense inhibisie in die transkripsiewaardes waarneembaar is.

'n Negatiewe element geleë in die gebied tussen +550 en +950 is deur Rippe *et al.* (1989) in die muis pro- α 1(I)-geen geïdentifiseer, wat die resultate van hierdie studie verder ondersteun. Hierdie groep het verder waargeneem dat daar 'n effens positiewe element tussen +950 en +1200 geleë is en 'n neutraal tot negatiewe element tussen +1200 en +1400. Die positiewe element tussen +950 en +1200 stem ooreen met die resultate wat verkry is met pAI-19 (Tabel 5.1). Die negatiewe effek tussen +1200 en +1400 kom egter glad nie ooreen met die waardes verkry in hierdie studie nie. Die verskil kan waarskynlik geleë wees in die promotorfragment van -220 tot +117 wat deur Rippe *et al.* (1989) gebruik is teenoor die -253 tot -17 promotorfragment wat in hierdie studie gebruik is (Afdeling 5.2). 'n Verdere bevestiging van aktiveringsaktiwiteit in die eerste intron van die mens pro- α (I)-geen is die waarneming van die groep van Boast *et al.* (1990). Hulle het aktivering van transkripsie na transfeksie in mens fetale fibroblaste waargeneem indien die 782 bp Sma I-

fragment in die kloksgewyse-oriëntasie ingevoeg is. Hulle het egter waargeneem dat transkripsionele aktivering slegs plaasvind in die teenwoordigheid van 'n promotor wat strek vanaf -800 bp. Verkleining van die promotorgebied na -331 het die aktivering van transkripsie in die mens fetale fibroblaste opgehef. Uit die resultate wil dit dus voorkom asof daar tussen -800 en -300 *cis*-werkende elemente geleë is wat die aktiveringseffek van die 782 bp aktiveringsvolgordegebied reguleer of dat die verskil in die transkripsionele aktivering die gevolg is van verandering in die ruimtelike konfigurasie van die reguleringsvolgorde .

Uit die resultate van die funksionele analise van die pro- α 1(I)-kollageengeen in hierdie studie en in samehang met die literatuur, kan dus gestel word dat:

- * Die gebied -253 to -17 oor genoegsame elemente beskik om as minimale promotor op te tree;
- * die gebied tussen -17 en +117 as 'n neutrale gebied beskou kan word;
- * die gebied tussen +390 en +1602 oor verskeie positiewe en negatiewe elemente beskik. Een van hierdie negatiewe elemente is geleë in die gebied rondom +820 en +1093, terwyl die verskillende positiewe elemente die inhiberende effek ophef en 'n aktiveringsvolgorde vorm wat oriëntasie- en selspesifiek is in die gebied rondom +820 en +1602. Positiewe elemente geleë tussen +475 en +820 dra verder tot die opheffing van die inhiberende effek by; en
- * stroom-opvolgordes in die 5'-oorvleuelende gebied bydra tot sel- en weefsel-spesifisiteit, terwyl positiewe en negatiewe elemente in die gebied tussen -2500 en -253 geleë is wat transkripsie beïnvloed.

Die promotor- en introngebied beskik dus oor *cis*-werkende reguleringsgebiede wat transkripsie sowel positief as negatief kan beïnvloed, waarskynlik deur koöperatiewe DNA-proteïeninteraksies tussen hierdie twee gebiede. Sel- of weefsel-spesifisiteit

word verder ook bepaal deur spesifieke interaksie tussen DNA-bindingsproteïene, wat in sekere selle of weefsels uitgedruk of aktief is, en *cis*-werkende elemente wat in elke weefselspesifieke geen teenwoordig is. Ander faktore wat die interaksie van weefselspesifieke *trans*-werkende faktore met die *cis*-elemente kan beïnvloed, is die metileringsstatus van die DNA en ook die chromatienkonformasie (Boast *et al.*, 1990). Die beste wyse waarop hierdie komplekse interaksies bestudeer kan word, is deur transgeniese muise waar die getransfekteerde gene aan normale ontwikkelingsprosesse blootgestel word. In so 'n studie het Su *et al.* (1990) die totale mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen bestudeer en waargeneem dat die uitdrukking van die mens transgene, weefsel-spesifiek is en dat die mens-spesifieke $\alpha 1$ -mRNA-vlakke met dié van die endogene $\alpha 1$ -mRNA-vlakke vergelykbaar is. Daar is verder deur Slack *et al.* (1993) waargeneem dat die gebied -444 tot -2300 van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen noodsaaklik is vir die korrekte kwantitatiewe uitdrukking van die chimeriese gene in weefsels soos stert, been en vel van die transgeniese muise. Uit die resultate van die funksionele analyses in hierdie studie (Hoofstuk 5) en ook uit die literatuurgegewens wat hier bespreek is, kan die afleiding gemaak word dat die gebied -444 tot -2300 wat die gebied -800 tot -331 aangetoon deur Boast *et al.* (1990) as noodsaaklik om uitdrukking van die aktiveringsvolgorde in mens fetale fibroblaste te verkry, insluit, oor sowel positiewe as negatiewe reguleringselemente beskik wat sel- en weefselspesifiek is.

Dat die eerste intron verder ook 'n rol speel in die regulering van die pro- $\alpha 1$ (I)-geen is aangetoon deur die blokkering van transkripsie van die geen in fibroblaste en ander mesenchiemweefsel na die integrasie van die M-MuL-virus in die eerste intron van die pro- $\alpha 1$ (I)-geen (Slack *et al.*, 1993). Hierdie blokkering van transkripsie word geassosieer met faktore wat weefselspesifiteit beïnvloed, soos die metileringsvolgorde en die chromatienkonformasie van die proksimale promotor. Dit is egter interessant dat integrasie van die virus nie die uitdrukking van die geen in osteoblaste en odontoblaste beïnvloed nie. Dit toon dat laasgenoemde selle waarskynlik deur 'n alternatiewe meganisme gereguleer word. Hierdie alternatiewe meganisme betrek dan waarskynlik ander *cis*-werkende elemente wat weer op hul beurt ander *trans*-werkende groeperinge van DNA-bindingsproteïene bind (Slack *et al.*, 1993).

Die identifisering van die rol van bepaalde geengebiede in die regulering van die geenuitdrukking met behulp van die funksionele benadering, het daartoe aanleiding gegee dat hierdie gebiede verder ontleed is om die eienskappe van elemente wat tot die regulering bydra, te karakteriseer en verder te kan beskryf.

9.3 IDENTIFISERING VAN DIE BINDINGSGBIEDE VAN DNA-BINDINGSPROTEÏENE

Verskillende metodes soos MPE-Fe(II), hidroksiel-radikaal, DMS-, Cu(phen) $^{2+}$ - en DNase I-analises (Tullius *et al.*, 1987) is beskikbaar om bindingsgebiede van DNA-bindingsproteïene in DNA te identifiseer. Hoewel elke tegniek sy eie voor- en nadele het, het DNase I-afskermingsanalise homself bewys as 'n eenvoudige, sensitiewe en betreklik betroubare tegniek vir die identifisering van bindingsgebiede en word dit algemeen deur die meeste navorsingsgroepe toegepas (Galas en Schmitz, 1978). Soos wat egter in Hoofstuk 6 aangetoon is, moet al die kondisies eers geoptimaliseer word alvorens betekenisvolle resultate met DNase I-analise verkry kan word.

Koedood (1993) het met NIH-3T3-fibroblaste en BJA-B-limfosiet kernekstrakte vyf afskermingsgebiede in die minimale promotorgebied van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen waargeneem. By hierdie twee seltipes is verskille in afskerming egter oor veral die pirimidienryke gebied en die twee CCAAT-homologieë waargeneem. Die resultate wat Koedood met NIH-3T3 ruwe kernekstrak verkry het, is soortgelyk aan die waarnemings van Brenner *et al.* (1989) en Karsenty en De Crombrughe (1990) by die muis pro- $\alpha 1$ (I)-promotorgebied. In Hoofstuk 6 is die identifisering van die bindingsgebiede op die verskillende kollageengeenfragmente met ruwe kern-ekstrakte geïsoleer uit BJAB-B en HeLa-selle beskryf. In teenstelling met Koedood (1993) wat verskillende afskermingspatrone tussen Tipe I kollageenuitdrukke selle (NIH-3T3) en nie-uitdrukke selle (BJA-B) waargeneem het, is in hierdie ondersoek (Hoofstuk 6) geen verskil in die uitdrukingspatroon tussen BJA-B en HeLa-kernekstrakte waargeneem nie. Hoewel HeLa-selle beskou word as selle wat onder normale omstandighede in staat is om tipe I kollageen uit te druk, kan die feit dat

geen verskil in uitdrukking in hierdie studie tussen HeLa en BJA-B ruwe kern-ekstrakte waargeneem is nie, daaraan te wyte wees dat van die faktore nie so selspesifiek vir HeLa as vir NIH-3T3-selle is nie. Hierdie moontlikheid word deur die data van die transfeksie-eksperimente in hierdie studie (Tabel 5.2) ondersteun, waar die relatiewe transkripsievlakke van pW1001 in NIH-3T3-fibroblaste bykans 'n honderdvoudige verhoging toon teenoor slegs 'n vyfvoudige verhoging in HeLa-selle. Groot gebiede van afskerming is by die onderskeie kollageenfragmente en SV40-DNA waargeneem tydens DNase I-afskerminganalise met die HeLa en BJA-B ruwe kernekstrakte, maar in die meeste gevalle was hierdie afskermingsgebiede so groot dat individuele bindingsgebiede nie onderskeibaar is nie (Afdeling 6.3.1.). Hierdie groot gebiede van afskerming toon verder dat 'n groot aantal transkripsiefaktore aan die DNA bind en verskillende transkripsiefaktore waarskynlik oorvleuelende bindingsgebiede het.

Die gebruik van die meer suiwer proteïen-selektrakte, die S-300 kolom-gesuiwerde HeLa en BJA-B-fraksies, was daarop gerig om meer onderskeibare bindingsgebiede vir spesifieke DNA-bindingsproteïene te identifiseer (Afdeling 6.3.2.). In die geval van SV40-DNA is bindingsgebiede wat ooreenstem met die bindingsgebiede vir Ap1- en Sp1-proteïene, soos deur Mitchell *et al.* (1987) vir die SV40-DNA beskryf is, geïdentifiseer (Figuur 6.8). Geen afskermingsgebiede is met behulp van hierdie fraksies in die CX-fragment wat die minimale promoter insluit, waargeneem nie. Aangesien slegs Ap1- en Sp1-afskerming spesifiek met hierdie S-300-fraksies by die SV40 waargeneem is en geen afskerming van ander verwagte proteïene nie, is die resultaat met die CX-fragment verklaarbaar deurdat geen Ap1 of Sp1-afskerming in latere DNase I-afskermingsanalises met onderskeidelik suiwer Sp1 en Ap1-proteïene in hierdie fragment waargeneem is nie (Figuur 7.5). Die afskermingsgebiede in die Rsa I - Hind III-fragment wat wel in die teenwoordigheid van die S-300-fraksies verkry is, is ooreenkomstig moontlike Sp1 en in sommige gevalle selfs moontlike Ap2-bindingsgebiede.

Hoewel kleiner gebiede van afskerming met die S-300-fraksies waargeneem kan word, in teenstelling met die groot afskermingsgebiede wat met ruwe kernekstrakte

aangetoon is, het die suiwerder S-300-fraksies nie aan die verwagtinge voldoen nie en kon slegs algemene bindingsgebiede vir die transkripsiefaktore geïdentifiseer word in plaas van individuele bindingsgebiede. Derhalwe is die gebruik van suiwer DNA-bindingsproteïene 'n noodsaaklike uitbreiding van hierdie resultate sodat individuele bindingsgebiede vir die verskillende transkripsiefaktore geïdentifiseer kan word. 'n Moontlike bydraende faktor tot die teleurstellende resultate met die S-300-fraksies, is waarskynlik die feit dat die fraksies al in 1988 geïsoleer is. Hoewel die fraksies by -70°C geberg is, het die bindingsaktiwiteit van die proteïene waarskynlik as gevolg van temperatuurwisseling al heelwat afgeneem en kan dit moontlik selfs by van die meer sensitiewe proteïene te laag wees om binding waar te neem.

9.4 IDENTIFISERING VAN *trans*-WERKENDE FAKTORE

Weinig DNA-bindingsproteïene vir die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen is al geïdentifiseer. Van die drie spesifieke bindingsproteïene wat in hierdie studie ondersoek is, is twee Sp1-bindingsgebiede deur Slack *et al.* (1993) in die Sma I - Rsa I-fragment geïdentifiseer (Figuur 7.52 nr 4 en nr 5) en 'n Ap1-bindingsgebied is deur Liska *et al.* (1990) in die mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen geïdentifiseer. Hierdie Ap1-bindingsgebied wat geïdentifiseer is, is in die Sma I - Sma I-gebied van die pro- $\alpha 1$ (I)-geen van hierdie studie geleë. Die enigste ander *trans*-werkende faktore wat vir die Tipe I kollageengeen geïdentifiseer, maar nie in hierdie studie bestudeer is nie, is CBF en NF1 (Hatamochi *et al.*, 1986; Nehls *et al.*, 1991). Verder is twee onbekende inhiberingsfaktore deur Karsenty en De Crombrughe (1990) in die muis pro- $\alpha 1$ (I)-geen geïdentifiseer (vergelyk Figuur 2.3). Die bindingsgebiede van al die verskillende bindingsproteïene in die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageen word almal in Figuur 9.2 aangetoon.

Die suksesvolle gebruik van die suiwer proteïene Sp1, Ap1 en Ap2 in DNase I-afskermingsanalises vir die identifisering van spesifieke bindingsgebiede in die DNA is met behulp van die SV40-DNA wat as "standaard" in hierdie studie gebruik is, beskryf. Die resultate wat in Figuur 7.3 gegee word, stem ooreen met die resultate

in die literatuur wat Imagawa *et al.* (1987) en Mitchell *et al.* (1987) met die SV40-DNA verkry het en ondersteun verder die suksesvolle gebruik van die SV40-DNA as "standaard". Gebruik van die suiwer proteïene met die verskillende kollageenfragmente het verskeie Sp1, Ap1 en Ap2-bindingsgebiede in die DNA aangetoon.

9.4.1 Sp1

Uit die literatuur is dit bekend dat Sp1 transkripsie met behulp van die RNA-polimerase II-ensiem tien- tot vyftigvoudig kan verhoog vanaf promotors wat oor ten minste een Sp1-bindingsgebied beskik, soos byvoorbeeld die mens MT-IIa-geen (Kadonaga *et al.*, 1986). Sp1-responsiewe promotors bevat gewoonlik meer as een Sp1-bindingsgebied, soos byvoorbeeld die SV40-vroeë promotor met ses, die HSV-IE-3 promotor met vyf en die vigsvirus LTR met drie Sp1-bindingsgebiede (Kadonaga *et al.*, 1986; Jones *et al.*, 1986). Die verskillende Sp1-bindingsgebiede in die promotor tree dan saamwerkend op om transkripsie te aktiveer. Hierdie saamwerking toon aan dat proteïen-proteïeninteraksie tussen faktore direk of deur 'n verdere intermediêre proteïen, belangrik is vir transkripsionele aktivering. Die vermoë van Sp1 om transkripsie op 'n saamwerkende wyse te aktiveer, kan die gevolg wees van koöperatiewe binding van die Sp1-monomere aan die DNA of as gevolg van interaksie met die transkripsionele aktiveringsdomeine (Kadonaga *et al.*, 1986; Anderson en Freytag, 1991). Uit die literatuur is dit bekend dat die glutamienryke aktiveringsdomein van die Sp1-proteïene selektief en direk aan die TATA bindingsproteïen (TBP) kan bind en so transkripsie kan stimuleer. Hierdie direkte binding vind plaas deur die vorming van waterstofbande en hidrofobiese interaksie. Die glutamienryke aktiveringsdomein kan verder ook direk aan TAF110 bind en waarskynlik word maksimale aktivering van transkripsie verkry deur die gelyktydige binding van die glutamienryke aktiveringsdomein aan TBP en TAF110 (Emili *et al.*, 1994).

Waarnemings uit die literatuur toon dat oor die algemeen geen koöperatiewe binding, tussen naasliggende Sp1-bindingsgebiede waargeneem word nie waarskynlik as gevolg van steriese hindernisse. Koöperatiewe binding word beskou as daar waar binding

van Sp1 aan een bindingsgebied afhanklik is van binding van Sp1 aan 'n tweede gebied. Voorbeelde hiervan is onder meer by die arginiensuksinaatsintetase-promotor en SV40-vroeë promotor waargeneem (Gidoni *et al.*, 1985; Courey *et al.*, 1989; Anderson en Freytag, 1991). 'n Uitsondering waar koöperatiewe binding egter wel tussen twee Sp1-bindingsgebiede waargeneem is, is in die HSV tk-geen. Mutasie-analise het duidelik getoon dat die tweede Sp1-bindingsgebied eers volledig beset moet wees voordat Sp1-binding aan die eerste Sp1-bindingsgebied plaasvind. Maksimale aktivering kom dan voor indien beide Sp1-bindingsgebiede beset is (Everett *et al.*, 1993).

