

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Regulation der RNA-Polymerase II-  
Transkription durch humanen Mediator**

**VON**

**Gerhard Max Josef Mittler**

**aus Augsburg**

**2002**

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29.1.1998 von Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Meisterernst betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 17.05.2002

Gerhard Mittler

Dissertation eingereicht am 17.05.2002

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. M. Meisterernst
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Grosschedl

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2003

## DANKSAGUNGEN

Mein Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Michael Meisterernst für die Möglichkeit in seinem Labor bei einem nahezu unbegrenztem Forschungsetat meine Dissertationsarbeit anfertigen zu können. Dankbar bin ich insbesondere für den gewährten Freiraum in der Forschung, das stete Interesse am Fortgang der Arbeit und die Finanzierung der Teilnahme an zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen, bei der ich Teilergebnisse meiner Arbeit präsentieren und wertvolle Erfahrungen sammeln konnte.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Grosschedl danke ich dafür, als Gutachter der hier vorliegenden Arbeit zu fungieren, und den Vorsitz in der Prüfungskommission zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Elisabeth Kremmer und ihrer Arbeitsgruppe für die Herstellung monoklonaler Antikörper, ohne die diese Arbeit sicherlich nicht in dieser Form zustandegekommen wäre.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. H.T.M. Timmers von der Universität Utrecht (NL) für die Bereitstellung des anti-Polyglutamin-Antikörpers.

Bei allen ehemaligen und derzeit noch aktiven Mitgliedern der Arbeitsgruppe Genexpression möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die kollegiale Zusammenarbeit bedanken. Ein herzliches Dankeschön geht dabei an Thomas Stühler, Gertraud Stelzer, Elisa Piaia, Barbara Gänzler und Lucia Berti für die Unterstützung bei Experimenten.

Mein Dank gilt auch Frau Michèle Mattern für die technische Assistenz und das Übernehmen sonstiger Arbeiten.

Zum Schluß sei noch Frau Sigi Kastenmüller für die vielen und unermüdlichen Hilfestellungen im „Bükratendschungel“ gedankt.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 1998 bis April 2002 im Labor von Dr. Michael Meisterernst am Genzentrum der LMU bzw. dem Hämatologikum der GSF in München angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**Holloway A.F., Occhiodoro F., Mittler G., Meisterernst M., Shannon M.F. (2000).** Functional interaction between the HIV transactivator Tat and the transcriptional coactivator PC4 in T cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 21668-77

**Berti L., Mittler G., Przemec G.K., Stelzer G., Günzler B., Amati F., Conti E., Dallapiccola B., Hrabe de Angelis M., Novelli G., Meisterernst M. (2001).** Isolation and characterization of a novel gene from the DiGeorge chromosomal region that encodes for a mediator subunit. *Genomics* **74**, 320-32

**Mittler G., Kremmer E., Timmers H.T.M., Meisterernst M. (2001).** Novel critical role of a human Mediator complex for basal RNA polymerase II transcription. *EMBO Reports* **2**, 808-13

**Hardy S., Brand M., Mittler G., Meisterernst M., Yanagisawa J., Tora L. (2002).** TF1C mediates the transcriptional activity of the VP16 activation domain in concert with p300. Manuskript eingereicht.

**Mittler G., Stühler T., Berti L., Schaberg U., Lottspeich F., Meisterernst M. (2002).** VaCID is critical for the activity of the VP16 transactivation domain and functions via recruitment of human Mediator. In Vorbereitung

# Abkürzungen

293T	Menschliche embryonale Nierenkarzinom-Zelllinie
<i>A. thaliana</i>	Ackerschmalwand ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
aa	Aminosäure („amino acid“)
Abb.	Abbildung
Abs.	Absolut
Abschn.	Abschnitt
Ac-CoA	Acetyl-Coenzym A
AcOH	Essigsäure
AD	Aktivierungsdomäne
AdML	Adenovirus „Major Late“
AdMLP	Adenovirus „Major Late promoter“
AF	Aktivierungsfunktion
Amp	Ampicillin
AMV	„Avian myeloblastosis virus“
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARC	„Activator required cofactor“
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>B. anthracis</i>	Milzbranderreger ( <i>Bacillus anthracis</i> )
BAF	„Brg-1/Brm-associated factor“
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-4-Indolylphosphat
Bidest.	Bidestilliert
B-Med	Humaner Mediator Typ B
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad in Celsius
CAK	„Cell cycle-associated kinase“
CBP	„CREB binding protein“
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase („cyclin dependent kinase“)
cDNA	Zur mRNA komplementäre DNA
<i>C. elegans</i>	Fadenwurm ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )
Ci	Curie (1 Ci = 3.7 x 10 <sup>10</sup> radioaktive Zerfälle pro Sekunde)
CID	„Conserved interesting domain“
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm („calf intestine phosphatase“)
Cm	Chloramphenicol
CM	Carboxymethyl
CRSP	„Cofactor required for Sp1“
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
CTD	Carboxyterminale Domäne der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II
CV	Säulenvolumen („column volume“)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
<i>D. melanogaster</i>	Taufliege ( <i>Drosophila melanogaster</i> )

<i>D. rerio</i>	Zebrabärbling ( <i>Danio rerio</i> )
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
DGS	DiGeorge Syndrom
DMEM	„Dulbecco’s modified eagle medium“
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2’-Desoxyribonukleosid-5’-triphosphat
DPE	„Downstream promoter element“
DRIP	„Vitamin D receptor interacting proteins“
DRS	„Downstream repressing sequence“
ds	doppelsträngig („double stranded“)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2’-Desoxythymidin-5’-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	„Enzyme-linked immunoadsorbent assay“
EM	Elektronenmikroskopie
EMBL	„European Molecular Biology Laboratory“
EMSA	Gelretardationsexperiment („electromobility shift assay“)
EST	„expressed sequence tag“
EtOH	Ethanol
<i>F. rubripes</i>	Japanischer Kugelfisch ( <i>Fugu rubripes</i> )
FCS	Fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
fmol	Femtomol
FPLC	„Fast protein, polypeptide and Polynucleotide liquid chromatography“
g	Gramm
G418	Geneticin
GST	Glutathion S-Transferase
GTF	„General transcription factor“
GTP	Guanosin-5’-triphosphat
h	Stunde
H1	Subdomäne H1 der VP16 Aktivierungsdomäne
H2	Subdomäne H2 der VP16 Aktivierungsdomäne
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HeLa	Zelllinie aus menschlichem Cervix-Karzinom
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N’-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	„High performance liquid chromatography“
HR	Hormon-Rezeptor
HSV	<i>Herpes simplex</i> Virus
Htt	Huntingtin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
INR	Initiator
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Jurkat	menschliche T-Zelllinie

