

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Wechselwirkungen zwischen myb- Proteinen und DNA biophysikalisch charakterisiert. Mit dem Ziel, die molekularen Grundlagen der spezifischen Bindung von myb-Proteinen an eine Erkennungssequenz (TAACTG) zu untersuchen, wurde Plasmide hergestellt, die entweder als Expressionsvektoren oder als Bindungssubstrat in Experimenten verwandt wurden.

Die Arbeit gliedert sich in drei Teile:

Zuerst wurde ein synthetisiertes Oligodesoxynukleotid mit zwei TAACTG Sequenzen in das Plasmid pUC8 kloniert. Außerdem wurde dieses Oligodesoxynukleotid mit T4 DNA- Ligase aufliert und die multimeren Produkte auf einem PAGE Gel aufgetrennt. Ein 10- fach Multimer konnte in pUC8 kloniert werden. Durch Schneiden dieses Plasmids mit der Restriktionsendonuklease EcoRI werden große Mengen Oligodesoxynukleotide freigesetzt. Oligodesoxynukleotide in  $\mu\text{g}$ - Mengen sind als Substrat für biophysikalische Messungen notwendig.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das c- myb Gen des Huhns in das Plasmid pGEX- 2T kloniert. Ausgehend von diesem Konstrukt, wurden zwei Deletionsmutanten hergestellt, die eine (pTiHo106) enthält die DNA- bindende Domäne, bei der C- terminal fünf Aminosäuren fehlen, während das Plasmid pTiHo107 die gesamte DNA- bindende Domäne enthält. Nach Induktion in E.coli Zellen, produzieren diese lösliche GST/myb- Fusionsproteine, die über Affinitätschromatographie gereinigt werden können. Diese Fusionsproteine werden mit Thrombin gespalten, hierbei werden lösliche myb- Proteine erzeugt. Es ist dies das erste Mal, daß myb Proteine in löslicher Form dargestellt wurden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde versucht, die DNA- Bindung der Proteine biophysikalisch zu charakterisieren. Im Nitrozellulosefilterbindungs-"Assay" und im "Shift Assay" konnte gezeigt werden, daß das vom Plasmid pTiHo107 produzierte Protein spezifisch an die DNA band, während hingegen das pTiHo106- Protein unspezifische Bindung zeigte. Es kann daraus geschlossen werden, daß die fünf Aminosäuren am C- Terminus der DNA- Bindungsdomäne eine wichtige Rolle in der spezifischen DNA- Bindung spielen.

**Seyed Habibollah Hosseini**

**Biophysical characterization of the myb oncogene product**

## **7. Summary**

**This thesis deals with the biophysical characterization of the interaction of MYB proteins and DNA. In order to understand the molecular basis of the specific recognition of a cognate sequence (TAACTG) by MYB proteins, plasmids were generated, serving either as expression vectors for myb proteins or as binding substrate.**

**This work is composed of three sections:**

**First, a synthetic oligodeoxynucleotide, bearing two TAACTG sequences, was cloned into the plasmid pUC8. Furthermore, this oligodeoxynucleotide was ligated with T4 DNA- ligase and the multimerized products were separated on a PAGE gel. A 10 fold multimer could be cloned into pUC8. When digested with the restriction endonuclease EcoRI, this construct releases large amounts of oligodeoxynucleotide. The supply of oligodeoxynucleotides in  $\mu\text{g}$  amounts are an important prerequisite for biophysical studies.**

**In the second part, the chicken c- myb gene was cloned into the plasmid pGEX-2T. Starting from this construct, two deletion mutants were generated, one (pTiHo106) contains a DNA-binding domain C-terminally truncated of five amino acids, the other (pTiHo107) spanning the entire DNA binding domain. Upon induction within E.coli, these plasmids produce soluble GST/myb- fusion proteins, which can be purified by affinity chromatography. These fusion protein can be cleaved with thrombin to yield soluble c- myb proteins. It is the first time, that myb- proteins could be isolated in a soluble form.**

**In the third section, a biophysical characterization of the binding of the proteins to the DNA was attempted. Using the nitrocellulose filter binding and the shift assay, it was demonstrated, that the myb protein of pTiHo107 binds specifically to the DNA, whereas the pTiHo106 protein does not. It is concluded, therefore, that the five amino acids, located at the C- terminus of the DNA binding domain play an important role in the specific DNA binding.**