Die ses verskillende Sp1-bindingsgebiede in die SV40-vroeë promotor word elk met 'n ander bindingsaffiniteit deur Sp1 gebind. Die feit dat geen koöperatiewe binding tussen die naasliggende Sp1-bindingsgebiede voorkom nie, toon dat die hoë bindingsaffiniteit vir Sp1-bindingsgebied V en die lae bindingsaffiniteit vir bindingsgebied IV waarskynlik die gevolg is van oorvleueling en dat bindingsgebied V deur steriese hindernis, binding van Sp1 aan bindingsgebied IV verhoed (Gidoni *et al.*, 1984; 1985). Verskillende bindingsaffiniteite van Sp1 aan twee identiese Sp1-bindingsgebiede is egter ook waargeneem soos in die geval van die tk-geen. Soos by SV40, is die swakker bindingsaffiniteit waargeneem by die Sp1-bindingsgebiede mees proksimaal tot die TATA-homologie en die transkripsionele inisiasiepunt. Mutasies in hierdie bindingsgebiede het egter 'n groter invloed op die transkripsionele aktivering as mutasies in die ander Sp1-bindingsgebiede met 'n hoër bindingsaffiniteit vir Sp1. Dit is moontlik dat die TATA-motief interaksie tussen Sp1 en ander proteïene bevorder en dat die spesifieke rangskikking van die Sp1-bindingsgebiede tot groter buigsaamheid in die beheer van die promotoraktiwiteit lei (Dyanan *et al.*, 1985; Jones en Tjian, 1985). Die posisie van die bindingsgebiede speel dus ook 'n belangrike rol in die aktivering van transkripsie.

In hierdie studie is sestion Sp1-bindingsgebiede, waaraan Sp1 met verskillende bindingsaffiniteit bind, in die gebied tussen -442 en +1697 van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-kollageengeen geïdentifiseer (Hoofstuk 7). Bestudering van die kaart in Figuur 7.52, wat ter vergelyking weer in Figuur 9.2 gegee word, toon hierdie Sp1-bindingsgebiede

aan en dui op 'n paar interessante verskynsels. Ten spyte van verskeie potensiële Sp1-bindingsvolgordes in die promotorgebied van die DNA, is geen Sp1-binding in hierdie gebied sowel as die 5'-oorvleuelende gebied tot en met -442 met behulp van DNase I-afskermingsanalises waargeneem nie (Figuur 7.4 - 7.6). Dit is in ooreenstemming met die resultate van Brenner *et al.* (1989) en Karsenty en De Crombrughe (1990) wat geen Sp1-binding in die promotorgebied wat in die Cla I - Xba I-fragment van hierdie studie geleë is, kon waarneem nie. Daarteenoor het Nehls *et al.* (1991) wel Sp1-binding by die distale CCAAT-motief in die muis pro- $\alpha 1$ (I)-geen waargeneem. Die waarneming van hierdie Sp1-binding was egter slegs te wyte aan verandering in die magnesium en DNase I-konsentrasies tydens DNase I-afskermingsanalise. Verlaging van die magnesiumioonkonsentrasie het die affiniteit van Sp1 vir hierdie Sp1-bindingsgebied verhoog. Hierdie DNase I-kondisies is egter nie in hierdie studie gebruik nie. Elektronmikroskopiese analise van die CX-fragment (Figuur 8.9) toon egter 'n voorkeurbindingspiek vir Sp1 aan bo die agtergrond binding, wat ooreenkom met die gebied waar hierdie waargenome Sp1-bindingsgebied van Nehls *et al.* (1991) geleë is. Die frekwensie van kompleksvorming in hierdie CX-fragment is slegs 'n fraksie hoër as die frekwensie van Sp1-kompleksvorming in die kontrole-DNA, naamlik 4,5% teenoor 3,7%. Die DNA-volgorde waar hierdie Sp1-binding in die muis pro- $\alpha 1$ (I)-geen plaasvind, is identies aan die ooreenkomstige mens pro- $\alpha 1$ (I)-geengebied en resultate kan met mekaar vergelyk word. Daar kan dus aanvaar word dat met soortgelyke kondisies vir DNase I-afskermingsanalise as wat Nehls *et al.* (1991) gebruik het en uit die resultaat van die elektronmikroskopiese analise, dat hierdie Sp1-binding ook in die mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen teenwoordig is. Die frekwensiewaardes van die elektronmikroskopiese analise toon egter dat dit 'n baie lae Sp1-bindingsaffiniteit vir die Sp1-bindingsvolgorde het. Hierdie lae bindingsaffiniteit kan op tweeërlei wyse verklaar word. Eerstens, die Sp1-bindingsvolgorde 5'-GGGGCCGGGC-3' waaraan hierdie Sp1 bind het 'n enkel nukleotiedverandering van G $\rightarrow$ C ten opsigte van die Sp1-konsensusvolgorde. Uit die literatuur is bekend dat 'n G $\rightarrow$ C-verandering in die Sp1-bindingsvolgorde in nukleotiedposisie 4, 6, 7 of 8 'n drastiese verlaging in Sp1 bindingsaffiniteit tot gevolg het (Jones *et al.*, 1986). Tweedens is hierdie Sp1-bindingsgebied naby die TATA-motief en die inisiasiepunt vir transkripsie geleë. Die lae bindingsaffiniteit-Sp1-bindingsgebiede van

die SV40 en tk-gene kom ook proksimaal tot hierdie punte voor. Sp1-bindingsgebiede wat hier geleë is, het egter 'n groot invloed op die aktivering van transkripsie (Gidoni *et al.*, 1985; Jones *et al.*, 1985).

Benewens die GC-ryke 12 bp-herhalingsvolgorde waaraan die Sp1-bindingsproteïene kan bind, is daar rondom die CCAAT-homologieë ook reeds twee ander transkripsiefaktore, naamlik CBF (Hatamochi *et al.*, 1986) en NF1 (Nehls *et al.*, 1991) waargeneem wat beide aan die proksimale CCAAT-motief bind (vergelyk Figuur 9.2). Binding van 'n CCAAT-bindingsfaktor en Sp1 is ook by die HSV-tk-promotor waargeneem waar gevind is dat die CTF (CCAAT-transkripsiefaktore) eerder aan die CCAAT-homologie as aan die GC-motief van Sp1 bind en dat die CTF tesame met Sp1 optree om transkripsie te reguleer (Kadonaga *et al.*, 1986). Binding van NF1 aan die proksimale CCAAT-homologie geniet volgens Nehls *et al.* (1991) egter voorkeur bo die binding van CBF, aangesien waargeneem is dat die meeste CCAAT-homologie bindingsfaktore met enige gegewe CCAAT-volgorde sal bind as gevolg van volgordes aanliggend tot die CCAAT-volgorde (Chodosh *et al.*, 1988). Verder oorvleuel die NF1 en Sp1-bindingsgebiede en kan Sp1 inmeng met die binding van NF1 en sodoende help met die regulering van uitdrukking. Wat ook al die geval is, is dit duidelik dat die gebied rondom die twee CCAAT-homologieë betrokke is by die transkripsionele regulering van hierdie geen.

'n Verdere interessante waarneming ten opsigte van die waargenome bindingsgebiede is dat agt Sp1-bindingsgebiede in die aktiveringsvolgordegebied in die eerste intron voorkom. Dat 'n groot aantal Sp1-bindingsgebiede in 'n betreklik klein DNA-gebied kan voorkom, is al waargeneem, maar dan is dit gewoonlik in die promotorgebied soos in die geval van die SV40-promotor waar ses Sp1-bindingsgebiede aangetref word. Die feit dat slegs een baie lae-affiniteit Sp1-bindingsgebied in die pro- $\alpha 1$ (I)-kollageenpromotor voorkom en agt Sp1-bindingsgebiede met bindingsaffiniteite wisselend tussen medium en hoog in die aktiveringsvolgorde voorkom, laat die gedagte ontstaan dat daar moontlik 'n verband tussen hierdie gebiede kan bestaan. In die model van lusvorming wat later in die hoofstuk voorgehou word (Figuur 9.4), kom hierdie agt Sp1-bindingsgebiede teenoor die promotorgebied deur lusvorming te

lande en kan dan deur proteïen-proteïen interaksie betrokke raak by transkripsionele aktivering van die geen. Sp1-selfassosiasie asook interaksie tussen Sp1 en ander bindingsproteïene is deur elektronmikroskopiese analise in die literatuur en in hierdie studie waargeneem (Afdeling 8.3.1). Li *et al.* (1991) het ook reeds by die beespapillomavirus waargeneem dat bindingsproteïene gebonde aan die aktiveringsvolgorde deur direkte interaksie met proteïene proksimaal tot die transkripsie-inisiasiepunt, nader aan die promotorgebied gebring word.

Geïdentifiseerde potensiële Sp1-bindingsgebiede soos dit met die rekenaaranalise in die gebied tussen -442 en +1697 waargeneem is (Figuur 7.1) en waaraan geen Sp1-binding plaasvind nie, se nie-binding deur die Sp1-proteïene is waarskynlik te wyte aan die aangrensende volgordes tot die Sp1-heksanukleotiedkonsensusvolgorde 5'-GGGCGG-3' (Jones en Tjian, 1985). Terselfdertyd speel hierdie aangrensende volgordes ook 'n rol in die bindingsaffiniteit van die Sp1-proteïene wat wel aan die Sp1-bindingsvolgordes bind (Jones *et al.*, 1986). Die potensiële-Sp1-bindingsgebiede in die Eco RV - Pvu II-fragment en die Cla I - Xba I-fragment waaraan geen Sp1 gebind het nie, bevat 'n A- of T-substitusie in die heksonukleotiedkonsensusvolgordes. Dat die hekspanukleotied 5'-GGGCGG-3' opsigself nie eksklusief vir Sp1-binding verantwoordelik is nie, is al by die vigsvirus LTR aangetoon, waar Sp1-binding aan volgordes met 'n A-substitusie in die hekspanukleotied waargeneem is (Jones *et al.*, 1986). Die afwesigheid van binding aan hierdie Sp1-bindingsgebiede in die pro- $\alpha 1$ (I)-geen toon egter benewens die substitusie, dat die aangrensende volgordes ook nie geskik is vir Sp1-binding nie. Ook by die Sp1-bindingsvolgorde in die Xba I - Sac I-fragment wat oor 'n konsensus Sp1-hekspanukleotied beskik is geen binding waargeneem nie (Figuur 7.6). Die afwesigheid van binding aan 'n konsensus Sp1-hekspanukleotied is ook al by die tk-geen waargeneem (Jones *et al.*, 1985) Indien die aangrensende volgordes egter in ag geneem word by die kollageengebied sodat 'n dekanukleotied daargestel word, word bevind dat daar drie nukleotiedafwykings ten opsigte van die algemene konsensusvolgorde soos verkry uit Kadonaga *et al.* (1986) aangetref word, naamlik 5'AGGGCGGTGG-3'. Hierdie drie afwykings kan 'n bydraende rol tot die afwesigheid van Sp1-binding speel.

Die kwantitatiewe bepaling van die bindingsaffiniteitkonstantes van die proteïene aan die DNA kan 'n bydraende rol speel om die komplekse reguleringsmeganisme van geenuitdrukking te verstaan. Bindingsaffiniteit en bindingskonstantes in hierdie studie is op twee wyses bepaal, naamlik deur vloeistofsintillasiespektrometrie en densitometrie van die outoradiogramme na DNase I-afskermingsanalise. 'n Ander kwantitatiewe metode wat ook in die literatuur gebruik word, is die metode van vertragingsegalanalise. Die nadeel van hierdie metode is egter dat dit nie kan onderskei tussen interaksies by verskillende bindingspunte in die DNA nie, maar 'n makroskopiese gemiddelde konstante van al die bindingspunte gee (Ackers *et al.*, 1983). Aangesien daar in die meeste gevalle meer as een proteïenbindingsgebied in die DNA in hierdie studie voorkom, is van kwantitatiewe DNase I-afskermingsanalise gebruik gemaak. Uit die resultate wat in hierdie studie verkry is, wil dit voorkom of die densitometriese metode die beter metode van die twee kwantifiseringsmetodes is. Te veel faktore beïnvloed die sintillasiewaardes, soos die blussingsfaktor, vervaltempo van die peiler en die korrekte posisionering van die outoradiogramme op die gedroogde gel voordat die bande uitgesny word. Veral laasgenoemde faktor speel 'n taamlike groot rol in die identifisering van aangrensende of oorvleuelende bindingsgebiede. Derhalwe is daar in hierdie studie meer waarde geheg aan die waardes wat deur middel van densitometrie verkry is. 'n Belangrike punt wat in gedagte gehou moet word in die bepaling van bindingsaffiniteite in hierdie studie, is die feit dat elke geïdentifiseerde bindingsgebied se bindingsaffiniteit bepaal is asof hierdie bindingsgebied nie by enige koöperatiewe interaksie betrokke is nie. Hoewel dit bekend is dat die Sp1-bindingsgebiede oor die algemeen nie koöperatief bind nie, is daar ook voorbeelde van koöperatiewe interaksie in die literatuur (McKnight *et al.*, 1984) en kan hierdie moontlikheid by die kollageen Sp1-bindingsgebiede nie uitgesluit word nie. Aangesien die rekenaarprogram wat in hierdie studie gebruik is egter nie in staat is om die koöperatiewe interaksie tussen twee bindingsgebiede in ag te neem nie, moet die berekende bindingsaffiniteitkonstantes en die vrye energiewaardes in hierdie studie slegs as 'n aanduiding van bindingsaffiniteit beskou word. Enkele Kd-waardes wat vanuit die literatuur bekend is, is die van GCN4 met 'n Kd-waarde van $2 \times 10^{-8} \text{M}$, 'n cAMP-responsiewe element in rot ruwe kernekstrak met 'n Kd-waarde van ongeveer 10^{-10}M (Li *et al.*, 1989), MLTF met 'n Kd-waarde van 10^{-10} tot $4 \times$

10^{-12} M, NF1 met 'n Kd-waarde van $2,1 \times 10^{-11}$ M en die *Drosophila* hiteskoktranskripsiefaktor met 'n Kd-waarde van 4×10^{-12} M (Letovsky en Dynan, 1989). Die bepaling van die Kd-waardes van Sp1-oligonukleotiede met 'n substitusie van A of T of G in die plek van C in die heksanukleotied 5'-GGGCGG-3' is ook deur Letovsky en Dynan (1989) onderneem. Hulle het waargeneem dat die Kd-waarde vir die Sp1-konsensusvolgorde 5'-GGGCGG-3' $4,1 \pm 0,7 \times 10^{-10}$ M is, vir die T-substitusie $2,3 \pm 0,1 \times 10^{-9}$ M, die A-substitusie $1,2 \pm 0,1 \times 10^{-9}$ M en die G-substitusie $1,2 \pm 0,04 \times 10^{-8}$ M. Hulle het verder waargeneem dat die C $\rightarrow$ G-substitusie ooreenkom met 'n vrye energiewaarde van ongeveer 2 kcal/mol wat ooreenstem met die verlies van twee waterstofbande. Sp1 bind aan die groot groef van die DNA en hierdie C $\rightarrow$ G-substitusie toon dat kontak met die groot groef belangrik is vir herkenning.

Die bepaling van die bindingskonstantes van die Sp1-bindingsgebiede in die SV40-DNA was nie so suksesvol in hierdie studie nie. Uit die literatuur blyk dat bindingsgebiede III en V hoë affiniteitsgebiede is, II en VI medium en I en IV lae affiniteitsgebiede is (Kadonaga *et al.*, 1986). Hoewel hierdie tendens in die DNase I-afskermingsanalises in Figuur 7.12 en Figuur 7.13 waargeneem kan word, het die twee kwantifiseringsmetodes op die twee stringe 'n redelike variasie in die resultate gegee (Figuur 7.16). Waarskynlik die grootste bydraende faktor tot hierdie verskil in resultate is dat die Sp1-konsentrasiereeks nie groot genoeg was nie en die versadigingspunt van die bindingsgebiede nie bereik is nie. By die kollageenfragmente waar meestal van 'n meer uitgebreide konsentrasiereeks gebruik gemaak is, is meer vergelykbare resultate tussen die twee DNA stringe met dieselfde kwantifiseringsmetode waargeneem (Figure 7.17 tot 7.30).