kb	Kilobasenpaar(e)
$k_D$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KLH	„Keyhole limpet hemacyanin“
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCR	„Locus control region“
m	Meter
M	Mol pro Liter (Molar)
mA	Milliampere
MAR	„Matrix attachment regions“
Med	Mediator
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMLV	„Moloney murine leucemia virus“
$\mu$ M	Micromolar
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MPa	Megapascal
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
Mt	Mutante
MTase	Methyltransferase
NAT	„Negative factor for activated transcription“
NBT	Nitroblautetrazolium
NC	Negativer Cofaktor
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
NER	„Nucleotide excision repair“
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal („nuclear localization signal“)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NRE	„Negative regulatory element“
nt	Nukleotid(e)
NTA	Nitrilotetraessigsäure („nitrilo tetra acetic acid“)
N-TEF	Negativer Transkriptions-Elongationsfaktor
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
OD	Optische Dichte
OMG	3'-O-Methylguanosin
ONPG	Ortho-Nitro-phenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ORF	Offener Leserahmen („open reading frame“)
$^{32}$ P	Phosphor-32
P11	Phosphocellulose P11
PAC	„Phage P1 artificial chromosomes“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAQ	PC2-assoziiertes Q-reiches Protein
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase

PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung („ <i>Phosphate buffered saline</i> “)
PC	Positiver Cofaktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PEG	Polyethylenglycol
pfu	„ <i>plaque forming units</i> “
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PIC	Präinitiationskomplex („ <i>pre-initiation complex</i> “)
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pmol	Pikomol
pol	Polymerase
P-TEF	Positiver Transkriptions-Elongationsfaktor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACE	„ <i>Rapid amplification of cDNA ends</i> “
RNA	Ribonukleinsäure
RP	„ <i>Reversed phase</i> “
rpm	Umdrehungen pro Minute („ <i>rotations per minute</i> “)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S	Sedimentationskoeffizient in Svedberg
<sup>35</sup> S	Schwefel-35
SAR	„ <i>Scaffold-associated region</i> “
<i>S. cerevisiae</i>	Bäckerhefe ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
<i>S. pombe</i>	Spalthefe ( <i>Shizosaccharomyces pombe</i> )
SDS	Natriumlaurylsulfat („ <i>sodium dodecyl sulfate</i> “)
SEC	Größenausschlußchromatographie („ <i>size exclusion chromatography</i> “)
SMCC	„ <i>Srb/Mediator containing complex</i> “
SNF	„ <i>Sucrose non-fermenting</i> “
snRNA	Kleine kernlokalisierte RNA („ <i>small nuclear RNA</i> “)
Srb	„ <i>Suppressor of RNA polymerase II subunit B mutation</i> “
ss	einzelsträngig („ <i>single stranded</i> “)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat Puffer
SV40	„ <i>Simian virus 40</i> “
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAT	Transaktivator aus HIV
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAF <sub>II</sub>	TBP-assoziierter Faktor der Klasse II-Transkription
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TE	Tris-EDTA Puffer
Tet	Tetracyclin
TFII	Transkriptionsfaktor der Klasse II-Transkription
TFA	Trifluoressigsäure („ <i>trifluor acetic acid</i> “)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFTC	„ <i>TBP-free TAF-containing complex</i> “

TGE	Tris-Glycin-EDTA-Puffer
T <sub>m</sub>	minimale Schmelztemperatur („ <i>melting temperature</i> “)
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanyl-chloromethylketon
TRAP	„ <i>Thyroid hormone associated proteins</i> “
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Enzymeinheit („ <i>unit</i> “)
UAS	„ <i>Upstream activating sequence</i> “
URS	„ <i>Upstream repressing sequence</i> “
USA	„ <i>Upstream factor stimulatory activity</i> “
ÜN	Über Nacht
USF	„ <i>Upstream stimulatory factor</i> “
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UTR	„ <i>Untranslated region</i> “
UV	Ultraviolett
V	Volt
VaCID	„ <i>VP16 associated protein with conserved interesting domain</i> “
Vgl.	Vergleich
VP16	„ <i>Virion protein 16</i> “
v/v	Volumenanteil einer Flüssigkeit in einer Lösung („ <i>volume per volume</i> “)
VWA	Von-Willebrand-Faktor Typ-A
VWF	Von-Willebrand-Faktor
w/v	Gewichtsanteil eines Stoffes in einer Lösung („ <i>weight per volume</i> “)
XC	Xylencyanol
<i>X. laevis</i>	Krallenfrosch ( <i>Xenopus laevis</i> )
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-galactopyranosid
XP	Xeroderma pigmentosum



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Der Informationsfluß in biologischen Systemen</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Transkription von proteincodierenden Genen</b> .....	<b>6</b>
1.2.1. Eukaryontische RNA-Polymerasen .....	6
1.2.2. Struktur proteincodierender Gene und ihrer regulatorischen Sequenzen.....	7
1.2.3. Die Generellen Transkriptionsfaktoren .....	10
1.2.4. Mechanismen: Initiation, Elongation und Termination .....	12
1.2.5. Aktivatoren .....	16
1.2.5.1. Nukleäre Hormonrezeptoren.....	20
1.2.5.2. Der virale Aktivator VP16 .....	20
1.2.6. Repressoren .....	22
1.2.7. Akzessorische Proteine für die RNA-Polymerase II-Transkription.....	24
1.2.8. Transkriptionsregulation: ein Wechselspiel zwischen positiven und negativen Faktoren.....	27
<b>1.3. Mediatoren</b> .....	<b>28</b>
1.3.1. Der Mediator der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : ein Multiproteinkomplex.....	28
1.3.2. Mediatorkomplexe in Metazoen .....	36
1.3.2.1. Mediatorkomplexe in Säugern.....	37
1.3.2.2. Mediatorkomplexe der Taufliege und des Fadenwurms .....	40
1.3.3. Mediator als Endpunkt von Signalübertragungskaskaden .....	41
<b>1.4. Chromatin und Transkriptionsregulation</b> .....	<b>43</b>
1.4.1. Die DNA im Zellkern ist in Chromatin verpackt.....	43
1.4.2. Chromatinmodifikationen.....	44
1.4.2.1. Histone können acetyliert werden.....	44
1.4.2.2. Histone können deacetyliert werden .....	45
1.4.2.3. Histone können methyliert werden .....	46
1.4.2.4. Weitere Modifikationen .....	48
1.4.3. Der Histoncode .....	49
1.4.4. Chromatinremodellierungsmaschinen .....	50
<b>1.5. Aufgabenstellung</b> .....	<b>53</b>
<b>2. Material</b> .....	<b>54</b>
<b>2.1. Geräte und Hilfsmittel</b> .....	<b>54</b>
<b>2.2. Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial</b> .....	<b>56</b>
<b>2.3. Chemikalien und Biochemikalien</b> .....	<b>56</b>

<b>2.4. Radiochemikalien</b> .....	<b>60</b>
<b>2.5. Lösungen, Puffer und Kulturmedien</b> .....	<b>60</b>
2.5.1. Lösungen und Puffer .....	60
2.5.2. Medien .....	60
2.5.3. Antibiotikastammlösungen .....	61
<b>2.6. Enzyme</b> .....	<b>61</b>
<b>2.7. Oligodesoxyribonukleotide</b> .....	<b>62</b>
<b>2.8. Plasmide</b> .....	<b>64</b>
<b>2.9. Peptide</b> .....	<b>65</b>
<b>2.10. Bakterienstämme</b> .....	<b>65</b>
<b>2.11. Eukaryontische Zelllinien</b> .....	<b>66</b>
<b>2.12. Antikörper</b> .....	<b>66</b>
<b>2.13. Längenstandards</b> .....	<b>68</b>
2.13.1. DNA-Längenstandards .....	68
2.13.2. Protein-Längenstandards .....	68
<b>3. Methoden</b> .....	<b>69</b>
<b>3.1. Prokaryontische Zellkultur</b> .....	<b>69</b>
3.1.1. Anzucht von Bakterienkulturen .....	69
3.1.2. Dauerkulturen .....	69
<b>3.2. Eukaryontische Zellkultur</b> .....	<b>69</b>
3.2.1. Zellvermehrung eukaryontischer Zelllinien.....	69
3.2.2. Anlegen von Dauerkulturen .....	70
<b>3.3. Transformation von DNA</b> .....	<b>71</b>
3.3.1. Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> .....	71
3.3.2. Transformation nach Hanahan <i>et al.</i> .....	72
3.3.3. Transformation nach Pope <i>et al.</i> .....	72
<b>3.4. Transfektion von DNA und Analyse der Genexpression mittels transienter Reporter</b> .....	<b>72</b>
3.4.1. Transfektion mittels Calciumphosphat .....	72
3.4.2. Elektroporation .....	73
3.4.3. Auswertung der Transfektion .....	74
<b>3.5. Etablierung transgener Säugerzelllinien</b> .....	<b>75</b>
<b>3.6. Rekombinante DNA-Techniken und enzymatische Behandlung von DNA</b> .....	<b>76</b>
3.6.1. DNA-Restriktion .....	76

3.6.2. Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA mittels „ <i>Random-Hexamer-Priming</i> “ (Feinberg-Vogelstein-Technik).....	76
3.6.3. „ <i>Annealing</i> “ von Oligodesoxyribonukleotiden.....	77
3.6.4. Phosphorylierung von Oligodesoxyribonukleotiden und radioaktive Markierung am 5'-Ende .....	77
3.6.5. Dephosphorylierung von geschnittener Vektor-DNA .....	78
3.6.6. Abbau bzw. Auffüllen überstehender Enden mit Kleenow-Fragment.....	78
3.6.7. Ligation .....	79
3.6.7.1. Ligation von überstehenden Enden.....	79
3.6.7.2. Ligation von glatten Enden.....	79
3.6.8. Reinigung von DNA nach enzymatischer Behandlung .....	80
3.6.9. Die Polymerasekettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “, PCR).....	80
3.6.9.1. Amplifizierung von DNA und PCR-Klonierung .....	80
3.6.9.2. PCR-Mutagenese .....	81
3.6.9.3. PCR-Test auf Insertion des Fragmentes („ <i>PCR-Screening</i> “)......	82
3.6.9.4. Radioaktive Markierung von PCR-Produkten .....	82
3.6.10. Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	83
<b>3.7. Reinigung von DNA und RNA .....</b>	<b>83</b>
3.7.1. Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäurepräparation .....	83
3.7.2. Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren .....	84
3.7.3. Reinigung von DNA über Gelfiltration .....	84
3.7.4. Reinigung von DNA über DE52-Säulen .....	85
3.7.5. Minipräparation von DNA aus <i>E. coli</i> (Del Sal <i>et al.</i> , 1988).....	86
3.7.6. Plasmid-DNA-Präparation über Anionenauschersäulen.....	87
3.7.7. Reinigung synthetischer Oligodesoxyribonukleotide .....	87
3.7.8. Isolierung von RNA aus Säugerzellen.....	87
3.7.9. Poly(A)-Selektion.....	88
<b>3.8. DNA-Sequenzierung .....</b>	<b>89</b>
<b>3.9. Gelelektrophorese .....</b>	<b>89</b>
3.9.1. Agarosegelelektrophorese .....	89
3.9.1.1. Agarosegelelektrophorese von DNA .....	89
3.9.1.2. Denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese von RNA.....	89
3.9.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	90
3.9.2.1. Herstellung der Gele .....	90
3.9.2.2. Elektrophorese .....	92
3.9.2.3. Anfärbung der Proteine durch Coomassie-Brillantblau-Färbung .....	92
3.9.2.4. Kolloidale Coomassie-Färbung der Proteine nach Neuhoff <i>et al.</i> .....	92
3.9.2.5. Silberfärbung .....	93
3.9.3. Harnstoff-TBE-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	93

<b>3.10. Hybridisierung filtergebundener RNA: Northern Blot.....</b>	<b>94</b>
<b>3.11. Reverse Transkription.....</b>	<b>95</b>
<b>3.12. Isolierung und Identifizierung von cDNA-Klonen mittels Durchmustern einer Genbank</b>	
.....	<b>96</b>
3.12.1. Vermehrung und Reinigung von Lambda-Phagen .....	96
3.12.2. Durchmustern der Genbank.....	97
3.12.3. Umwandlung der lysogenen Phagen in Plasmide durch Cre-Rekombinase .....	99
<b>3.13. Proteinchemische Techniken .....</b>	<b>99</b>
3.13.1. Herstellung von Zellkernextrakten .....	99
3.13.1.1. Kernextrakte aus HeLa-Zellen.....	99
3.13.1.2. Kernextrakte aus Jurkat-Zellen (NAM-Protokoll).....	101
3.13.1.3. Kernextrakte aus adhärent wachsenden Zellen .....	102
3.13.2. Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	104
3.13.3. Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> .....	104
3.13.3.1. Expression.....	104
3.13.3.2. Native Aufarbeitung .....	105
3.13.3.3. Denaturierende Aufarbeitung.....	106
3.13.4. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	107
3.13.4.1. Bradford-Bestimmung .....	107
3.13.4.2. Photometrische Bestimmung nach Ehresmann .....	107
3.13.4.3. Photometrische Bestimmung nach Gill und von Hippel.....	107
3.13.5. Säulenchromatographie .....	108
3.13.5.1. Phosphocellulosechromatographie.....	108
3.13.5.2. DEAE-Cellulose-Chromatographie an DE52 .....	109
3.13.5.3. Kationenaustauscherchromatographie .....	109
3.13.5.4. Anionenaustauscherchromatographie .....	110
3.13.5.5. Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration).....	110
3.13.5.6. Nickel-NTA-Affinitätschromatographie.....	110
3.13.5.7. Glutathion-Sepharose-Chromatographie.....	111
3.13.5.8. Heparin-Sepharose-Chromatographie.....	112
3.13.6. Affinitätschromatographie an immobilisierten GST-Fusionsproteinen.....	113
3.13.6.1. Herstellung der Säulen.....	113
3.13.6.2. Durchführung.....	113
3.13.7. Immunaффinitätschromatographie.....	114
3.13.7.1. Herstellung der Säulen.....	114
3.13.7.2. Durchführung.....	116
3.13.8. Reinigung von Transkriptionsfaktoren .....	117
<b>3.14. Immunchemische Arbeitstechniken .....</b>	<b>119</b>