Twee Sp1-bindingsgebiede is in die Sma I-fragment van die eerste intron geïdentifiseer (Figure 7.23 en 7.24). Hoewel beide bindingsvolgordes oor die Sp1-konsensusheksanukleotied beskik, bind die eerste Sp1-bindingsgebied Sp1 met 'n medium affiniteit en die tweede bindingsgebied Sp1 met 'n hoë affiniteit (Tabel 7.8). Bindingsgebied 1 met aangrensende volgordes bestaan uit 5'-TGGGCGGGTG-3' en bindingsgebied 2 bestaan uit 5'-GGGGCGGGGT-3'. Laasgenoemde bindingsgebied kom ooreen met die medium affiniteitsbindingsgebied van HSV-IE-3(II) (Kadonaga

et al., 1986). Die feit dat hierdie bindingsgebied 'n hoë affiniteit in die kollageen-geen vertoon in plaas van 'n medium affiniteit soos by die HSV-IE-3-geen, kan aan verskillende faktore toegeskryf word waarvan een die metode van affiniteitsbepaling kan wees. Die laer bindingsaffiniteit van die eerste Sp1-bindingsgebied kan aan die G → T-substitusie van die eerste nukleotied en die GT → TG-substitusie van die laaste twee nukleotiede te wyte wees.

Twee van die drie geïdentifiseerde Sp1-bindingsgebiede in die Rsa I - Sma I-fragment kom oorvleuelend voor en is gevolglik as een bindingspunt gemeet om bindingsaffiniteit te bepaal (Tabel 7.9). Hierdie oorvleuelende Sp1-bindingsgebied sowel as die ander Sp1-bindingsgebied is reeds deur Slack *et al.* (1993) in 'n oorsigartikel in die literatuur beskryf. Hoewel hierdie groep slegs twee Sp1-bindingsgebiede noem, is daar in hierdie studie afskerming oor die totale gebied van die twee oorvleuelende bindingsvolgordes waargeneem en word die gebied derhalwe as twee oorvleuelende Sp1-bindingsvolgordes beskou. Hierdie twee oorvleuelende gebiede kom onderskeidelik met die lae en medium affiniteitsbindingsgebiede van Sp1 in die arginiensuk-sinaatsintetasegeen ooreen (Anderson en Freytag, 1991). Die gesamentlike affiniteit van hierdie twee oorvleuelende Sp1-gebiede is as 'n lae affiniteitsgebied bereken. Die tweede Sp1-bindingsgebied in hierdie kollageenfragment is uniek en is nie in die literatuur by ander gene waargeneem nie. Die volgorde waaraan gebind is, is 5'-AGCGCGGTGG-3', wat met vier nukleotiede van die Sp1-konsensusvolgorde afwyk en 'n medium bindingsaffiniteit vertoon.

Bindingsaffiniteit van die agt Sp1-bindingsgebiede in die Rsa I - Hind III-fragment toon bykans almal 'n medium affiniteit vir Sp1 (Tabel 7.10). Die eerste twee aangrensende bindingsgebiede is as een gemeet en dit kan verklaar waarom dit as 'n hoë bindingsaffiniteit waargeneem word. Die derde Sp1-bindingsgebied kom ooreen met die vierde Sp1-bindingsgebied van die SV40-vroeë promotor (Kadonaga *et al.*, 1986). Hierdie gebied word as 'n medium tot hoë affiniteitsgebied in die kollageen-fragment waargeneem teenoor die medium affiniteit in die SV40-promotor. Hierdie waarde lê egter op die grens tussen medium en hoog as die kriteria wat in hierdie studie gebruik is, in ag geneem word (Afdeling 7.3.1.1.). Die ander metingsmetode

naamlik vloeistofsintillasiespektrometrie wat in hierdie studie gebruik is, toon hierdie bindingsgebied as 'n medium affiniteitsgebied aan. Die ander vyf Sp1-bindingsvolgordes beskik almal oor 'n C $\rightarrow$ A-substitusie in die Sp1-heksanukleotied, wat die rede mag wees dat medium affiniteitsbindingsgebiede in plaas van hoë affiniteitsgebiede waargeneem word (Letovsky en Dynan, 1989).

In die laaste kollageenfragment, die 250 bp Hind III - Rsa I-fragment, is die twee oorvleuelende gebiede as 'n enkele bindingsaffiniteitsgebied gemeet en is hulle as 'n medium affiniteitsgebied waargeneem (Tabel 7.11). Die derde Sp1-bindingsvolgorde vertoon weer 'n unieke bindingspunt vir Sp1, hoewel 'n ooreenkoms van sewe nukleotiede met die HBV nukleokapsiedgeen waargeneem is (Zhang *et al.*, 1993). Hierdie hoë affiniteitsbindingsgebied wyk met twee T-substitusies van die Sp1-konsensusvolgorde af, naamlik 5'-GGGGCGTTTGT-3', maar in hierdie geval het die substitusies klaarblyklik geen invloed op die bindingsaffiniteit nie.

Die K_d-waardes vir Sp1 wat in hierdie studie bereken is, is tussen 10⁻¹³ en 10⁻¹⁴ M teenoor die 10⁻⁸ tot 10⁻¹⁰ M soos verkry deur Letovsky en Dynan (1989). Die verskil in waardes kan toegeskryf word aan verskillende bindingskondisies, berekeningsmetodes en die feit dat koöperatiewe interaksie nie in hierdie studie in ag geneem is nie. Die K_d-waardes van MLTF van 10⁻¹⁰ tot 10⁻¹² M en die *Drosophila* hittedkoktranskripsiefaktor van 10⁻¹² M toon egter dat die berekende Sp1-affiniteitskonstantes van hierdie studie nagenoeg dieselfde grootte is. 'n Oorsig van die verskillende Sp1-bindingsgebiede met hul bindingsaffiniteit is in Tabel 9.1 gegee.

Die verskillende Sp1-bindingsgebiede wat waargeneem is in die gebied -442 tot +1697 is deur elektronmikroskopiese analises bevestig (Afdeling 8.3.1). Sp1-selfassosiasie soos waargeneem deur Su *et al.* (1991) en Li *et al.* (1991), is ook by hierdie fragmente waargeneem in persentasies tussen 13 en 22% (Tabel 8.1). Sp1-selfassosiasie is tussen die kollageenfragment en die plasmied-DNA waargeneem, terwyl binding van twee molekules aan dieselfde Sp1-molekule ook waargeneem is.

Die feit dat die elektronmikroskopiese resultate ooreenstem met soortgelyke analyses van ander gene in die literatuur, bevestig dat die mika-tegniek wat in hierdie studie vir elektronmikroskopiese analise gebruik is, 'n betroubare en bruikbare tegniek is.

9.4.2 Ap1

Binding van Ap1 is in promotors sowel as in aktiveringsvolgordes waargeneem en is in staat om transkripsie te aktiveer (Angel *et al.*, 1987, Lee *et al.*, 1987). Ap1-bindingsgebiede is in die aktiveringsvolgordes van onder meer SV40 en mens MT-IIa gene waargeneem terwyl dit ook in promotors van die mens- en konyn-kollagenasegeen, mens α -galaktosidase A-geen en mens IL-3-geen voorkom (Lee *et al.*, 1987b, Bishop *et al.*, 1988; Sirum-Connolly *et al.*, 1991). Die meganisme waardeur Ap1-volgordes geregleer word om spesifieke en maksimale respons op stimuli te verkry, is waarskynlik deur koöperatiewe interaksie met ander elemente. So tree Ap1 met ander stroom-opelemente op in die stromelisiengene-promotor, benodig Ap1 ander elemente om te reageer op forbol in geaktiveerde T-selle en benodig dit transkripsiefaktor PEA3 vir maksimale respons op forbol in die kollagenasegeenpromotor (Sirum-Conolly *et al.*, 1991). Daar is verder waargeneem dat Ap1 'n transkripsiefaktor is wat met aktiveringsvolgorde-elemente interaksie ondergaan en dat die aktiwiteit van die proteïen geregleer word deur die selle met TPA te behandel (Lee *et al.*, 1987b).

In die literatuur is drie Ap1-bindingsgebiede in verskillende kollageengene beskryf. Vikkula *et al.* (1992) het 'n Ap1-bindingspunt in die gebied -555 tot -548 van die mens pro- α 1(II)-geen waargeneem, Vuorio en De Crombrughe (1990) 'n Ap1-bindingspunt in die gebied -122 tot -106 van die pro- α 1(III)-geen terwyl Liska *et al.* (1990) 'n Ap1-bindingspunt in die gebied +589 tot +614 in die eerste intron van die mens pro- α 1(I)-geen waargeneem het. Laasgenoemde Ap1-bindingspunt, maar met twee substitusies in die konsensvolgorde, is ook in die rot pro- α 1(I)-geen waargeneem. Mutering van hierdie Ap1 toon 'n verlies van transkripsionele aktiwiteit in die gebied +292 tot +670. Bepaling van Ap1-bindingsgebiede in hierdie studie van die pro- α 1(I)-kollageengeen tussen -445 en +1697 het een Ap1-bindingsvolgorde

geïdentifiseer in die Sma I-fragment (Figuur 7.7). Hierdie bindingsgebied kom ooreen met die Ap1-bindingsgebied wat deur Liska *et al.* (1990) geïdentifiseer is. 'n Tweede Ap1-bindingsgebied is tydens elektronmikroskopiese analise op pGEM-BB5(A)-DNA in hierdie studie waargeneem (Figuur 8.57) en word in Figuur 9.2 aangetoon. Hierdie gebied is geleë tussen -727 en -735, maar is nie tydens DNase I-afskermingsanalises waargeneem nie, aangesien dit buite die studieveld van die -442 tot +1697 gebied geleë is. Die pGEM-BB5(A)-DNA beskik egter oor 'n 5 kb Bam HI-gebied van die mens pro- $\alpha 1$ (I)-geen wat 'n heelwat groter gebied van die geen bevat. Hoewel hierdie Ap1-bindingsvolgorde nie op dieselfde posisie geleë is as die Ap1-bindingsvolgorde in óf die pro- $\alpha 1$ (II)- óf die pro- $\alpha 1$ (III)-gene nie, toon hierdie waarneming egter wel dat daar 'n Ap1-bindingsvolgorde in die 5'-stroom-opgebied van pro- $\alpha 1$ -gene voorkom. Die rol wat hierdie Ap1-bindingsgebied in die 5'-stroom-opgebiede van die pro- $\alpha 1$ -gene ten opsigte van die regulering speel is egter nog onbekend en behoort in 'n volgende studie ondersoek te word.

Bindingsaffiniteit van Ap1 vir die Ap1-bindingsgebiede in SV40 soos in hierdie studie bepaal, kom in 'n redelike mate ooreen met die bindingsaffiniteit wat in die literatuur beskryf word. Die bindingsaffiniteit van die eerste bindingsgebied is nie bekend nie, terwyl die tweede en die derde bindingsgebiede onderskeidelik as hoë en lae bindingsaffiniteitgebiede waargeneem is (Lee *et al.*, 1987b; Coleman *et al.*, 1992). In hierdie studie is die bindingsaffiniteit van die SV40 Ap1-bindingsgebiede, soos verkry met behulp van densitometrie van die koderende string, onderskeidelik op medium, hoog, en laag bereken, terwyl op die teenoorgestelde string al drie as hoog bereken is. Die verskil in waardes lê in eksperimentele foute tussen die twee stelle resultate in Figuur 7.31 en 7.32 onderskeidelik. Aangesien die waardes wat vir die koderende string bereken is meer ooreenkom met die tendens van bindingsaffiniteit wat in die literatuur beskryf word, is dit as meer korrek beskou.

Uit die resultate van Figuur 7.33 en 7.34 kan afgelei word dat Ap1 'n baie hoë affiniteit vir die Ap1-bindingsgebied in die Sma I-kollageenfragment het. Kwantifisering van die bindingsaffiniteit bevestig dan ook dat hierdie bindingsgebied 'n hoë affiniteitbindingsgebied is met 'n Kd-waarde van ongeveer 1×10^{-12} M (Tabel 7.13

en Tabel 9.1). Hierdie waarde val in dieselfde kategorie as die Kd-waardes vir MLTF en die *Drosophila* hittedkoktranskripsiefaktor (Letovsky en Dynan, 1989). 'n Verdere bewys van die hoë bindingsaffiniteit wat die Ap1-proteïene vir sy bindingsvolgordes het, is met die elektronmikroskopiese analise waargeneem. Die hoëaffiniteit van hierdie proteïene vir die DNA het aanleiding gegee tot groot multiproteïenkomplekse, selfs in die teenwoordigheid van baie lae proteïenkonsentrasies (Afdeling 8.3.3). Hierdie lae proteïenkonsentrasies wat tydens elektronmikroskopiese analyses gebruik is, het egter lae frekwensie van bindingskomplekse by minder hoëaffiniteitsgebiede tot gevolg gehad (Tabel 8.3). Die proteïenkonsentrasies kon egter nie vir hierdie gevalle verhoog word nie, omdat die verskillende fragmente se vermoë om DNA-proteïenkomplekse te vorm, vergelykbaar moet wees en derhalwe moes kondisies sover moontlik konstant gehou word.

9.4.3 Ap2

Soos in die geval van Sp1 en Ap1, is Ap2 in die literatuur geïdentifiseer as 'n transkripsionele aktiveerder. Hierdie proteïene het egter selspesifieke eienskappe, so byvoorbeeld word SV40 en mens MT-IIa-gene se transkripsie gestimuleer, maar nie die van die MSV-promotor nie en word Ap2 in HeLa-selle maar nie HepG2-selle aangetref (Imagawa *et al.*, 1987; Mitchell *et al.*, 1987). Die groep van Mitchell het verder ook waargeneem dat Ap2 op 'n gekoördineerde wyse met Sp1 funksioneer om die sintese van RNA te stimuleer. Laasgenoemde waarneming kan moontlik die groot getal Ap2-bindingsgebiede wat in hierdie studie in die promotorgebied waargeneem is, verklaar (Figuur 7.52 en Figuur 9.2). Die model wat later in hierdie hoofstuk voorgestel word, toon dat die verskillende Sp1-bindingsgebiede in die aktiveringsvolgorde teenoor die Ap2-bindingsgebiede in die promotor gebring word en die Sp1 en Ap2-proteïene kan dan op 'n gekoördineerde wyse transkripsie stimuleer. Terselfdertyd kan dit ook bydra tot die waarneming dat hierdie promotor, soortgelyk aan die SV40-vroeë promotor, 'n sterk promotor is (Koedood, 1993) aangesien Sp1 en Ap2 ook in die SV40-promotor op gekoördineerde wyse optree (Mitchell *et al.*, 1987).

Twee-en-twintig Ap2-bindingsgebiede is in hierdie studie in die gebied tussen -442 en +1697 geïdentifiseer (Figuur 7.52), waarvan heelwat van hulle met die konsensusvolgordes ooreenkom. Benewens hierdie Ap2-bindingsgebiede kom daar ook enkele Ap2-bindingsgebiede voor wat uniek is aan die kollageengeenfragment en wat ook 'n mate van ooreenkoms met ander reeds bekende Ap2-bindingsgebiede toon. In die Eco RV - Pvu II-fragment kom die eerste Ap2-bindingsgebied gedeeltelik ooreen met die medium bindingsaffiniteitsgebied vir Ap2 in die mens groeiormoon-geen (Imagawa *et al.*, 1987). In hierdie studie is die bindingsaffiniteit van die bindingsvolgorde egter as hoog (Tabel 7.15) waargeneem en kan die verskil in affiniteit waarskynlik te wyte wees aan die nukleotiedverskille tussen die twee bindingsgebiede. In die derde Ap2-bindingsgebied wat in hierdie fragment geïdentifiseer is, kom die Ap2-volgorde gedeeltelik met die hoë bindingsaffiniteitsgebied in die mens-groeiormoon-geen ooreen (Imagawa *et al.*, 1987). In hierdie studie is die bindingsaffiniteit egter laag en kan die verskil in bindingsaffiniteit te wyte wees aan die verskil in die bindingsvolgorde tussen die twee DNA-bindingsgebiede in die twee gene.