3.14.1. Nachweis filtergebundener Proteine: Western-Blot .....	119
3.14.2. Herstellung polyklonaler Antikörper .....	120
3.14.3. Herstellung monoklonaler Antikörper .....	120
3.14.3.1. Immunisierung der Ratten .....	121
3.14.3.2. Hybridoma-Fusionszelllinien .....	121
3.14.3.3. Fusion .....	121
3.14.3.4. Selektion der Klone und „Primär-Screening“ .....	122
3.14.3.5. Reklonierung .....	122
3.14.4. Immunfluoreszenz .....	122
3.14.5. ELISA .....	123
<b>3.15. Gelretardationsanalyse (EMSA).....</b>	<b>124</b>
<b>3.16. In-vitro-Transkription von RNA-Polymerase II-Reportern .....</b>	<b>125</b>
3.16.1. In-vitro-Transkription im Kernextrakt .....	125
3.16.1.1. Die G-freie Kasette und „run-off“-Transkription: Hilfsmittel zum Nachweis der Transkripte .....	126
3.16.1.2. “Primer-Extension“-Analyse der Transkripte .....	129
3.16.1.3. Immundepletion von Kernextrakten .....	131
3.16.2. In-vitro-Transkription im rekonstituierten System .....	131
<b>3.17. Helikaseaktivitätsuntersuchungen .....</b>	<b>132</b>
<b>3.19. Bioinformatik .....</b>	<b>134</b>
3.19.1. Homologie-Analysen .....	134
3.19.1.1. BLAST .....	134
3.19.1.2. PSI-BLAST .....	134
3.19.1.3. „Multiple Alignment“ .....	134
3.19.2. Vorhersage der Exon-Intron-Struktur von Genen .....	135
3.19.3. Vorhersage von Strukturmotiven .....	135
3.19.4. Sekundärstrukturvorhersagen .....	135
3.19.5. Auffinden von Kernlokalisationssequenzen .....	135
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>136</b>
<b>4.1. Strategie zur Reinigung von USA(100) und PC2 .....</b>	<b>136</b>
4.1.1. Ein Testsystem zur Messung der Cofaktoraktivität .....	136
4.1.2. Reinigungsschema .....	137
<b>4.2. Die Coaktivatorfunktion von PC2 läßt sich durch Affinitätssysteme depletieren .....</b>	<b>139</b>
4.2.1. Die PC2-Funktion bindet an die Aktivierungsdomäne des viralen Transaktivators VP16 .....	139
4.2.2. Die PC2 Funktion wird durch einen anti-Polyglutamin-Anktikörper beeinträchtigt .....	140
4.2.3. Proteine mit polyglutaminreichen Regionen coeluiieren mit PC2 .....	142

<b>4.3. Identifizierung und Reinigung des PC2-assoziierten glutaminreichen Proteins PAQ und Klonierung seines Gens .....</b>	<b>144</b>
4.3.1. Reinigung von PAQ1/2 zur Ermittlung von Peptidsequenzen mittels Massenspektroskopie.....	144
4.3.2. Klonierung der cDNA von PAQ und Bestimmung der Genstruktur .....	145
4.3.3. Das Gen für PAQ liegt auf dem langen Arm von Chromosom 22 im Abschnitt q11.21: der DiGeorge-Locus .....	152
4.3.4. Herstellung von Antikörpern gegen PAQ.....	154
<b>4.4. PAQ ist Teil eines Multiproteinkomplexes: der humane Mediator .....</b>	<b>156</b>
4.4.1. PAQ ist homolog zu TIG-1/ARC105 .....	156
4.4.2. PAQ ist in Metazoen evolutionär konserviert und besitzt Homologie-beziehungen zum Mediatorprotein Gal11 aus Hefe .....	156
4.4.3. Funktionelle Coelution von PAQ mit Mediatoruntereinheiten.....	161
4.4.4. Coimmunreinigung von PAQ und humanem Mediator.....	162
<b>4.5. Der humane Mediator ist ein neuer genereller Transkriptionsfaktor in physiologischen Transkriptionssystemen .....</b>	<b>164</b>
4.5.1. Der überwiegende Teil der humanen Mediatoren ist mit PAQ assoziiert.....	164
4.5.2. Die RNA-Polymerase II-Transkription ist Mediator-abhängig .....	166
4.5.3. Der humane Mediatorkomplex B-Med ist essentiell für die RNA-Polymerase II-Transkription ....	169
<b>4.6. Analyse der VP16-Transaktivierungsdomäne: auf dem Weg zum funktionellen Proteom .....</b>	<b>175</b>
4.6.1. Die VP16-Aktivierungsdomäne interagiert mit GTFs, Mediatoren und Chromatin-Faktoren .....	175
4.6.2. Ein neues Protein mit Homologie zur Von-Willebrand-Faktor Typ A-Domäne bindet an VP16:H1 .....	179
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>190</b>
<b>5.1. PAQ: eine neue Untereinheit humaner Mediatoren .....</b>	<b>190</b>
<b>5.2. Die Rolle von Mediator als basaler Transkriptionsfaktor .....</b>	<b>194</b>
<b>5.3. Zwei unterschiedliche Formen humaner Mediatoren .....</b>	<b>196</b>
<b>5.4. Die Aktivierungsdomäne von VP16.....</b>	<b>200</b>
<b>5.5. Ein evolutionär konservierter stabiler Kern in Mediatoren .....</b>	<b>203</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>207</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>210</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>233</b>
<b>8.1. TAF-enthaltende Komplexe: die TFIID- und SAGA-Familie .....</b>	<b>233</b>
<b>8.2. Mediatorkomplexe .....</b>	<b>234</b>
8.2.1. Der Hefe-Mediator: Funktion und Homologiebeziehungen der Untereinheiten.....	234

---

8.2.2. Der Mediator der Taufliche: Zugriffsnummern für die NCBI-Datenbank .....	236
<b>8.3. Mediator und Signaltransduktion .....</b>	<b>237</b>
8.3.1. Der Ras-Signalweg und Mediator .....	237
8.3.2. Der Wng/Wnt-Signalweg und Mediator .....	238
<b>8.4. Migration von Neuralleistenzellen im humanen Embryo .....</b>	<b>239</b>
<b>8.5. Colokalisation von PAQ und TRAP220 .....</b>	<b>240</b>
<b>8.6. Der PC2-Komplex nach Malik <i>et al.</i> .....</b>	<b>241</b>
<b>8.7. Aminosäure- und cDNA-Sequenz von p103/VaCID .....</b>	<b>242</b>



# 1. Einleitung

---

## 1.1. Der Informationsfluß in biologischen Systemen

Lebewesen lassen sich abstrakt-wissenschaftlich als biologische Systeme unterschiedlicher Komplexität beschreiben und müssen minimal die im folgenden aufgeführten Eigenschaften erfüllen.

1. Ein biologisches System muß die gesamte Information über seinen Aufbau und seine Funktion in sich selbst gespeichert haben. Diese Aufgabe übernimmt die *DNS* (Desoxyribonucleinsäure, engl. *DNA*), ein Makromolekül, welches aus homopolymeren Abfolgen von Zuckerbausteinen (Desoxyribose) besteht, die jeweils über eine Phosphatgruppe miteinander verestert sind (Phosphodiesterverbindung). Die Desoxyribosereste sind dabei jeweils mit einem von vier verschiedenen Molekülen, den *Nukleobasen* Thymin, Adenin, Guanin und Cytosin, funktionell derivatisiert und bilden so die Verbindungsklasse der Desoxyribonukleoside (Thymidin, Adenosin, Guanosin, Cytidin), welche die eigentlichen Buchstaben des Codes darstellen (Abb. 1). Aufgrund der Tatsache, daß die Ribose an sich eine asymmetrische Einheit repräsentiert (Abb. 1), sind die beiden Enden des linearen Polymers sterisch betrachtet unterschiedlich, was der DNA eine Direktionalität in der Anordnung ihrer Bausteine verleiht. Man unterscheidet daher (per Konvention) ein sogenanntes 5'- und 3'-Ende des DNA-Stranges. Die Nukleoside Adenosin (A) und Thymidin (T) können über zwei Wasserstoffbrückenbindungen spezifisch miteinander wechselwirken, wohingegen Guanosin (G) und Cytidin (C) über drei Wasserstoffbrücken miteinander in Interaktion treten. Generell interagiert immer eine *Purinbase* (Adenin, Guanin) mit einer *Pyrimidinbase* (Thymin, Cytosin). Diese sogenannte Basenpaarung kombiniert mit der Unidirektionalität des DNA-Polymers ermöglicht eine antiparallele Anordnung von zwei DNA-Strängen, die sterisch zur Bildung einer rechtsgängigen Doppelhelix führt. Dies führt zu einer nicht unerheblichen Stabilisierung der gespeicherten Information, da ein DNA-Strang somit immer als Matrize für die Synthese des komplementären Stranges dienen kann.

2. Die Information muß durch einen Kopiervorgang vermehrt und weitergegeben werden können, d.h. das biologische System muß in der Lage sein autonom replizieren zu können. Dabei soll die genaue Abfolge der Nukleoside, die sogenannte *DNA-Sequenz*, exakt kopiert werden. Dies wird in der Natur durch makromolekulare Maschinen bewerkstelligt (*DNA-Replikation*).

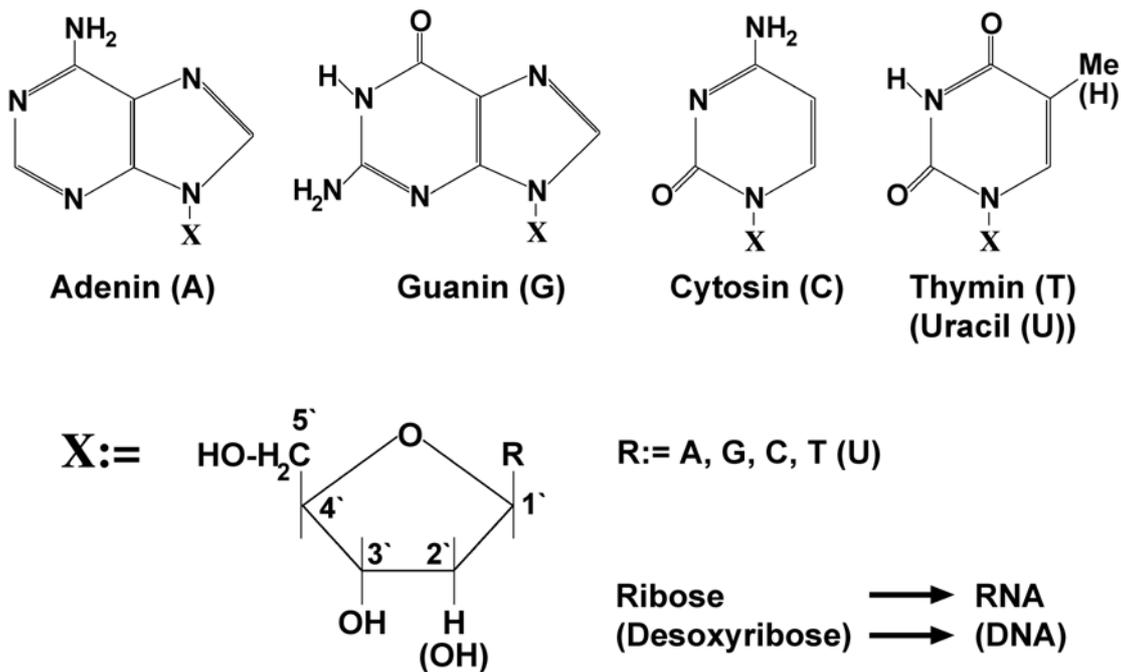
3. Die gespeicherte Information muß zur sinnvollen Ablesung (Expression) in irgendeiner Weise von der Umwelt separiert werden. Diese minimale funktionelle Einheit stellt die *Zelle* dar.

4. Da der Aufbau biologischer Systeme formal dem dritten Hauptsatz der Thermodynamik widerspricht, muß das System in der Lage sein die Entropieabnahme (Informationszunahme plus Strukturbildung) durch Dissipation von Energie zu kompensieren. Dies bedingt, daß biologische Systeme zur Aufrechterhaltung des Informationsflusses, der essentiell für die Funktion und die Integrität des Lebewesens ist, einen funktionierenden *Stoffwechsel* (Metabolismus) besitzen müssen, welcher die nötige Energie liefert.
5. Die in der DNA gespeicherte Information muß zeitlich und räumlich *reguliert* exprimiert werden können. Daher ist es unabdingbar, daß die Expression der Information durch intra- und extrazelluläre Signale gesteuert werden kann.