Die derde Ap2-bindingsgebied in die Cla I - Xba I-fragment is identies aan die hoë affiniteit-Ap2-bindingsgebied in SV40 (Mitchell *et al.*, 1987). Bindingsaffiniteit resultate in hierdie studie toon hierdie gebied ook as 'n hoë bindingsaffiniteitsgebied aan. Die laaste Sp1-bindingsgebied in die Cla I - Xba I-fragment toon 'n mate van ooreenkoms met die medium affiniteitsgebied in die mens MT-IIa-geen (Imagawa *et al.*, 1987). In die kollageengeen toon hierdie afskerming egter 'n hoë bindingsaffiniteit. Hierdie verskil in bindingsaffiniteit is waarskynlik te wyte aan die verskil in DNA-volgorde van die twee bindingsgebiede. In die Xba I - Sac I-fragment kom 'n medium Ap2-bindingsvolgorde voor wat ooreenkomste met die medium bindingsaffiniteit Ap2-bindingsgebied van die hc-myc-geen het (Imagawa *et al.*, 1987). Funksionele analise van hierdie DNA-gebied het aangetoon dat dit 'n redelike neutrale gebied van transkripsionele aktiwiteit is (Rossouw *et al.*, 1987; Bornstein *et al.*, 1988). Analise van hierdie Xba I - Sac I-gebied met die drie faktore wat in hierdie studie gebruik is, toon ook dat weinig proteïenbindingsgebiede vir Sp1, Ap1 en Ap2 daarin voorkom (vergelyk Figuur 9.2). Slegs twee Ap2-bindingsgebiede wat beide

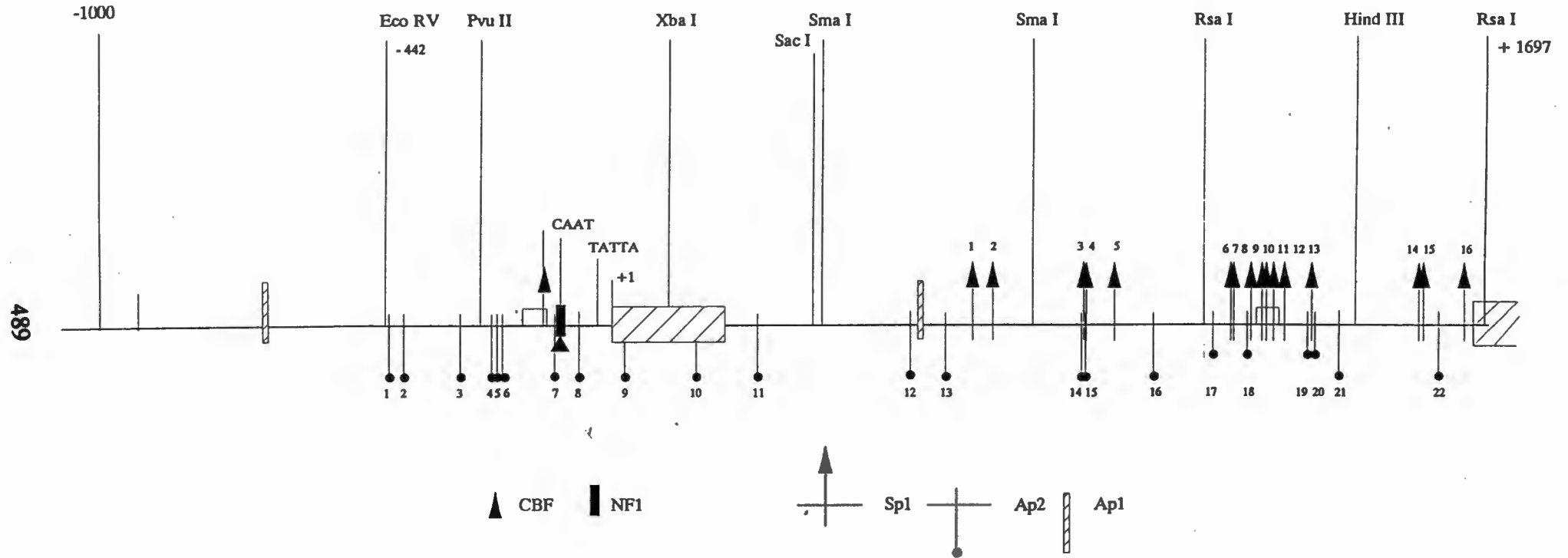
'n medium affiniteit vir hul Ap2-bindingsvolgordes het, word in hierdie fragment aangetref (Tabel 7.17). Ook die Sma I-fragment vertoon slegs twee medium affiniteitsgebiede vir Ap2 (Tabel 7.18). Die medium bindingsaffiniteit kan deur die voorgestelde model verklaar word deurdat in die model die Ap2-bindingsgebiede in die DNA lus geleë is en nie direk betrokke is by proteïen-proteïeninteraksies sover dit Ap2, Sp1 en Ap1 aangaan nie.

In die Sma I - Rsa I-fragment is die derde Ap2-bindingsgebied identies aan die hoë affiniteit-Ap2-bindingsgebied in SV40 (Mitchell *et al.*, 1987) en is dié gebied in hierdie studie ook as 'n hoë-affiniteitbindingsgebied geïdentifiseer. 'n Vergelyking tussen die K_d-waardes van hierdie volgorde wat in sowel die Cla I - Xba I en Sma I - Rsa I-fragmente voorkom, toon dat die waardes vergelykbaar is, naamlik $3,3 \times 10^{-14}$ M en $4,7 \times 10^{-14}$ M. 'n Verdere waarneming in hierdie Sma I - Rsa I-fragment is die Sp1- en Ap2-bindingsvolgordes wat bo-op mekaar geleë is (Figuur 7.8). 'n Soortgelyke situasie is in die 21 bp-herhalingsgebied van SV40 waargeneem. Gelyktydige binding van Sp1 en Ap2 aan die SV40 DNA-gebied het 'n versterking van die totale afskermingsgebied getoon (Mitchell *et al.*, 1987). Gelyktydige binding van Sp1 en Ap2 aan die Sma I - Rsa I-fragment toon egter geen versterking of inhibisie van die totale afskermingsgebied nie.

Die Rsa I - Hind III-fragment wat 'n groot gebied van die aktiveringsvolgorde bevat en ook oor die pirimidienryke gebied beskik (Figuur 7.1), vertoon heelwat aktiwiteit ten opsigte van die drie bindingsproteïene wat in hierdie studie ondersoek is (Figuur 7.9). Benewens agt verskillende Sp1-bindingsvolgordes wat hier voorkom is daar ook vyf Ap2-bindingsvolgordes in hierdie gebied geïdentifiseer. Binding van Ap2 in hierdie studie het egter 'n interessante bindingspatroon getoon (Figuur 7.47 en Figuur 7.48). Uit die DNase I-afskermingsanalise kon slegs een Ap2-bindingsgebied in die teenoorgestelde DNA-string waargeneem word teenoor die vyf bindingsgebiede op die koderende string. Noukeurige bestudering van Ap2-binding aan die teenoorgestelde DNA-string in die teenwoordigheid van toenemende Ap2, toon egter 'n baie ligte afskerming in die gebied van Ap2-bindingsgebiede 19 en 20 (Figuur 9.2). Die Ap2-bindingsgebied wat in beide stringe geïdentifiseer is, toon 'n medium tot hoë

bindingsaffiniteit, terwyl die ander vier bindingsgebiede slegs 'n lae bindingsaffiniteit vertoon. Hierdie lae bindingsaffiniteit is waarskynlik 'n bydraende faktor tot die afwesigheid van binding op die nie-koderende string. Uit die voorgestelde model wat later bespreek word, kom hierdie Ap2-bindingsvolgordes te staan teenoor die Ap2-bindingsgebiede in die Cla I - Xba I promotorfragment en word binding van die lae Ap2-bindingsgebiede op die nie-koderende string moontlik deur Ap2-selfassosiasie ondersteun. Die verskillende Ap2-bindingsgebiede met hul bindingsaffiniteit word in Tabel 9.1 weergegee.

In die Rsa I - Hind III-fragment kom ook 'n gebied voor waar Sp1 en Ap2 op dieselfde DNA-volgorde bind. Gelyktydige binding van die proteïene aan die DNA (Figuur 7.51) toon geen versterking van die afskermingsgebied nie, hoewel die spesifieke versterkte bande wat karakteristiek is aan Sp1 nie in die gesamentlike afskermingsgebied voorkom nie. Dieselfde tendens is by die SV40-gebied waar beide Sp1 en Ap2 bind, waargeneem. Uit die SV40-data het Mitchell *et al.* (1987) afgelei dat die Sp1 en Ap2-bindingsgebiede sodanig geleë is dat interaksie tussen die proteïene fassiliteer word. Hulle het verder ook gestel dat die Ap2-proteïene waarskynlik die stabiliteit van die binding van Sp1 met die SV40-promotor verbeter. Hoewel die Sp1/Ap2 gebied van SV40 in die promotor geleë is en by die kollageen in die aktiveringsvolgorde, kan dieselfde afleidings tog vir die Rsa I - Hind III-fragment ook gemaak word. 'n Verdere ooreenkoms tussen hierdie kollageen Sp1/Ap2-gebied en die SV40-gebied, is dat beide gebiede se Ap2-bindingsvolgordes bestaan uit die gedeeltelike TGGG- en AGGC-bindingsvolgordes. Daarteenoor is die Sp1/Ap2-bindingsgebiede in die Sma I - Rsa I-fragment gewone volledige Ap2-bindingsgebiede. In laasgenoemde geval sou gespekuleer kon word dat Sp1 en Ap2 moontlik vir binding kompeteer, aangesien voorbeelde van Ap2-verplasing wel in die literatuur voorkom. 'n Voorbeeld hiervan is SV40, waar Ap3 en Ap2 oorvleuelende gebiede het en binding van Ap2 slegs voorkom indien binding van Ap3 geïnhibeer word (Mercurio en Karin, 1989). Uit die resultate van gelyktydige toevoeging van Ap2 en Sp1 by die Sma I - Rsa I-fragment (data nie getoon nie) word egter geen kompetisie vir binding waargeneem nie.



Figuur 9.2 Diagrammatiese voorstelling van alle geïdentifiseerde bindingsproteïene soos verkry uit die literatuur en hierdie studie

TABEL 9.1 SP1, AP1 EN AP2-BINDINGSPUNTE OP DIE KOLLAGEENFRAGMENT VANAF -445 TOT +1697 MET HUL ONDERSKEIE BINDINGSAFFINITEIT.

Sp1-bindingsgebiede		Bindingsaffiniteit			Bindingsaffiniteit
1.	5'-TGGGCGGGTG-3' 3'-ACCCGCCAC-5'	Medium	9.	5'-GGGAGG-3' 3'-CCCTCC-5'	Medium
2.	5'-GGGGCGGGGT-3' 3'-CCCCGCCCA-5'	Hoog	10.	5'-GGGAGG-3' 3'-CCCTCC-5'	Medium
3.	5'-GGGGCGGGG-3' 3'-CCCCGCCCC-5'	Laag	11.	5'-GGAGGG-3' 3'-CCTCCC-5'	Medium
4.	5'-GGGGCCGGG-3' 3'-CCCCGGCCC-5'	Laag	12.	5'-GGGGAGTGGC-3' 3'-CCCCTCACCG-5'	Medium
5.	5'-GCGCGGTGGG-3' 3'-CGCGCCACCC-5'	Medium	13.	5'-GGGAGGGCGGG-3' 3'-CCCTCCCGCCC-5'	Medium
6.	5'-GGGGCGGGGC-3' 3'-CCCCGCCCCG-5'	Hoog	14.	5'-GGGAGG-3' 3'-CCCTCC-5'	Medium
7.	5'-GGGTGG-3' 3'-CCCACC-5'	Hoog	15.	5'-GGGCGGG-3' 3'-CCCGCCC-5'	Medium
8.	5'-GGGGCGGGAT-3' 3'-CCCCGCCCTA-5'	Hoog	16.	5'-GAGGGGCGTT-3' 3'-CTCCCCGCAA-5'	Laag

Ap2-bindingsgebiede					
1.	5'-TGGGGCACAGCCAGGAGG-3' 3'-ACCCCGTGTCTGGTCTCTCC-5'	Hoog	12.	5'-GCCGTGGG-3' 3'-CGGCACCC-5'	Medium
2.	5'-CCCCTCCC-3' 3'-GGGGAGGG-5'	Medium	13.	5'-TGGGGCCGTGGGGG-3' 3'-ACCCCGGCACCCCC-5'	Medium
3.	5'-GCAGAGGGGCACCCCTACCCA-3' 3'-CGTCTCCCCGTGGGGATGGGT-5'	Laag	14.	5'-CCGCCCCC-3' 3'-GGCGGGGG-5'	Medium
4.	5'-GGCCCAGGC-3' 3'-CCGGGTCCG-5'	Hoog	15.	5'-CCCCGGCC-3' 3'-GGGGCCGG-5'	Medium
5.	5'-GGGCTGGGGG-3' 3'-CCCGACCCCC-5'	Hoog	16.	5'-AGGCATTGGCTGGCTTTGGGGACTGGGGA-3' 3'-TCCGTAACCGACCGAAACCCCTGACCCCT-5'	Hoog
6.	5'-CTGGGGA-3' 3'-GACCCCT-5'	Hoog	17.	5'-TGGGGGGGCCT-3' 3'-ACCCCCCGGA-5'	Laag
7.	5'-GGCTGGGGC-3' 3'-CCGACCCCG-5'	Medium	18.	5'-TGGG-3' 3'-ACCC-5'	Laag
8.	5'-CCGAGGGGC-3' 3'-GGCTCCCCG-5'	Laag	19.	5'-CCCCCGC-3' 3'-GGGGGGCG-5'	Laag
9.	5'-GGGAGTTTCTCCTCGGGGTCGGAG-3' 3'-CCCTCAAAGAGGAGCCCCAGCCTC-5'	Laag	20.	5'-GCCCTCCC-3' 3'-CGGGAGGG-5'	Laag
10.	5'-CCTCTTAGCGGCCACCGCCCTCCTGA-3' 3'-GGAGAATCGCCGGTGGCGGGAGGACT-5'	Medium	21.	5'-GCCAATGGG-3' 3'-CGGTTACCC-5'	Medium
11.	5'-CCCGGGGGCC-3' 3'-GGGCCCCCGG-5'	Medium	22.	5'-CCCGGGGG-3' 3'-GGGCCCCC-5'	Medium
Ap1-bindingsgebiede					
1.	5'-TGATTCA-3' 3'-ACTAAGT-5'	Hoog			

Aangesien ook geen versterking van afskerming waargeneem word nie, kan aanvaar word dat geen koöperatiewe interaksie tussen Sp1 en Ap2 plaasvind nie. Ap2 vertoon verder ook geen streng gekonserveerde volgorde-motief nie, wat impliseer dat Ap2 nie 'n verpligte assosiasie met naasliggende DNA-bindingsproteïene hoef te ondergaan nie. Dit maak die moontlikheid van verskillende kombinasies tussen die promotor en aktiveringsvolgorde se bindingsproteïene soveel groter (Mitchell *et al.*, 1987).

Elektronmikroskopiese analise van Ap2-binding aan die kollageen-DNA het die resultate van die DNase I-afskermingsanalises bevestig. Hoë affiniteit van die proteïen vir die DNA is tydens elektronmikroskopiese analise in hierdie studie waargeneem (Afdeling 8.3.2). Selfassosiasie is in meeste gevalle by verskillende kollageenfragmente waargeneem, terwyl die hoë affiniteit van die proteïen bygedra het tot die vorming van verskeie multiproteïenkomplekse of aggregate (Tabel 8.2). Verlagings in die proteïenkonsentrasie het die vorming van hierdie komplekse verminder, hoewel aggregaatvorming nog steeds waargeneem is.

9.5 VOORSTELLING VAN DIE REGULERING VAN TRANSKRIPSIE DEUR DIE GEÏDENTIFISEERDE ELEMENTE

DNA-volgorde motiewe vir moontlike Sp1-bindingsgebiede soos voorgestel in Figuur 2.2 is na identifisering van Sp1-bindingsgebiede in hierdie studie opgeklaar. Die Sp1-motiewe wat in Figuur 2.2 in die eerste intron aangetoon word, is almal geïdentifiseer as ware Sp1-bindingsgebiede, terwyl die Sp1-motiewe wat in die promotor en eerste ekson aangetoon is, geen Sp1-binding vertoon het nie. In Figuur 9.2 word 'n gedeelte van die 5'-oorvleuelende gebied tot en met die tweede ekson van die mens pro- α 1(I)-geen aangetoon met al die geïdentifiseerde bindingsproteïene soos uit die literatuur en hierdie studie verkry is daarop voorgestel. In die figuur kan gesien word dat Ap2, NF-1 en CBF aan die proksimale CCAAT-motief kan bind. In die literatuur is egter aangetoon dat NF-1 die vermoë besit om Ap2 te verplaas (Mercurio en Karin, 1989; Courtois *et al.*, 1990), terwyl Nehls *et al.* (1991) bevind het dat NF-1 bo die CBF verkies word. Die verplasing van Ap2 deur ander proteïene in verskeie gene is nie onbekend in die literatuur nie en kan derhalwe beskou word as 'n wyse van transkripsionele regulering.