Mit diesem Thema, genauer gesagt mit der Frage, wie die Expression der Information reguliert werden kann, beschäftigt sich die nun folgende Abhandlung. Bei meinen Ausführungen werde ich mich allerdings auf das Reich der *Eukarya* (Eukaryonten) beschränken, zu denen alle multizellulären Organismen gehören, und damit auch der Mensch. Das besondere Kennzeichen der Eukaryonten ist, wie der Name schon sagt, das Vorhandensein eines Zellkerns, in dem nahezu die gesamte DNA einer Zelle kompartimentiert vorliegt. Die Regulationsprozesse bei *Eubacteria* (Bakterien) oder *Archaea* (Archaeobakterien), deren DNA nicht in einem separaten zellulären Kompartiment vorliegt, werde ich nicht besprechen bzw. nur am Rande erwähnen, da sie im Prinzip ähnlich zu denen der *Eukarya* sind, allerdings weit weniger komplex.

Die durch DNA codierte Information läßt sich abstrakt in zwei Kategorien einteilen: *Gene* und regulatorisch-strukturelle Sequenzen (genregulatorische Elemente, Startpunkte für die DNA-Replikation etc.). Gene zeichnen sich dadurch aus, daß ihre Sequenz im Prinzip linear in die Sequenz derjenigen Makromoleküle übersetzt wird, welche direkt zelluläre Funktionen ausüben bzw. diese steuern (Genprodukte). Dies sind die Polypeptide (*Proteine*) und die Ribonucleinsäuren (*RNS*, engl. *RNA*). Der gesamte Vorgang der Informationsübertragung wird als *Genexpression* bezeichnet. Im Gegensatz dazu determiniert die DNA-Sequenz der zweiten Gruppe die räumlich-strukturelle Anordnung der DNA-Doppelhelix (DNA-Konformation), die wiederum von Proteinen und/oder der RNA quasi "ausgelesen" werden kann.

Während Polypeptide aus allen erdenklichen Kombinationen der 21 'essentiellen' Aminosäuren (engl. „*amino acids*“, kurz "aa") aufgebaut sind, ist RNA mit DNA auf den ersten Blick nahezu identisch. Der wichtigste Unterschied zwischen RNA und DNA ist das Vorhandensein einer 2'-OH-Gruppe an der Ribose (Abb. 1), welcher allerdings drastische physiko-chemische Konsequenzen hat. Zum einen ist RNA chemisch weit weniger beständig als DNA, zum anderen ist der mögliche Konformationsraum für RNA-Moleküle weitaus größer als für DNA. Darüber hinaus verwendet die RNA Uracil an Stelle von Thymin (5'-Methyluracil) als Nukleobase.

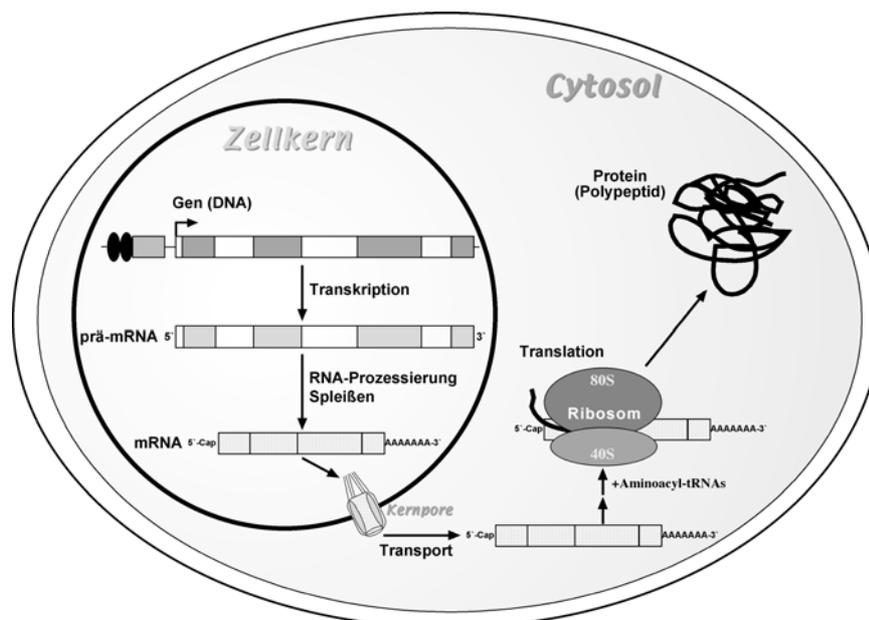


**Abb. 1:** Nucleobasen als Bausteine der DNA sind die Träger der Erbinformation. A und G gehören zur Stoffklasse der Purine, C, T und U (wird bei RNA an Stelle von T verwendet) zur Stoffklasse der Pyrimidine. Watson-Crick-Basenpaare sind A:T und G:C. Die Nucleobasen sind jeweils über eine N-glykosidische Bindung kovalent mit der Desoxyribose (bei DNA) bzw. mit der Ribose (bei RNA) verknüpft.

Die meisten Gene codieren für Proteine, deren Synthese allerdings nicht direkt durch die DNA gesteuert, sondern durch die sogenannte *Boten-RNS* (engl. „messenger“ RNA, kurz *mRNA*), die eine Art kurzlebigen Zwischenspeicher darstellt, vermittelt wird. Das Überschreiben der DNA-Sequenz in die RNA-Sequenz nennt man generell *Transkription*. Die Besonderheit bei Eukaryonten ist nun, daß das primäre Transkript („prä-mRNA“) erst in mehreren Schritten zur ‚reifen‘ mRNA prozessiert werden muß, welche erst dann als Matrize für die Proteinbiosynthese, *Translation* genannt, fungieren kann (Abb. 2). Die erforderliche Prozessierung ist eine Folge des mosaikartigen Aufbaus eukaryontischer Gene, bei denen codierende Abschnitte (Exons genannt) immer wieder von nicht-codierenden Abschnitten (als Introns bezeichnet) unterbrochen werden. Das Herausschneiden der Introns aus der prä-mRNA gekoppelt mit der Wiederverknüpfung der Exons - ein immens wichtiger Vorgang im Prozess der Genexpression - nennt man *Spleißen*. Die molekulare Maschine für das Spleißen, das Spleißosom, ist aus Proteinen und „small nuclear“ RNAs (snRNAs) aufgebaut, wobei die RNA-Komponenten die katalytische Funktion tragen. Zur finalen Reifung der mRNA wird diese noch an ihrem 3'Ende polyadenyliert und an ihrem 5'Ende mit einem 7-Methylguanosin-“cap“ versehen (Proudfoot, 2000). Da die Transkription und die Prozessierung im Nucleus stattfinden, die Translation aber im Cytoplasma der Zelle von statten geht, muß die fertige mRNA aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert werden, wo

ihre Sequenz vom *Ribosom* mit Hilfe von *Transfer-RNAs* (tRNAs) in die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins übersetzt wird (Abb. 2). Das Ribosom ist, wie das Spleißosom, eine große Ribonukleoproteinmaschine, bei der die RNA die Verknüpfung der Aminosäuren über Peptidbindungen katalysiert. Vergleicht man nun die mRNA-Sequenz mit einem Satz, dann sind die Ribonukleoside die Buchstaben, während die Wörter (Codons genannt) immer aus der Abfolge dreier Ribonukleoside bestehen. Alle Proteine besitzen an ihrem N-Terminus einen Methioninrest, weshalb das Codon AUG, sowohl Methionin als auch START bedeutet, wobei in der Regel das erste AUG in der mRNA-Sequenz als Startcodon interpretiert wird. Das Signal STOPP wird durch UAG, UAA oder UGA codiert. Die Translation basiert nun auf folgenden Prinzipien. Für jedes Codon, außer den STOPP-Codons gibt es eine spezifische tRNA, die wiederum von spezifischen Enzymen, den *Aminoacyl-tRNA-Synthetasen* mit der dem Codon entsprechenden Aminosäure beladen wird. Das Ribosom bindet die mRNA und Codon für Codon wird diese durch Anlagerung der jeweils spezifischen Aminoacyl-tRNA – die Erkennung erfolgt über die Basenpaarung – abgelesen, während das Ribosom die entsprechenden Aminosäuren zu einer kontinuierlich wachsenden Peptidkette polymerisiert, bis das Signal STOPP erreicht wird, und das fertige Protein freigesetzt wird.

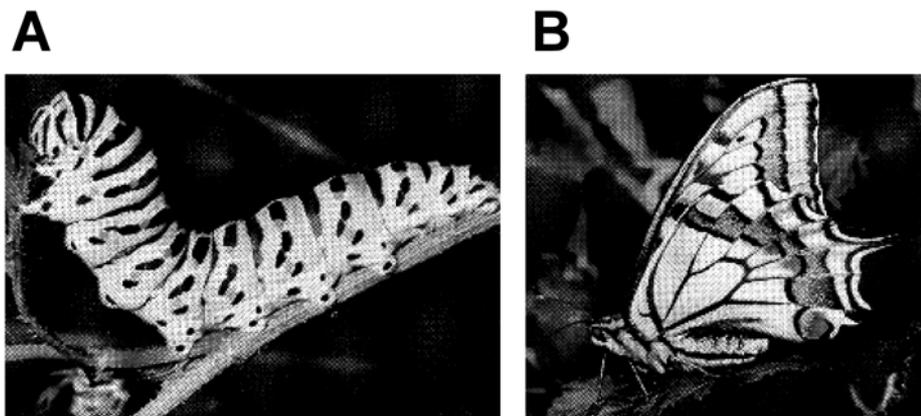
Zusammenfassend kann man feststellen, daß die Genexpression über die vier Stufen Transkription, RNA-Prozessierung, RNA-Transport und Translation läuft. Bei all diesen Schritten kann und wird nun in einer Zelle mittels verschiedener Mechanismen, auf die hier nicht eingegangen werden kann, Genexpression reguliert (Maniatis und Reed, 2002).



**Abb. 2:** Die Genexpression in Eukaryonten. Auf dem Weg vom Gen zur mRNA werden die Introns (weiße Rechtecke) herausgetrennt, und die RNA mit einem 5'-Cap und einem Poly(A)-Schwanz versehen. Das fertige Protein entsteht nach dem Transport der mRNA bei der Translation an den Ribosomen.

Diese Tatsache kann besonders anschaulich gemacht werden (siehe auch Abb. 3), wenn man den Zustand einer Zelle durch die folgenden vier Parameter “global” zu beschreiben versucht. Bezeichnet man mit *Genom* die Gesamtheit aller Gene, so versteht man unter *Transkriptom* die Gesamtheit der Primärtranskripte. Die zu einem Zeitpunkt prozessierte mRNA wird weiter als das *Expressom* einer Zelle, die Gesamtzahl ihrer Polypeptide hingegen, als deren *Proteom* betrachtet. Während das Genom, abgesehen von chemischen oder physikalischen Schädigungen, stabil bleibt, stellen die anderen drei Parameter variable Größen dar, die sich abhängig von intra- und extrazellulären Signalen (mitunter drastisch) ändern.

Die hier nun vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie die Variation des Transkriptoms realisiert wird, so daß in den folgenden Kapiteln ausschließlich von Transkriptionsregulation die Rede sein wird.



**Abb. 3:** Das Expressom bestimmt den Phänotyp eines Organismus. (A) Raupe und (B) Falter der Schmetterlingsart Schwalbenschwanz (*Papilio machaon*). Obwohl beide Entwicklungsstadien der Spezies das identische Genom besitzen, unterscheidet sich das Expressom von Raupe und Falter drastisch, was zu dem deutlich unterschiedlichen Erscheinungsbild führt. Das Proteom als eine Teilmenge des Expressoms ist für diese Prozesse maßgeblich verantwortlich.

## 1.2. Transkription von proteincodierenden Genen

### 1.2.1. Eukaryontische RNA-Polymerasen

Die komplette DNA-Sequenz von *Homo sapiens*, die im Rahmen des humanen Genomprojektes (HUGO) erstellt wurde, erlaubt eine Schätzung der Zahl menschlicher Gene auf dreißig- bis vierzigtausend. Die molekulare Maschine, welche die DNA-Abfolge dieser Gene in die RNA-Sequenz umschreibt, nennt man RNA-Polymerase.

Im Gegensatz zu Prokaryonten (*Eubacteria*, *Archaea*), die nur eine DNA-abhängige RNA-Polymerase besitzen, erfordert die enorme Komplexität eukaryontischer Genome drei verschiedene RNA-Polymerasen, welche im Zellkern für die Synthese verschiedener RNA-Spezies zuständig sind. Zusätzlich zu den nukleären Enzymen besitzen eukaryontische Zellen separate mitochondriale und (in Pflanzen) Chlorplasten RNA-Polymerasen, welche allerdings ähnlich wie die prokaryontischen (Endosymbiontentheorie!) funktionieren.

Biochemisch lassen sich die Aktivitäten der drei im Nukleus lokalisierten eukaryontischen RNA-Polymerasen anhand ihrer Empfindlichkeit gegenüber  $\alpha$ -Amanitin, einem Zellgift aus dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*), unterscheiden (Tab. 1). Ihre Nummerierung (RNA-Polymerase I-III) erhielten die Enzyme aufgrund der Reihenfolge ihres Auftretens im Chromatogramm einer DEAE-Cellulose-Säule, die mit Extrakten aus embryonalen Seeigelzellkernen beschickt und mit einem linearen Ammoniumsulfatgradienten entwickelt wurde (Roeder und Rutter, 1969).

Die RNA-Polymerasen I und III synthetisieren die Ribonucleinsäurekomponenten des Translationsapparates (rRNAs, tRNAs), während die RNA-Polymerasen II und III die RNA-Bausteine des Spleißosoms herstellen. Die proteincodierenden Gene jedoch werden ausschließlich von der RNA-Polymerase II transkribiert. Die Tatsache, daß letztere das in seiner Komplexität am weitesten entwickelte Regulationsnetzwerk aufweisen, macht sie zu einem äußerst attraktiven Studienobjekt der Transkriptionsregulation.