Hoewel daar vordering gemaak word met die begrip van die struktuur en funksie van die transkripsiefaktore wat aan die promotors en aktiveringsvolgordes bind, is min nog oor die interaksie tussen hierdie gebiede bekend. Een van die modelle wat in die literatuur voorgestel word en wat algaande meer eksperimentele ondersteuning kry, is die lusvormingmodel van Ptashne (1986). Die konsep van die lusvormingmodel bestaan daaruit dat inisiasie van transkripsie gestimuleer word deur die interaksie tussen proteïene wat aan die promotor- en aktiveringsvolgorde-elemente gebind is. Die DNA wat tussen hierdie gebiede geleë is, vorm dan 'n lus om die interaksie moontlik te maak. Die agtergrond van die lusvormingmodel is van die prokariote afkomstig soos wat onder meer waargeneem is by die λ -faag repressor waar die proteïene wat op aanliggende punte op die heliese DNA geleë is transkripsie reguleer, deur aan mekaar te raak (Ptashne, 1986).

Ondersteuning van hierdie lusmodel is uit verskillende eksperimentele data in die literatuur verkry. Müller en Schaffner (1990) het aangetoon dat fisiese nabyheid van die promotor en aktiveringsvolgorde genoeg is om transkripsionele beheer vanaf 'n afstand toe te pas, onafhanklik van die feit of die twee reguleringsvolgordes op dieselfde DNA-molekule gelokaliseer is. Die aktiveringsvolgorde kan transkripsie dus selfs "*in trans*" stimuleer. Daar is verder waargeneem dat binding tussen die promotor en die aktiveringsvolgorde deur komponente van die algemene transkripsiemeganisme bewerkstellig word, wat 'n verdere bewys is dat eukariotiese transkripsiefaktore transkripsie op 'n samewerkende wyse stimuleer, dit wil sê faktore kan gelyktydig bind en nie noodwendig op 'n koöperatiewe wyse nie. Een van die teikens in die transkripsiemeganisme van bindingsproteïene gebonde aan die aktiveringsvolgorde, is die algemene transkripsiefaktore TFIIB en TFIID, waar interaksie met hierdie faktore as 'n snelheidsbepalende stap tydens die inisiasie van transkripsie beskou word (Kustu *et al.*, 1991).

Verdere ondersteuning in die literatuur van die lusvormingmodel is die waarneming deur Courey *et al.* (1989) dat distale en proksimale binding van Sp1, transkripsie op 'n samewerkende wyse kan stimuleer. Elektronmikroskopiese analyses het voorts getoon dat Sp1 proteïen-proteïen interaksie kan ondergaan, hetsy deur selfassosiasie of met ander proteïene met gepaardgaande lusvorming (Théveny *et al.*, 1987; Li *et*

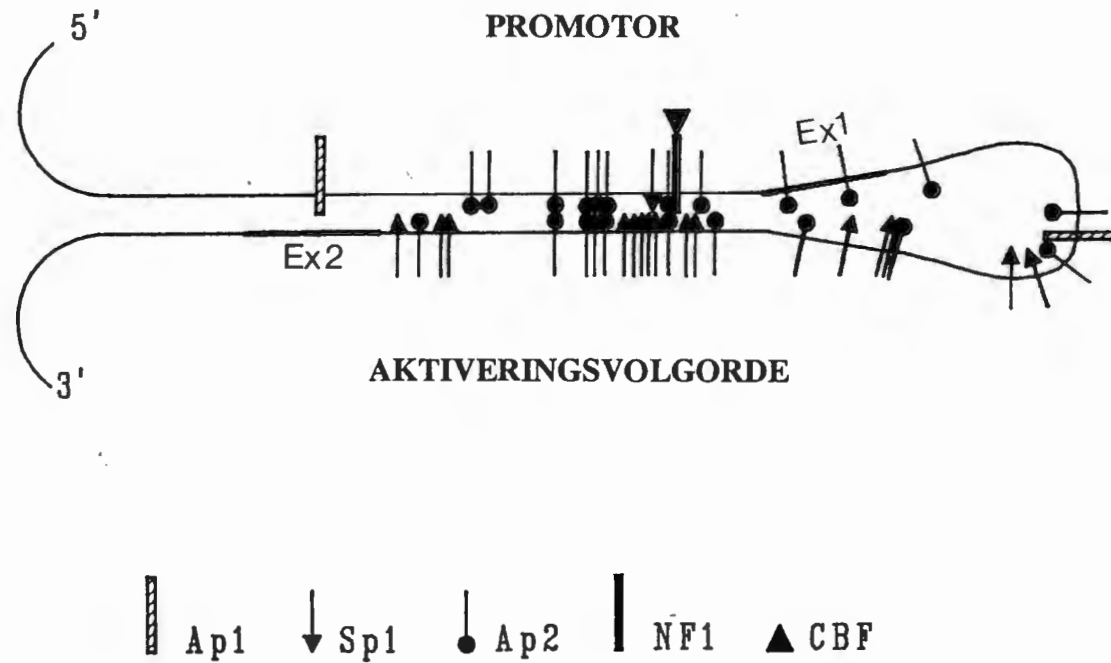
al., 1991; Su *et al.*, 1991). Deur middel van elektronmikroskopiese analyses kan die spesifieke bindingsgebiede van die proteïene bestudeer word sowel as die vermoë van die DNA-gebonde molekule om proteïen-proteïen interaksie te ondergaan. In hierdie studie het sowel Sp1 as Ap1 en Ap2-selfassosiasie van die proteïene ondergaan met gepaardgaande lusvorming (Hoofstuk 8). Hierdie selfassosiasie koppel dan twee afgeleë DNA-bindingsgebiede met mekaar. In hierdie studie is 'n soortgelyke waarneming gemaak as wat in die literatuur beskryf is (Su *et al.*, 1991), naamlik dat twee DNA-dubbelstringe deur 'n multi-Sp1-kompleks gekoppel word wat multi-proteïenassosiasie komplekse aantoon.

Uit vorige studies is bekend dat die promotor van die pro- α 1(I)-geen in die afwesigheid van die aktiveringsvolgorde steeds 'n sterk promotor is (Koedood, 1993), maar deur die funksionele toetse in hierdie studie is aangetoon dat die teenwoordigheid van die eerste intron 'n sterk bydrae tot transkripsionele aktivering lewer, (Hoofstuk 5). Die vraag het daarom ontstaan op watter wyse die aktiveringsvolgorde die effektiwiteit van die promotor vanaf 'n afstand kan beïnvloed, sodanig dat transkripsievlakke tot soveel as honderdvoudig in NIH-3T3-selle kan verhoog. Die lusvormingmodel van Ptashne het na die beste verklaring gelyk om 'n model voor te stel om die promotor en aktiveringsvolgorde van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen bymekaar te bring en sodoende transkripsie te aktiveer.

Die uitgangspunt van die model wat hier voorgestel word, is die twee pirimidienryke gebiede wat in die promotor en introngebiede van die pro- α 1(I)-kollageengeen aangetref word. Hierdie pirimidienryke gebiede is nie net homolog nie, maar kom onderskeidelik in die minimale promotorgebied by posisie -168 tot -137 en die aktiveringsvolgordegebied by posisie +1258 tot +1296 voor. Hibridisering van hierdie twee gebiede met mekaar vorm onder die regte toestande nie net 'n H-DNA-konformasie nie, maar bring terselfdertyd die promotor- en aktiveringsvolgordegebiede deur lusvorming bymekaar uit. 'n Skematiese voorstelling van die moontlike hibridisering tussen hierdie twee pirimidienryke gebiede word in Figuur 9.3 paneel A gegee. Die verskillende bindingsproteïene wat onderskeidelik in die promotor en aktiveringsvolgordegebied van die DNA gebonde is, kom dan teenoor mekaar te staan en kan dan deur proteïen-proteïen interaksie óf die struktuur stabiliseer óf transkripsie

help reguleer. RNA-polimerase II kan dan na stabilisering van die struktuur begin om vanaf die transkripsie inisiasiepunt te transkribeer. Skematiese voorstellings van hoe die gebonde proteïene interaksie kan ondergaan en hoe die polimerase-ensiem kan begin transkribeer, word in paneel B en C van Figuur 9.3 voorgestel.

In Figuur 9.4 is die bindingsgebiede wat in hierdie studie vir Sp1, Ap1 en Ap2 geïdentifiseer is tesame met die bindingsfaktore wat in die literatuur beskryf is soos voorgestel in Figuur 9.2, in hierdie model in Figuur 9.3 geïnkorporeer. In die voorgestelde model in Figuur 9.4 kom die Sp1 en Ap2-gebonde proteïene in die Rsa I - Hind III-fragment van die aktiveringsvolgorde in aanraking met die baie swak Sp1 asook die Ap2-gebonde proteïene in die promotorgebied. Die verskillende Sp1-proteïene in die aktiveringsvolgorde kan dan die swak Sp1 in die promotorgebied versterk sodat dit soos 'n Sp1-responsiewe promotor kan optree en transkripsie aktiveer. Uit die literatuur is ook bekend dat Sp1 tesame met CTF, Ap1 en Ap2 kan optree om die vlakke van transkripsie te reguleer (Briggs *et al.*, 1986). In die voorgestelde model word al hierdie faktore bymekaar gebring en kan transkripsionele regulering plaasvind. Die lusvorming in hierdie model bring ook die Ap2-gebonde proteïene in die aktiveringsvolgordegebied teenoor die Ap2-proteïene in die promotorgebied te staan. Hierdie proteïene kan dan deur selfassosiasie proteïen-proteïeninteraksie met mekaar ondergaan. Ondersteuning van hierdie selfassosiasie is uit die elektronmikroskopiese analise van pGEM-BB5(A)-DNA in hierdie studie verkry. Daar is tydens hierdie ondersoek Ap2 selfassosiasie tussen die Cla I - Xba I-promotorgebied en die Hind III - Rsa I introngebied waargeneem (Afdeling 8.3.2.). Die swak bindingsaffiniteit van Ap2 in die aktiveringsvolgorde word dan deur proteïen-proteïeninteraksie met die proteïene in die promotorgebied opgehef. Terselfdertyd kan Sp1-Ap2-interaksie ook deur lusvorming in hierdie gebied plaasvind en is dit uit die literatuur bekend dat Ap2 op gekoördineerde wyse met Sp1 funksioneer om RNA-sintese te stimuleer (Mitchell *et al.*, 1987).



Figuur 9.4 Diagrammatiese voorstelling van die voorgestelde model met die bindingsproteïene geïdentifiseer in hierdie studie en die literatuur.

Sulke proteïen-proteïeninteraksies is waargeneem tydens elektronmikroskopiese analise van die pGEM-BB5(A)-DNA met gelyktydige binding van Sp1 en Ap2 (Afdeling 8.3.4) en ondersteun hierdie voorgestelde DNA ten volle. Tydens hierdie eksperimente is lusvorming tussen die Eco RV - Pvu II en Cla I - Xba I promotorgebiede en die Rsa I - Hind III en Hind III - Rsa I introniese gebiede asook die asook die Xba I - Sac I en Sma I - Rsa I gebiede waargeneem. Hoewel geen onderskeid tussen Sp1 en Ap2 binding tydens hierdie analise onder die elektronmikroskoop waargeneem kan word nie, toon die gebiede duidelike proteïeninteraksies hetsy deur selfassosiasie of deur Sp1-Ap2 interaksies.

Heelwat lusvorming het ook voorgekom met gebiede verder stroom-op as die Eco RV- Pvu II-fragment en die Hind III - Rsa I-fragment. Hierdie waarneming hou die moontlikheid in dat *cis*-werkende reguleringsgebiede heelwat stroom-op van die transkripsionele inisiasiepunt kan voorkom en ook betrokke is by die regulering van die geen. Hierdie konsep is nie uniek nie. Grosveld *et al.* (1987) het by die β -globiengene vyf verskillende beheergebiede geïdentifiseer, bekend as die LCR, waarvan die dominante beheergebied meer as 50 kb stroom-op van die β -globiengene geleë is. Hierdie waarnemings van lusvorming tydens elektronmikroskopie ondersteun hierdie model van lusvorming dus grootliks.

Hierdie model soos voorgestel in Figuur 9.3 en Figuur 9.4 kan ook die oriëntasievoorkeur van die aktiveringsvolgorde-element verklaar. Indien die aktiveringsvolgorde in die antiklokgewyse-oriëntasie geplaas word, kan die twee pirimidienryke gebiede nie meer 'n homoloë binding ondergaan nie en kan proteïen-proteïeninteraksie tussen die verskillende bindingsproteïene nie meer plaasvind nie, in elk geval nie tussen die korrekte proteïene nie. Bornstein *et al.* (1988) het in sy modelvoorstelling 'n soortgelyke verklaring gegee vir die oriëntasie afhanklikheid van die aktiveringsgebied. Die model wat deur Bornstein *et al.* (1988) voorgestel is betrek ook 'n lusvormingsmodel, waar die promotor en aktiveringsvolgorde ook teenoor mekaar gestel word. Hierdie model verskil egter van die een wat in hierdie studie voorgestel word in die opsig dat daar nie van die hibridisering van die twee pirimidienryke gebiede met mekaar gebruik gemaak word nie. Die model van Bornstein berus slegs

op die losse interaksie van proteïene van die twee gebiede met mekaar om die gevormde DNA-lus te stabiliseer. Hoewel daar in hierdie studie geen direkte bewyse gegee is dat die twee pirimidienryke gebiede met mekaar hibridiseer nie, gee die proteïen-proteïeninteraksies tussen die ooreenkomstige DNA-fragment soos waargeneem onder die elektronmikroskoop tog ondersteuning vir die voorgestelde model in Figuur 9.4.

Die neutrale gebied tussen -17 en +117 wat tydens funksionele analyses waargeneem is, toon by die model ook slegs enkele Sp1 en Ap2-gebonde proteïene aan wat in die Xba I - Sac I- en Sma I - Rsa I-fragmente geleë is en moontlik met mekaar interaksie kan ondergaan. Hoewel daar waarskynlik heelwat ander proteïene is wat in hierdie gebied kan bind, maar wat nog nie geïdentifiseer is nie, kan daar oorweeg word dat in hierdie gebied proteïen-proteïeninteraksie voorkom wat die struktuur stabiliseer eerder as wat dit by die aktivering van transkripsie betrokke is. Volgens die voorgestelde model is die Sma I-fragment in die lus geleë. Ondersteuning vir hierdie model kom na vore uit die resultate van die elektronmikroskopiese analise van hierdie gebied wat in Tabel 8.6 weergegee word. Hieruit kan die afleiding gemaak word dat die frekwensie van kompleksvorming van sowel Sp1 as Ap2 met die DNA in hierdie gebied laag is, omdat die proteïene nie geredelik selfassosiasie of ander proteïen-proteïen interaksie kan ondergaan nie as gevolg van die posisie van die gebied in die lus. Die hoë Ap1-frekwensie van kompleksvorming wat tydens elektronmikroskopiese analise voorkom, kan toegeskryf word aan die hoë bindingsaffiniteit van hierdie Ap1-bindingsgebied vir die Ap1-proteïene. Ander bindingsproteïene wat nog nie geïdentifiseer is nie en faktore soos TPA wat Ap1-binding stimuleer, kan waarskynlik ook tesame met hierdie Ap1-bindingsgebied optree om aktivering van transkripsie te beïnvloed. Hierdie afleiding word gemaak op grond daarvan dat Bornstein *et al.* (1988) waargeneem het dat mutering van hierdie gebied 'n inhiberende invloed op die transkripsie van die geen het.

Sel- en weefselspesifisiteit kom voor as gevolg van 'n spesifieke kombinasie van bindingsfaktore veral in die stroom-opgebied. Een van die bindingsfaktore wat betrokke mag wees by sel- en weefselspesifisiteit, is die Ap2-proteïen. Die feit dat

NF1, CBF en Ap2 al drie moontlik aan die proksimale CCAAT-homologie kan bind, kan dalk een van die bydraende faktore tot die selspesifisiteit van hierdie promotor wees soos met die funksionele toetse waargeneem is (Tabel 5.2). Uit die funksionele analise is ook bevind dat die gebied tussen -444 en -2300 by moontlike sel- en weefsel-spesifisiteit betrokke is. Hoewel hierdie ondersoek spesifiek gerig was op die gebied tot -442 is uit die elektronmikroskoop analise van pGEM-BB5(A) wel 'n paar Ap2-bindingspunte in gebiede meer 5' tot die -442 gebied waargeneem. So ook het die analise van die muis pro- α 1(I)-geen etlike Ap2-bindingspunte uitgewys (Figuur 8.65). Hierdie gebiede kan moontlik 'n rol in die sel- en weefsel-spesifisiteit van die geen speel.

Hierdie voorgestelde model wil dan 'n bydrae lewer ten opsigte van die wyse waarop die mens pro- α 1(I)-geen gereguleer word. Die funksionele data in Hoofstuk 5 sowel as die elektronmikroskopiese analyses wat tydens hierdie studie uitgevoer is (Hoofstuk 8), verleen heelwat ondersteuning vir die voorgestelde model. Elektronmikroskopiese analise van proteïenbinding aan DNA-molekules is 'n betroubare metode om te gebruik wanneer aanvanklike proteïenbindingsgebiede in 'n geen geïdentifiseer moet word sonder dat die volledige geen eers gefragmenteer en aan stapsgewyse analyses onderwerp moet word. 'n Voorbeeld hiervan is in hierdie studie vir die mens Tipe II kollageen gegee, waar binding van die proteïene aan die DNA ondersoek en geanaliseer is sonder om die geen eers te fragmenteer en aan DNase I-analises te onderwerp. Uit die elektronmikroskoopresultate is gebiede van Sp1, Ap1 en Ap2-binding met hul onderskeie frekwensies van kompleksvorming (Tabel 8.5) geïdentifiseer en gekwantifiseer. Data verkry met behulp van die elektronmikroskopiese analyses kan dan in opvolgende eksperimente gebruik word om die geïdentifiseerde gebiede op die Tipe II-geen waar proteïenbinding waargeneem is, in meer besonderhede te ondersoek deur van hoë resolušietegnieke soos DNase I-afskermingsanalise te gebruik om die spesifieke bindingsgebiede in die DNA te identifiseer. Die enigste werklike nadeel van die elektronmikroskooptechniek is dat DNA langer as 10 kb moeilik analiseerbaar is as gevolg van knoping en verstrengeling van die lang DNA-molekules. Nogtans is dit 'n tegniek wat baie bruikbaar is in die aanvangstappe van 'n ondersoek na die bindingsgebiede van die DNA-bindingsproteïene in die gene.

9.6 SLOTSOM

Hierdie studie het 'n besliste bydrae gelewer om 'n mate van orde te skep in die chaos in en die gevolglike onduidelikheid oor die rol van *cis*- en *trans*-werkende elemente in die regulering van die mens pro- α 1(I)-geen. In hierdie studie is:

- * Die reguleringsgebiede;
- * die *cis*-werkende elemente in die reguleringsgebiede; en
- * die *trans*-werkende transkripsiefaktore Sp1, Ap1 en Ap2 se bindingsgebiede in die *cis*-elemente; en
- * die frekwensievermoë van die transkripsiefaktore tot kompleksvorming in die gebied tussen -442 en +1697 van die mens pro- α 1(I)-geen geïdentifiseer, gekarakteriseer en bepaal.
- * Ook is 'n model voorgestel van hoe transkripsionele regulering van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen kan plaasvind.

Verskeie leemtes ten opsigte van die regulering van die mens pro- α 1(I)-kollageengeen het deur hierdie studie na vore gekom. Tydens die identifisering van bindingsvolgordes vir Sp1, Ap1 en Ap2 in die pro- α 1(I) kollageengeen, is heelwat naasliggende asook oorvleuelende bindingsgebiede vir die proteïene waargeneem. Die vraag of proteïene aan beide oorvleuelende bindingsgebiede bind en of binding van proteïene aan naasliggende bindingsgebiede 'n invloed op die binding van die onderskeie proteïene aan hierdie gebiede het, is nie in hierdie studie ondersoek nie. Die eerste vraag kan beantwoord word deur gebruik te maak van tegnieke soos mutasie-analises (Everett *et al.*, 1993) en ontbrekende-kontakpeiling (Engels: missing contact probing) (Li *et al.*, 1989). Met laasgenoemde tegniek kan nukleotiede in die bindingsvolgorde wat noodsaaklik is vir die fassilitering van DNA-proteïeninteraksie geïdentifiseer word. Mutasie-analises of delesie-eksperimente kan ook gebruik word om te bepaal of koöperatiewe interaksie of gekoördineerde binding van proteïene tussen naasliggende bindingsgebiede voorkom. Delesie- en mutasieanalises van bepaalde bindingsgebiede kan die transkripsie-aktiwiteit van die geen *in vitro* verander, maar dit is egter geen waarborg dat soortgelyke effekte *in vivo* waargeneem sal word nie.

'n Verdere leemte wat geïdentifiseer is, is die vraag watter invloed die verskillende geïdentifiseerde transkripsiefaktore op die inisiasie van transkripsie mag uitoefen. Dit kan ondersoek word deur van onder meer voorvoerder-uitbreidingsanalises (Engels: primer extension assay) gebruik te maak. 'n Soortgelyke sistematiese ondersoek van die DNA-volgorde om bindingsgebiede van ander DNA-bindingsproteïene te identifiseer, kan help om die voorgestelde model verder uit te bou. Die waarneming in hierdie studie van lusvorming tussen gebiede stroomaf van -442 met gebiede geleë 3'-stroom-op vanaf +1600 tydens elektronmikroskopiese analises (Tabel 8.6 en Figure 8.60 en 8.61) toon die moontlikheid van verdere stroom-op *cis*-werkende beheergebiede aan. Die identifisering van hierdie stroom-op reguleringsgebiede is 'n noodsaaklike voorvereiste indien die regulering van die mens pro- α 1(I)-geen opgeklaar wil word. Aangesien hierdie geen baie groot is, is die identifisering van hierdie *cis*-werkende reguleringsgebiede waarskynlik die maklikste uitvoerbaar deur die analise van geenuitdrukking in transgeniese muise. Die verdere opklaring van die transkripsionele regulering van die mens pro- α 1(I)-geen kan 'n groot bydrae lewer tot die opklaring van die regulering van verskeie van die ander fibrille kollageengene en kan verder ook lei tot 'n daadwerklike bydrae tot die ontwikkeling van geenterapie vir kollageenafwykings.

Ten slotte kan gestel word dat die doel van hierdie studie bereik is deurdat bewyse gegee is dat 'n aktiveringsvolgorde met 'n oriëntasie-spesifieke voorkeur in die eerste intron van die mens pro- α 1(I)-geen voorkom en dat die pro- α 1(I)-geen funksioneel onderskeibare rangskikkings van reguleringselemente besit wat in staat is om met *trans*-werkende transkripsiefaktore interaksie te ondergaan. 'n Werkbare model vir die regulering van die geen ondersteun deur die resultate in hierdie studie, is voorgestel wat as 'n moontlike verklaringsbasis vir die transkripsionele regulering van die mens pro- α 1(I)-kollageengene kan dien.

AFKORTINGSLYS

Ad	adenovirus
Ad EIB	adenovirus 2 EIB transkripsie-eenheid
AdML	adenovirus ML-promotorgebied
Ap	aktiveerderproteïen
ARV	vigsretrovirus
ATP	adenosientrifosfaat
β -geen	DNA polimerase β -geen
bp	basepare
BPV	beespapilomavirus
BHK	babahamster-nierselle
BSA	beesserumalbumien
cAMP	sikliese adenosien-3'; 5'-monofosfaat
CAT	chlooramfenikolasetieltransferase
CBF	CCAAT-bindingsfaktor
CBP	CCAAT-bindingsproteïen
CHO	Chinese hoender ovariumselle
CH-TK	hoender-timidienkinase
CL	<i>Chlamydomonas</i>
CPI	HeLa CCAAT-bindingsfaktor
CTF	CCAAT-transkripsiefaktor
CTP	sitosientrifosfaat
Cys	sisteïen
DHFR	dihidrofolaatreduktase
DMEM	Eagle se medium soos aangepas deur Dulbecco
DMS	dimetielsulfaat
DMSO	dimetielsulfoksied
DNA	deoksiribonukleïensuur

DNase	deoksiribonuklease
DTT	ditiotreitol
EBP	aktiveringsvolgordebindingsproteïen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etileendiamientetra-asynsuur
EGF	epidermale groeifaktor
Egr	vroeë groeiresponsgeen
fmol	femtomole
Fn	fibronektien
fpu	afskermingsanalise-eenheid
FR	aantal piekfraksies
G	vrye energie
GAPDH	gliseraldehyd-3-fosfaatdehidrogenase
Gly	glisien
GTP	guanosientrifosfaat
H	hoogte van piek
HBV	Hepatitis B-virus
His	Histidien
Hepes	N-2-hidroksi-etieelpiperazien-N'-2-etaansulfoonsuur
HIV-1	mens immunogebreksvirus
HPV	mens papillomavirus
HSV IE-3	Herpes simpleksvirus onmiddellike vroeë geen
HSV	Herpes simpleksvirus
ICP-4	Herpes simpleksvirus onmiddellike vroeë promotor
IF	inhiberingsfaktore
IGF	insulienagtige groeihormoon
IL	interleukin

K	mikroskopiese ewewigskonstante
kb	kilobasepare
kd	kilodalton
Kd	dissosiasie-konstante
LCR	Lokus beheergebied
LDL	laedigtheidslipoproteïen
Leu	leusien
LTR	lang terminale herhalings
M-MuL-virus	Moloney muisagtige leukemiavirus
MER5	geen uitgedruk in muis eritroleukemiaselle
MLTF	hoof laat transkripsiefaktor
MPE	metidiumpropiel-EDTA
mRNA	boodskapper-ribonukleïensuur
MSV	Muisagtige sarkomavirus
MT	metallotionien
N	aantal metings
NF1	kernfaktor
NTP	nukleotiedtrifosfaat
opm	omwentelinge per minuut
P	posisie van piek
PAGE	poliakrielamied gelelektroforese
PBS	fosfaatgebufferde fisiologiese soutoplossing
PEPCK	sitosoliese fosfoenolpiruvaat karboksikinase
Phe	feniëalanien
Pipes	1,4 piperazien-dietaan-swaelsuur
pmol	picomole
PNK	polinukleotiedkinase

poli(A)-RNA	poli-geadinileerde ribonukleïensuur
POMC	pro-opiomelanokortien
POPOP	2,2'-para-feniel-bis(5-fenieloksasool)
PPO	2,5-difenieloksasool
pro	prokollageen
R	weerstandbiedend
r-GST-P	rot plasentale glutatioon-S-transferase
rke	ruwe kernekstrak
RNA	ribonukleïensuur
RTL	relatieve transkripsievlakke
SD	standaardafwyking
SDS	natriumdodesielsulfaat
SOD	Cu/Zn superoksied dismutase
SV40	Simianvirus 40
TA _g	groot T-antigeen
TBP	TATA-bindingsproteïen
TEM	transmissie-elektronmikroskopie
TEMED	N, N, N', N'-tetrametieletileendiamien
TGF	transformering-groefaktor
tk	timidienkinase
TM	handelsmerk
TPA	12-0-tetradekanoïelforbol-13-asetaat
TPI	triosefosfaatisomerase
tpm	telling per minuut
Tris	tris-(hidroksimetiel)-aminometaan
tRNA	transportribonukleïensuur
TTP	timidientrifosfaat
TUB	tubulien

U	eenheid
uPA	urokinase plasminogeenactiveerder
UV	ultraviolet
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>

BIBLIOGRAFIE

ACKERS, G.K., SHEA, M.A. & SMITH, F.R. (1983) Free energy coupling within macromolecules. The chemical work of ligand binding at the individual sites in co-operative systems. **Journal of Molecular Biology** 170:223-242.

ALAM, J. & ZHINING, D. (1992) Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene. **The Journal of Biological Chemistry** 267:21894-21900.

ANDERSON, G.M. & FREYTAG, S.O. (1991) Synergistic activation of a human promoter *in vivo* by transcription factor Sp1. **Molecular and Cellular Biology** 11:1935-1943.

ANGEL, P., HATTORI, K., SMEAL, T. & KARIN, M. (1988) The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, jun/AP-1. **Cell** 55:875-885.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. & STRUHL, K. (1987) Current protocols in molecular biology. Volumes 1 & 2. New York : John Wiley and Sons. 7.1.1 - 7.5.9; 12.0.1 - 12.2.10.

BANERJI, J., RUSCONI, S. & SCHAFFNER, W. (1981) Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. **Cell** 27:299-308.

BARSH, G.S., DAVID, K.E. & BYERS, P.H. (1982) Type I osteogenesis imperfecta: A nonfunctional allele for pro- α 1(I) chains of type I procollagen. **National Academy of Science, Proceedings** 79:3838-3842.

BENOIST, C. & CHAMBON, P. (1981) *In vivo* sequence requirements of the SV40 early promoter region. **Nature** 290:304-310.

BISHOP, D.F., KORNREICH, R. & DESNICK R.J. (1988) Structural organization of the human α -galactosidase A gene: Further evidence for the absence of a 3' untranslated region. **National Academy of Science, Proceedings** 85:3903-3907.

BISHOP, D.F., RINAUDO, M.S., RITTER, J.K., CHANG, A.C-Y, CONANT, K & GEHLERT, D.R. (1990) A putative AP-2 binding site in the 5' flanking region of the mouse POMC gene. **FEBS Letters** 264:125-129.

BOAST, S., SU, M-W., RAMIREZ, F., SANCHEZ, M. & AVVEDIMENTO, E.V. (1990) Functional analysis of *cis*-acting DNA sequences controlling transcription of the human type I collagen genes. **The Journal of Biological Chemistry** 265:13351-13356.

BOHMANN, D. & TJIAN, R. (1989) Biochemical analysis of transcriptional activation by Jun: differential activity of c- and v-jun. **Cell** 59:709-717.

BOHMANN, D., MATTAJ, I., MONACI, P. & NICOSIA, A. (1989) EMBO course manual : DNA-protein interactions p 1-81.

BORNSTEIN, P. & McKAY, J. (1988) The first intron of the $\alpha 1(I)$ collagen gene contains several transcriptional regulatory elements. **The Journal of Biochemical Chemistry** 263:1603-1606.

BORNSTEIN, P., McKAY, J., LISKA, D.J., APONE, S. & DEVARAYALU, S. (1988) Interactions between the promoter and first intron are involved in transcriptional control of $\alpha 1(I)$ collagen gene expression. **Molecular and Cellular Biology** 8:4851-4857.

BORNSTEIN, P. & SAGE, H. (1989) Regulation of collagen gene expression. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology** 37:67-106.

BORNSTEIN, P., McKAY, J., MORISHIMA, J.K., DEVARAYALU, S. & GELINAS, R.E. (1987) Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human $\alpha 1(I)$ collagen gene. **National Academy of Science, Proceedings** 84:8869-8873.

BOS, T.J., BOHMANN, D., TSUCHIE, H., TJIAN, R. & VOGT, P.K. (1988) v-jun Encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. **Cell** 52:705-712.

BRENNAN, R.G. & MATTHEWS, B.W. (1989) Structural basis of DNA-protein recognition. **Trends in Biochemical Science** 14:286-290.

BRENNER, D.A., RIPPE, R.A. & VELOZ, L. (1989) Analysis of the collagen $\alpha 1(I)$ promotor. **Nucleic Acids Research** 17:6055-6065.

BOHMAN, D. & TJIAN, R. (1989) Biochemical analysis of transcriptional activation by Jun: Differential activity of c- and v-JUN. **Cell** 59:709-717.

BRENOWITZ, M., SENEAR, D.F., SHEA, M.A. & ACKERS, G.K. (1986) "Footprint" titrations yield valid thermodynamic isotherms. **National Academy of Science, Proceedings** 83:8462-8466.

BRIGGS, M.R., KADONAGA, J.T., BELL, S.P. & TJIAN, R. (1986) Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. **Science** 234:47-53.

BURATOWSKI, S. (1994) The basics of basal transcription by RNA polymerase II. **Cell** 77:1-3.

BURNETT, W. & ROSENBLOOM, J. (1979) Isolation and translation of elastin mRNA from chick aorta. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 86:478-484.

CHEAH, K.S.E. (1985) Collagen genes and inherited connective tissue disease. **Biochemical Journal** 229:287-303.

CHEN, X., AZIZKHAN, J.C. & LEE, D.C. (1992) The binding of transcription factor Sp1 to multiple sites is required for maximal expression from the rat transforming growth factor α promoter. **Oncogene** 7:1805-1815.

CHIU, R., BOYLE, W.J., MEEK, J., SMEAL, T., HUNTER, T. & KARIN, M. (1988) The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. **Cell** 54:541-552.

CHODOSH, L.A., BALDWIN, A.S., CARTHEW, R.W. & SHARP, P.A. (1988) Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. **Cell** 53:11-24.

CHU, M-L., DE WET, W., BERNARD, M. & RAMIREZ, F. (1985) Fine structural analysis of the human pro- α 1(I) collagen gene. **The Journal of Biological Chemistry** 260:2315-2320.

CHU, M-L, DE WET, W., BERNARD, M., DING, J-F., MORABITO, M., MYERS, J., WILLIAMS, C. & RAMIREZ, F. (1984) Human pro- α 1(I) collagen gene structure reveals evolutionary conservation of a pattern of introns and exons. **Nature** 310:337-340.

COLEMAN, T.A., HOU, Y-T. & KOPCHICK, J.J. (1992) The SV40 early transcriptional regulatory element is unable to direct gene expression in pituitary GH-3 cells. **Gene Expression** 2:175-189.

COUREY, A.J., HOLTZMAN, D.A., JACKSON, S.P. & TJIAN, R. (1989) Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. **Cell** 59:827-836.

COUREY, A.J. & TJIAN, R. (1988) Analysis of Sp1 *in vivo* reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. **Cell** 55:887-898.

COURTOIS, S.J., LaFONTAINE, D.A., LEMAIGRE, F., DURVIAUX, S.M. & ROSSEAU, G.G. (1990) Nuclear factor-1 and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and *trans*-activate the human growth hormone gene. **Nucleic Acids Research** 18:57-64.

CURRAN, T., GORDON, M.B., RUBINO, K.L. & SAMBUCETTI, L.C. (1987) Isolation and characterization of the c-fos(rat) cDNA and analysis of post-translational modification *in vitro*. **Oncogene** 2:79-84.

D'ALESSIO, M.D., BERNARD, M., PRETORIUS, P.J., DE WET, W.J. & RAMIREZ, F. (1988) Complete nucleotide sequence of the region encompassing the first twenty-five exons of the human pro- α 1(I) collagen gene (COL1A1). **Gene** 67:105-115.

DAWSON, P.A., HOFMANN, S.L., VAN DER WESTHUYZEN D.R., SÜDHOF, T.C., BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (1988) Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1. **Journal of Biological Chemistry** 263:3372-3379.

DE CROMBRUGGHE, B., VUORIO, T., KARSENTY, G., MAITY, S., RUTHESHOUSER, E.C. & GOLDBERG, H. (1991) Transcriptional control mechanisms for the expression of type I collagen genes. **Annals of the Rheumatic Diseases** 50:872-876.

DE WET, W.J. (1987) R-loop analysis of procollagen messenger RNA for the assessment of human collagen mutations. **Methods in Enzymology** 145:235-252.

DE WET, W.J., BERNARD, M., BENSON-CHANDA, V., CHU, M-L., DICKSON, L., WEIL, D. & RAMIREZ, F. (1987) Organization of the human pro- α 2(I) collagen gene. **The Journal of Biological Chemistry** 262:16032-16036.

DE WET, W.J., CHU, M-L. & PROCKOP, D.J. (1983) The mRNAs for the pro- α 1(I) and pro- α 2(I) chains of Type I procollagen are translated at the same rate in normal human fibroblasts and in fibroblasts from two variants of Osteogenesis Imperfecta with altered steady state ratios of the two mRNAs. **The Journal of Biological Chemistry** 258:14385-14389.

DICKSON, L.A., DE WET, W.J., LIBERTO, M.D., WEIL, D & RAMIREZ, F. (1985) Analysis of the promoter region and the N-propeptide domain of the human pro- $\alpha 2$ (I) collagen gene. **Nucleic Acids Research** 13:3427-3438.

DIERKS, P., VAN OUYEN, A., COCHRAN, M.D., DOBKIN, C., REISER, J. & WEISSMAN, C. (1983) Three regions upstream from the cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit β -globin gene in mouse 3T6 cells. **Cell** 32:695-706.

DIGNAM, J.D., MARTIN, P.L., SHASTRY, B.S. & ROEDER, R.G. (1983) Eukaryotic gene transcription with purified components. **Methods in Enzymology** 101:582-597.

DYNAN, W.S. (1987) What mechanisms underlie tissue-specific gene transcription? **Trends in Genetics** 3:121-122.

DYNAN, W.S & TJIAN, R. (1983) Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. **Cell** 32:669-680.

DYNAN, W.S., SAFFER, J.D., LEE, W.S. & TJIAN, R. (1985) Transcription factor Sp1 recognizes promoter sequences from the monkey genome that are similar to the simian virus 40 promoter. **National Academy of Science, Proceedings** 82:4915-4919.

EMILI, A., GREENBLATT, J. & INGLES, C.J. (1994) Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. **Molecular and Cellular Biology** 14:1582-1593.

EVANS, T., DeCHIARA, T. & EFSTRATIADIS, A. (1988) A promoter of the rat insulin-like growth factor II gene consists of minimal control elements. **Journal of Molecular Biology** 199:61-81.

EVERETT, R.D., BATY, D. & CHAMBON, P. (1983) The repeated GC-rich motifs upstream from the TATA box are important elements of the SV40 early promoter. **Nucleic Acid Research** 11:2447-2464.

FAISST, S. & MEYER, S. (1992) Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. **Nucleic Acids Research** 20:3-26.

FINER, M.H., AHO, S., GERSTENFELD, L.C., BOEDTKER, H. & DOTY, P. (1987) Unusual DNA sequences located within the promoter region and the first intron of the chicken pro- α 1(I) collagen gene. **The Journal of Biological Chemistry** 262:13323-13332.

FRANZA, B.R., RAUSCHER, F.J., JOSEPHS, S.F. & CURRAN, T. (1988) The fos complex and fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. **Science** 239:1150-1153.

FREIFELDER, D. (1982) *Physical Biochemistry: Applications to biochemistry and molecular biology*. 2nd ed. San Fransisco: Freeman and company. p. 504-511; 678-681.

FROMM, M. & BERG P. (1982) Deletion mapping of DNA regions required for SV40 early region promoter function *in vivo*. **Journal of Molecular and Applied Genetics** 1:457-481.

GALAS, D.J. & SCHMITZ, A. (1978) DNase footprinting: A simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. **Nucleic Acids Research** 5:3157-3170.

GIDONI, D., DYNAN, W.S & TJIAN R. (1984) Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. **Nature** 312:409-413.

GIDONI, D., KADONAGA, J.T., BARRERA-SALDANA, H., TAKAHASHI, K., CHAMBON, P. & TJIAN, R. (1985) Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. **Science** 230:511-517.

GLOSS, B. & BERNARD, H-U. (1990) The E6/E7 promoter of human papillomavirus Type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. **Journal of Virology** 64:5577-5584.

GOUGH, N. (1985) Tissue-specific expression of immunoglobulin genes: A reappraisal. **Trends in Genetics** 1:267-268.

GREENBLATT, J. (1991) RNA polymerase-associated transcription factors. **Trends in Biochemical Sciences** 16:408-411.

GROSVELD, F., VAN ASSENDELFT, G.B., GREAVES, D.R. & KOLLIAS, G. (1987) Position-independent high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. **Cell** 51:975-985.

GURDON, J.B., LANE, C.D. & WOODLAND, H.R. (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. **Nature** 233:177-182.

GURDON, J.B. & WICKENS, M.P. (1983) The use of *Xenopus* oocytes for the expression of cloned genes. **Methods in Enzymology** 101:370-386.

HAI, T., LIU, F., ALLEGRETTO, E.A., KARIN, M. & GREEN, M.R. (1988) A family of immunologically related transcription factors that includes multiple forms of ATF and AP-1. **Genes & Development** 2:1216-1226.

HANAHAN, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology** 166:557-580.

HATAMUCHI, A., PATERSON, B. & DE CROMBRUGGHE, B. (1986) Differential binding of a CCAAT DNA binding factor to the promoters of the mouse $\alpha 2(I)$ and $\alpha 1(III)$ collagen genes. **The Journal of Biological Chemistry** 262:11310-11314.

HOLMES, D.S. & QUIGLEY, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Analytical Biochemistry** 114:193-197.

- HORTON, W., MIYASHITA, T., KOHNO, K., HASSELL, J.R. & YAMADA, Y. (1987) Identification of a phenotype-specific enhancer in the first intron of the rat collagen II gene. **National Academy of Science, Proceedings** 84:8864-8868.
- HURST, H.C. & JONES, N.C. (1987) Identification of factors that interact with the E1A-inducible adenovirus E3 promoter. **Genes & Development** 1:1132-1146.
- IMAGAWA, M., CHIU, R & KARIN, M. (1987) Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: Protein kinase C and cAMP. **Cell** 51:251-260.
- INAGAKI, Y., TRUTER, S. & RAMIREZ, F. (1994) Transforming growth factor- β stimulates $\alpha 2(I)$ collagen gene expression through a *cis*-acting element that contains an Sp1-binding site. **Journal of Biological Chemistry** 269:14828-14834.
- ISHII, S., KADONAGA, J.T., TJIAN, R., BRADY, J.N., MERLINO, G.T. & PASTAN, I. (1986) Binding of the Sp1 transcription factor by the human harvey *ras*1 proto-oncogene promoter. **Science** 232:1410-1413.
- JACKSON, S.P., MacDONALD, J.J., LEES-MILLER, S. & TJIAN, R. (1990) GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. **Cell** 63:155-165.
- JOHNSON, M.L. & FRASIER, S.G. (1985) Nonlinear least-squares analysis. **Methods in Enzymology** 117:301-343.
- JOHNSON, P.F. & McKNIGHT, S.L. (1989) Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. **Annual Reviews in Biochemistry** 58:799-839.
- JONES, N. (1990) Transcriptional regulation by dimerization: Two sides to an incestuous relationship. **Cell** 61:9-11.

- JONES, K.A. & TJIAN, R. (1985) Sp1 binds to promoter sequences and activates herpes simplex virus "immediate-early" gene transcription *in vitro*. **Nature** 317:179-183.
- JONES, K.A., YAMAMOTO, K.R. & TJIAN, R. (1985) Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter *in vitro*. **Cell** 42:559-572.
- JONES, K.A., KADONAGA, J.T., LUCIW, P.A. & TJIAN, R. (1986) Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. **Science** 232:755-759.
- JONES, N.C., RIGBY, P.W.J. & ZIFF, E.B. (1988) *Trans*-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: Lessons from studies on DNA tumor viruses. **Genes & Development** 2:267-281.
- KADONAGA, J.T. & TJIAN, R. (1986) Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. **National Academy of Science, Proceedings** 83:5889-5893.
- KADONAGA, J.T., JONES, K.A. & TJIAN, R. (1986) Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. **Trends in Biochemical Sciences** 11:20-23.
- KADONAGA, J.T., CARNER, K.R., MASIAZ, F.R. & TJIAN, R. (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. **Cell** 51:1079-1090.
- KADONAGA, J.T., COUREY, A.J., LADIK, J. & TJIAN, R. (1988) Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. **Science** 242:1566-1571.
- KAHN, M., KOLTER, R., THOMAS, C., FIGURSKI, D., MEYER, R., REMAUT, E. & HELSINKI, D.R. (1979) Plasmid cloning vehicles derived from plasmids ColEI, F, R6K, and RK2. **Methods in Enzymology** 68:268-272.

KANNO, N., FROMENTAL, C., STAUB, A., RUFFENACH, F., DAVIDSON, I & CHAMBON, P. (1989) SV40 TC-II (kB) and the related H-2k^B enhancers exhibit different cell type specific and inducible proto-enhancer activities, but the SV40 core sequence and the AP2 binding site have no enhancer properties. **The EMBO Journal** 8:4205-4214.

KARSENTY, G. & DE CROMBRUGGHE, B. (1990) Two different negative and one positive regulatory factors interact with a short promoter segment of the $\alpha 1(I)$ collagen gene. **The Journal of Biological Chemistry** 265:9934-9942.

KHILLAN, J.S., SCHMIDT, A., OVERBEEK, P.A., DE CROMBRUGGHE, B. & WESTPHAL, H. (1986) Developmental and tissue-specific expression directed by the $\alpha 2$ type I collagen promoter in transgenic mice. **National Academy of Science, Proceedings** 83:725-729.

KIM, J.L., NIKOLOV, D.B. & BURLEY, S.K. (1993) Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. **Nature** 365:520-527.

KLEIN, G., LINDAHL, T., JONDAL, M., LEIBOLD, W., MENÉZES, J., NILSSON, K. & SUNDSTRÖM, C. (1974) Continuous lymphoid cell lines with characteristics of B cells (Bone-Marrow-Derived), lacking the Epstein-Barr virus genome and derived from three human lymphomas. **National Academy of Sciences, Proceedings** 71:3283-3286.

KLUG, A. (1993) Opening the gateway. **Nature** 365:486-487.

KOEDOOD, R. (1993) Interaction of nuclear factors with the promoter of the human pro- $\alpha 1(I)$ collagen gene. Potchefstroom : PU for CHE (M.Sc.-dissertation) 97p.

KOHNO, K., SULLIVAN, M. & YAMADA, Y. (1985) Structure of the promoter of the rat type II procollagen gene. **Journal of Biological Science** 260:4441-4447.

- KOLLER, T.H., SOGO, J.M. & BUJARD, H. (1974) An electron microscopic method for studying nucleic acid-protein complexes. Visualization of RNA polymerase bound to the DNA of bacteriophages T7 and T3. **Biopolymers** 13:995-1009.
- KOLLER, T.H., KÜBLER, O., PORTMANN, R & SOGO, J.M. (1978). High resolution physical mapping of specific binding sites of *Escherichia coli* RNA polymerase on the DNA of bacteriophage T7. **Journal of Molecular Biology** 120:121-131.
- KOUZARIDES, T. & ZIFF, E. (1989) Leucine zippers of *fos*, *jun* and GCN4 dictate dimerization specificity and thereby control DNA binding. **Nature** 340:568-571.
- KUSTU, S., NORTH, A.K. & WEISS, D.S. (1991) Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. **Trends in Biochemical Science** 16:397-402.
- LANDSCHULZ, W.H., JOHNSON, P.F. & MCKNIGHT, S.L. (1988) The leucine zipper: A Hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. **Science** 240:1759-1764.
- LANE, C. (1976) Rabbit hemoglobin from frogg eggs. **Scientific American** 235:61-69.
- LAWN, R.M., EFSTRATIADIS, A., O'CONNELL, C. & MANIATIS, T. (1980) The nucleotide sequence of the human β -globin gene. **Cell** 21:647-651.
- LEE, J-K., TAM, J.W.O., TSAI, M-J. & TSAI, S.Y. (1992) Identification of *cis*- and *trans*-acting factors regulating the expression of the human insulin receptor gene. **The Journal of Biological Chemistry** 267:4638-4645.
- LEE, W., HASLINGER, A., KARIN, M. & TJIAN, R. (1987a) Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. **Nature** 325:368-371.

LEE, W., MITCHELL, P & TJIAN, R. (1987b) Purified transcription factor Ap1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. **Cell** 49:741-752.

LEHRACH, H., FRISCHAUF, A.M., HANAHAN, D., WOZNEY, J., FULLER, F., CRKVENJAKOV, R., BOEDTKER, H. & DOTY, P. (1978) Construction and characterization of a 2,5-kilobase procollagen clone. **National Academy of Science, Proceedings** 75:5417-5421.

LEMAIGRE, F.P., LAFONTAINE, D.A., COURTOIS, S.J., DURVIAUX, S.M. & ROUSSEAU, G.G. (1990) Sp1 can displace GHF-1 from its distal binding site and stimulate transcription from the growth hormone gene promoter. **Molecular and Cellular Biology** 10:1811-1814.

LETOVSKY, J. & DYNAN, W.S. (1989) Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence. **Nucleic Acids Research** 17:2639-2653.

LI, R., KNIGHT, J.D., JACKSON, S.P., TJIAN, R. & BOTCHAN, M.R. (1991) Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. **Cell** 65:493-505.

LISKA, D.J., ROBINSON, V.R. & BORNSTEIN, P. (1992) Elements in the first intron of the $\alpha 1(I)$ collagen gene interact with Sp1 to regulate gene expression. **Gene Expression** 2:379-389.

LISKA, D.J., SLACK, J.L. & BORNSTEIN, P. (1990) A highly conserved intronic sequence is involved in transcriptional regulation of the $\alpha 1(I)$ collagen gene. **Cell Regulation** 1:487-498.

LÜSCHER, B., MITCHELL, P.J., WILLIAMS, T. & TJIAN, R. (1989) Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. **Genes & Development** 3:1507-1517.

MANIATIS, T., GOODBOURN, S. & FISCHER, J.A. (1987) Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. **Science** 236:1237-1245.

MANLEY, J.L., FIRE, A., CANO, A., SHARP, P.A. & GEFTER, M. (1980) DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. **National Academy of Sciences, Proceedings** 77:3855-38859.

MASTRANGELO, I.A., COUREY, A.J., WALL, J.S., JACKSON, S.P. & HOUGH, P.V. (1991) DNA looping and Sp1 multimer links a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. **National Academy of Sciences, Proceedings** 88:5670-5674.

MAXAM, A.M. & GILBERT, W. (1977) A new method for sequencing DNA. **National Academy of Sciences, Proceedings**, 74:560-564.

McKNIGHT, S.L. & KINGSBURY, R. (1982) Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. **Science** 217:316-324.

McKNIGHT, S.L. & TJIAN, R. (1986) Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. **Cell** 46:795-805.

McKNIGHT, S.L., KINGSBURY, R.C., SPENCE, A. & SMITH, M. (1984) The distal transcription signals of the herpesvirus tk gene share a common hexanucleotide control sequence. **Cell** 37:253-262.

MERCURIO, F. & KARIN, M. (1989) Transcription factors AP-3 en AP-2 interact with the SV40 enhancer in a mutually exclusive manner. **The EMBO Journal** 8:1455-1460.

MERMOD, N., WILLIAMS, T.J. & TJIAN, R. (1988) Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription *in vitro*. **Nature** 332:557-561.

MERMOD, N., O'NEILL, E.A., KELLY, T.J. & TJIAN, R. (1989) The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. **Cell** **58**:741-753.

MITCHELL, P.J., WANG, C. & TJIAN, R. (1987) Positive and negative regulation of transcription *in vitro*: Enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T Antigen. **Cell** **50**:847-861.

MITCHELL, P.J., TIMMONS, P.M., HEBERT, J.M., RIGBY, P.W.J. & TJIAN, R. (1991) Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. **Genes & Development** **5**:105-119.

MITCHELL, P.J. & TJIAN, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. **Science** **245**:371-378.

MUDRYJ, M & DE CROMBRUGGHE, B. (1988) Deletion analysis of the mouse alpha 1 (III) collagen promoter. **Nucleic Acids Research** **16**:7513-7526.

MÜLLER, H-P. & SCHAFFNER, W. (1990) Transcriptional enhancers can act *in trans*. **Trends in Genetics** **6**:300-304.

MÜLLER, M.M., GERSTER, T. & SCHAFFNER, W. (1988) Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. **FEBS European Journal of Biochemistry** **176**:485-495.

MURRAY, E.E., LEWIS, K., SOBOL, M & BINGHUI, L. (1992) Optimizing and troubleshooting DNase I footprinting reactions. **Promega Notes** **36**:1-11.

NEHLS, M.C., RIPPE, R.A., VELOZ, L & BRENNER, D.A. (1991) Transcription factors nuclear factor I and Sp1 interact with the murine collagen $\alpha 1(I)$ promoter. **Molecular and Cellular Biology** **11**:4065-4073.

OIKARINEN, J., HATAMUCHI, A. & DE CROMBRUGGHE, B. (1987) Separate binding sites for nuclear factor 1 and a CCAAT DNA binding factor in the mouse $\alpha 2(I)$ collagen promoter. **The Journal of Biological Chemistry** 262:11064-11070.

PAONESSA, G., GOUNARI, R.F. & CORTESE, R. (1988) Purification of a NF1-like DNA-binding protein from rat liver and cloning of the corresponding cDNA. **The EMBO Journal** 10:3115-3123.

PROBST, E., KRESSMANN, A. & BIRNSTIEL, M.L. (1979) Expression of sea urchin histone genes in the oocytes of *Xenopus laevis*. **Journal of Molecular Biology** 135:709-732.

PROCKOP, D.J. & KIVIRIKKO, K.I. (1984) Heritable diseases of collagen. **The New England Journal of Medicine** 311:376-386.

PTASHNE, M. (1986) Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. **Nature** 322:697-701.

PUCK, T.T. & MARCUS, P.I. (1955) A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. **National Academy of Science, Proceedings** 41:432-437.

RAMIREZ, F., BERNARD, M., CHU, M-L., DICKSON, L., SANGIORGI, F., WEIL, D., DE WET, W.J., JUNIEN, C. & SOBEL, M. (1985) Isolation and characterization of the human fibrillar collagen genes. **Annals of the New York Academy of Science** 460:117-129.

RAMIREZ, F. & DE WET, W.J. (1988) Molecular biology of the human fibrillar collagen genes. **Annals of the New York Academy of Sciences** 543:109-116.

RANSONE, L.J., VISVADER, J., SASSONE-CORSI, P. & VERMA, I.M. (1989) Fos-Jun interaction: Mutational analysis of the leucine zipper domain of both proteins. **Genes & Development** 3:770-781.

RAUSCHER, F.J., COHEN, D.R., CURRAN, T., BOS, T.J., VOGT, P.K., BOHMANN, D., TJIAN, R. & FRANZA, B.R. (1988a) Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. **Science** **240**:1010-1016.

RAUSCHER, F.J., SAMBUCETTI, L.C., CURRAN, T., DISTEL, R.J. & SPIEGELMAN, B.M. (1988b) Common DNA binding site for fos protein complexes and transcription factor AP-1. **Cell** **52**:471-480.

REDDY, B.A. & ETKIN, L.D. (1992) A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins. **Trends in Biochemical Science** **17**:344-345.

RICKWOOD, D. & HAMES, B.D. (1982) Gelelectrophoresis of nucleic acids: A practical approach. Oxford : IRL Press. p 1-25.

RIPPE, R.A., LORENZEN S-I., BRENNER, D.A. & BREINDL, M. (1989) Regulatory elements in the 5'-flanking region and the first intron contribute to transcriptional control of the mouse alpha I Type I collagen gene. **Molecular and Cellular Biology** **9**:2224-2227.

ROEDER, R.G. (1991) The complexities of eukaryotic transcription initiation: Regulation of preinitiation complex assembly. **Trends in Biochemical Sciences** **16**:402-408.

ROSSI, P. & DE CROMBRUGGHE, B. (1987) Identification of a cell-specific transcriptional enhancer in the first intron of the mouse $\alpha 2$ (type I) collagen gene. **National Academy of Science, Proceedings** **84**:5590-5594.

ROSSI, P., KARSENTY, G., ROBERTS, A.B., ROCHE, N.S., SPORN, M.B. & DE CROMBRUGGHE, B. (1988) A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a Type 1 collagen promoter by transforming growth factor- β . **Cell** **52**:405-414.

- ROSSOUW, C.M.S., VERGEER, W.P., DU PLOOY, S.J., BERNARD, M.P., RAMIREZ, F. & DE WET, W.J. (1987) DNA sequences in the first intron of the human pro- α 1(I) collagen gene enhance transcription. **The Journal of Biological Chemistry** **262**:15151-15157.
- RYDER, K. & NATHANS, D. (1988) Induction of proto-oncogene c-jun by serum growth factors. **National Academy of Science, Proceedings** **85**:8464-8467.
- RYDER, K., LANAHAN, PEREZ-ALBUERNE, E., NATHANS, D. (1989) Jun-D: A third member of the jun gene family. **National Academy of Science, Proceedings** **86**:1500-1503.
- SAFFER, J.D., JACKSON, S.P. & ANNARELLA, M.B. (1991) Developmental expression of Sp1 in the mouse. **Molecular and Cellular Biology** **11**:2189-2199.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1.21-1.105; 5.3-5.90; 10.6-10.68.
- SANGIORGI, F.O., BENSON-CHANDA, V., DE WET, W.J., SOBEL, M.E., TSIPOURAS, P. & RAMIREZ, F. (1985) Isolation and partial characterization of the entire human pro- α 1(II) collagen gene. **Nucleic Acids Research** **13**:2207-2225.
- SARTORELLI, V., WEBSTER, K.A. & KEDES, L. (1990) Muscle-specific expression of the cardiac α -actin gene requires MyoD1, CArG-box binding factor, and Sp1. **Genes & Development** **4**:1811-1822.
- SAS^R User's Guide: Statistics Version 5 Edition. (1985) SAS Institute Incorporated. Cary, NC, USA. p.1-956.

SCHIRM, S., JIRICNY, J. & SCHAFFNER, W. (1987) The SV40 enhancer can be dissected into multiple segments, each with a different cell type specificity. **Genes & Development** 1:65-74.

SCHLEIF, R. (1987) Why should DNA loop? **Nature** 327:369-370.

SCHMIDT, A., ROSSI, P. & DE CROMBRUGGHE, B. (1986) Transcriptional control of the mouse $\alpha 2(I)$ collagen gene: Functional deletion analysis of the promoter and evidence for cell-specific expression. **Molecular and Cellular Biology** 6:347-354.

SERFLING, E. (1989) Autoregulation: A common property of eukaryotic transcription factors? **Trends in Genetics** 5:131-133.

SERFLING, E., JASIN M. & SCHAFFNER, W. (1985a) Enhancers and eukaryotic gene transcription. **Trends in Genetics** 1:224-230.

SERFLING, E., LÜBBE, A., DORSCH-HASLER, K. & SCHAFFNER, W. (1985b) Metal-dependent SV40 viruses containing inducible enhancers from the upstream region of metallothionein genes. **The EMBO Journal** 4:3851-3859.

SETOYAMA, C., LIAU, G. & DE CROMBRUGGHE, B. (1985) Pleiotropic mutants of NIH 3T3 cells with altered regulation in the expression of both Type I collagen and fibronectin. **Cell** 41:201-209.

SHARP, P.A. (1992) TATA-binding protein is a classless factor. **Cell** 68:819-821.

SHERWOOD, A.L. & BORNSTEIN, P. (1990) Transcriptional control of the $\alpha 1(I)$ collagen gene involves orientation- and position-specific intronic sequences. **Biochemical Journal** 265:895-897.

SIRUM-CONNOLLY, K. & BRINCKERHOFF, C.E. (1991) Interleukin-1 or phorbol induction of the stromelysin promoter requires an element that cooperates with AP-1. **Nucleic Acids Research** 19:335-341.

SLACK, J.L, LISK, D.J. & BORNSTEIN, P. (1993) Regulation of expression of the Type I collagen genes. **American Journal of Medical Genetics** 45:140-151.

SOBEL, M.E., YAMAMOTO, T., ADAMS, S.L. DiLAURO, R., AVVEDIMENTO, V.E., DE CROMBRUGGHE, B. & PASTAN, I. (1978) Construction of a recombinant bacterial plasmid containing a chick pro- α 2 collagen gene sequence. **National Academy of Sciences, Proceedings** 75:5846-5850.

SOGO, J., STASIAT, A., DE BERNADIN, W., LOSA, R. & KOLLER, T. (1987) Binding of protein to nucleic acids. (In Somerville, J. & Sheer, U., eds. *Electron microscopy in molecular biology: A practical approach*. Oxford : IRL Press. p. 61-79).

SU, W., JACKSON, S., TJIAN, R. & ECHOLS, H. (1991) DNA looping between sites for transcriptional activation: Self-association of DNA-bound Sp1. **Genes & Development** 5:820-826.

THÉVENY, B., BAILLY, A., RAUCH, C., RAUCH, M., DELAIN, E. & MILGRAM, E. (1987) Association of DNA-bound progesterone receptors. **Nature** 329:79-81.

TRAVERS, A.A. (1989) DNA conformation and protein binding. **Annual Reviews in Biochemistry** 58:427-452.

TSAI-MORRIS, C-H, CAO, X. & SUKHATME, V.P. (1988) 5' Flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. **Nucleic Acids Research** 16:8835-8847.

TULLIUS, T.D., DOMBROSKI, B.A., CHURCHILL, M.E.A. & KAM, L. (1987) Hydroxyl radical footprinting: A high-resolution method for mapping protein-DNA contacts. **Methods in Enzymology** 155:537-559.

VALERIO, D., DUYVESTYEN, M.G.C., DEKKER, B.M.M., WEEDA, G., BERKVENS, T.M., VAN DER VOORN, L., VAN ORMONDT, H & VAN DER EB, A.J. (1985) Adenosine deaminase: Characterization and expression of a gene with a remarkable promoter. **The EMBO Journal** 4:437-443.

VERGEER, W.P. (1988) Transfeksie van soogdiersellyne met pendelvektore vir die bestudering van transkripsionele reguleringsvolgordes in die mensgeen vir pro- α 1(I)-kollageen. Potchefstroom : PU vir CHO (M.Sc.-verhandeling) 146p.

VIKKULA, M., METSÄRANTA, M., SYVÄNEN, A-C., ALA-KOKKO, L., VUORIA, E. & PELTONEN, L. (1992) Structural analysis of the regulatory elements of the type-II procollagen gene. **Biochemical Journal** 285:287-294.

VUORIO, E. & DE CROMBRUGGHE, B. (1990) The family of collagen genes. **Annual Review in Biochemistry** 59:837-872.

WASYLYK, B. (1988) Enhancers and transcription factors in the control of gene expression. **Biochemica et Biophysica Acta** 951:17-35.

WASYLYK, C., IMLER, J.L. & WASYLYK, B. (1988) Transforming but not immortalizing oncogenes activate the transcription factor PEA 1. **The EMBO Journal** 7:2475-2483.

WELLS, R.D., COLLIER, D.A., HANVEY, J.C., SHIMIZU, M & WOHLRAB, F. (1988) The chemistry and biology of unusual DNA structures adopted by oligopurine-oligopyrimidine sequences. **Faseb Journal** 2:2939-2949.

WERNER, D. CHEMLA, Y & HERZBERG, M. (1984) Isolation of polyadenylated RNA by paper affinity chromatography. **Annalytical Biochemistry** 101:329-336.

WILLIAMS, T. & TJIAN, R. (1991) Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. **Genes & Development** 5:670-682.

WILLIAMS, T., ADMON, A., LÜSCHER, B. & TJIAN, R. (1988) Cloning and expression of AP-2, a celltype-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. **Genes & Development** 2:1557-1589.

XU, L., THALI, M. & SCHAFFNER, W. (1991) Upstream box/TATA box order is the major determinant of the direction of transcription. **Nucleic Acids Research** 19:6699-6704.

YAMAGUCHI, M., HAYASHI, Y. & MATSUKAGE, A. (1988) Mouse DNA polymerase β gene promoter: Fine mapping and involvement of Sp1-like mouse transcription factor in its function. **Nucleic Acids Research** 16:8773-8785.

YAMAMOTO, T., MATSUI, Y., NATORI, S. & OBINATA, M. (1989) Cloning of a housekeeping-type gene (MER5) preferentially expressed in murine erythroleukemia cells. **Gene** 80:337-343.

ZENKE, M., GRUNDSTRÖM, T., MATTHES, H., WINTZERITH, M., SCHATZ, C., WILDEMAN, A. & CHAMBON, P. (1986) Multiple sequence motifs are involved in SV40 enhancer function. **The EMBO Journal** 5:387-397.

ZHANG, P., RANEY, A.K. & McLACHLAN, A. (1993) Characterization of functional Sp1 transcription factor binding sites in the Hepatitis B virus nucleocapsid promoter. **Journal of Virology** 67:1472-1481.

BEDANKINGS

My opregte dank aan die volgende persone en instansies:

- * Prof.dr. Wouter de Wet vir sy hulp en leiding nie net gedurende hierdie studie nie, maar ook gedurende al die jare van nagraadse studie.
- * Mev. Ina van Rensburg vir die natrek van die figure.
- * Mev. Elsa Brand vir die taalkundige versorging van hierdie proefskrif.
- * Mev. Marie-Lou de Vries vir die taalkundige versorging van die engelse abstract en vir haar belangstelling.
- * Dr. Piet Pretorius vir sy hulp, raad en oor om te luister.
- * Dr. Lourens Tiedt van die Departement Elektronmikroskopie vir die gebruik van die donkerkamer.
- * Dr. José Sogo van die Instituut vir Selbiologie (ETH-Hönggerberg, Zürich, Switzerland) onder wie se leiding die elektronmikroskopie analises uitgevoer is en vir sy hulp en gasvryheid tydens my verblyf in Switzerland.
- * Dr. David Sargent (ETH-Hönggerberg, Zürich, Switzerland) vir die rekenaarprogram vir statistiese verwerkings van die TEM-data en Anton Opperman van die Departement Inligtingstegnologie en Bestuur om die rekenaarprogram hier te laat funksioneer.
- * Prof.dr. Faan Steyn van Statistiese Konsultasie Dienste vir sy hulp met die SAS-program.
- * Charlotte Rossouw vir die oösiet data.
- * Al my kollega's in die Departement Biochemie en Mikrobiologie vir hulle hulp, belangstelling en ondersteuning gedurende die afgelope jare.
- * Mimi de Vries vir die ruwe kernekstrakte en S-300 fraksies, haar raad, ondersteuning en vriendskap van al die jare.
- * My suster Karin vir die tik van hierdie proefskrif en haar eindelose geduld met my.
- * My ouers en familie vir hulle liefde, ondersteuning, geduld en opofferings gedurende al die jare van studie.
- * Al my vriende wat altyd bereid was om te luister en daar te wees vir aanmoediging en ondersteuning. Veral vir Marieke Koedood vir haar gasvryheid tydens my verblyf in Switzerland.
- * Die SNO vir hulle finansiële ondersteuning tydens die duur van hierdie studie.