Typ	Gene	Transkripte	Lokalisation	$\alpha$ -Amanitin-Wirkung
Pol I	Klasse I	18S-, 5.8S- und 28S-rRNA	Nucleoli	keine
Pol II	Klasse II	Prä-mRNA, snRNA	Nukleoplasma	stark, $K_D=10^{-8}$ M
Pol III	Klasse III	tRNA, 5S-rRNA, snRNA	Nukleoplasma	schwach, $K_D=10^{-6}$ M

**Tab. 1:** RNA-Polymerasen im eukaryontischen Zellkern. Pol I, Pol II und Pol III bezeichnen die drei DNA-abhängigen RNA-Polymerasen. rRNA: ribosomale RNA; mRNA: "messenger" RNA; snRNA: "small nuclear" RNA (Komponenten des Spleißosoms), tRNA: "transfer" RNA.

Die RNA-Polymerase II besteht aus 12 Untereinheiten (Rpb1-Rpb12), wobei die beiden großen Untereinheiten Rpb1 und Rpb2, sowie Rpb3 und Rpb11 homolog zu den entsprechenden Untereinheiten der RNA-Polymerase I bzw. III sind. Darüber hinaus sind fünf Polypeptide des RNA-Polymerase II-Komplexes (Rpb5, 6, 8, 10 und 12) identisch mit Untereinheiten der beiden anderen eukaryontischen RNA-Polymerasen. Nur Rpb4, Rpb7 und Rpb9 sind RNA-Polymerase II-spezifische Proteine. Für die RNA-Polymerase II der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* – deren hochauflösende dreidimensionale Kristallstruktur vor kurzem gelöst wurde (Cramer *et al.*, 2000) – konnte gezeigt werden, daß Rpb4, Rpb7 und Rpb9 eine wichtige Rolle in der Initiation der Transkription spielen. Dabei kontrolliert Rpb9 zusammen mit den beiden großen Untereinheiten die Selektion der Startstelle der Transkription, wohingegen Rpb4 und Rpb7 anscheinend dynamische Komponenten des Enzyms sind, welche nur für die Initiation nicht aber für die Elongation gebraucht werden (Hampsey, 1998).

Eine Besonderheit der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II ist der Aufbau ihrer carboxyterminalen Domäne, *CTD* genannt, die aus Sequenzwiederholungen der Heptapeptidsequenz YSPTSPS besteht, deren Länge charakteristisch für eine Spezies ist. So besitzt *S. cerevisiae* 26-27, der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* 34, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* 43 und der Mensch 52 Wiederholungen dieser Sequenz. Zudem weichen die beiden letzten Sequenzwiederholungen von der genannten Consensussequenz, wiederum speziesspezifisch, ab. Eine für die Zelle essentielle Funktion der CTD wurde sowohl in Hefe (West und Corden, 1995) als auch im Säugersystem (Meininghaus und Eick, 1999) beschrieben. Die RNA-Polymerase II mancher Protisten wie *Giardia*, *Trichomonas* und der von Trypanosomiden, sowie mancher Rotalgen scheint hingegen keine klassische CTD zu besitzen (Stiller und Hall, 2002; Stiller *et al.*, 2000).

### **1.2.2. Struktur proteincodierender Gene und ihrer regulatorischen Sequenzen**

Die Transkriptionsregulation ist ein hoch-komplexer Prozess, der durch sogenannte Genschalter kontrolliert wird, wobei die Schaltelemente ihrerseits von spezifischen Proteinen bzw. Proteinkomplexen, *Transkriptionsfaktoren* genannt, gesteuert werden. Generell kann man zwei Arten von Genschaltern unterscheiden. Während genspezifische Elemente nur die Aktivität eines Gens beeinflussen, können globale Genschalter die Funktion einer Gruppe von Genen regulieren (Abb. 4).

Die genspezifischen Schalter bestehen aus dem *Promotor*, sowie *proximaler* und *distaler* Promotorelemente. Regulatorische DNA-Sequenzen, die „vor“ (5') der eigentlichen informationstragenden Region eines Gens liegen, konstituieren den Promotor. Proximale Promotorelemente liegen nahe dem Transkriptionsstart, in den meisten Fällen als UAS („*u*ps*u*stream *a*ctivating *s*equence“) bzw. URS („*u*ps*u*stream *r*e*u*pressing *s*equence“) „stromaufwärts“, manchmal auch als NRE („*n*egative *r*egulatory *e*lement“) oder DRS („*d*ownstream *r*e*u*pressing *s*equence“) „stromabwärts“ vom Promotor. Distale Promotorelemente wirken aus der Distanz (ein bis mehrere Kilobasen vom Promotor entfernt) unabhängig von ihrer Position und Orientierung. Als *Enhancer* stimulieren, als *Silencer* hingegen reprimieren sie die Transkription eines Gens (Ogbourne und Antalis, 1998).

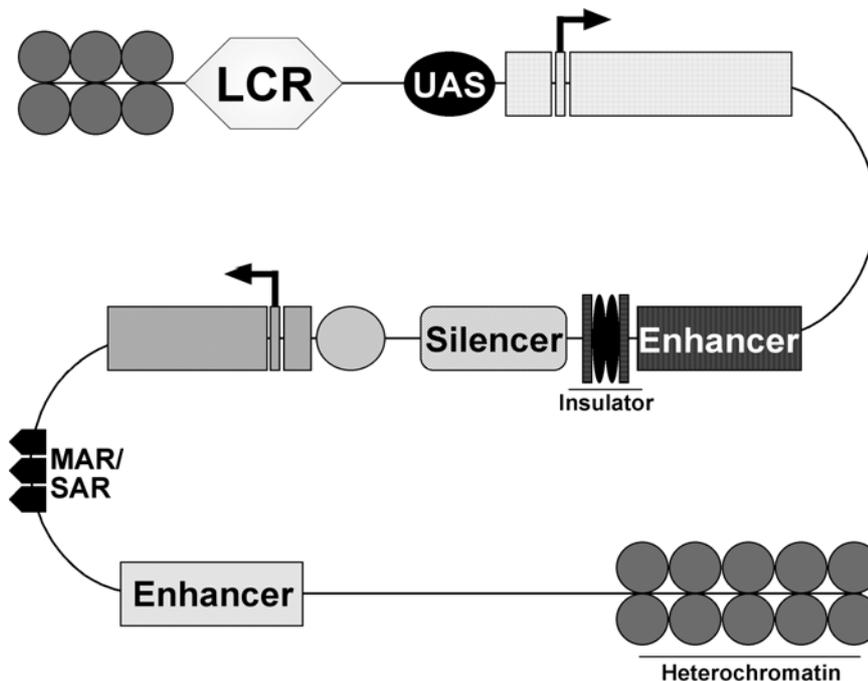
Globale Genschalter, wie *Insulatoren*, *MARs* („*m*atrix *a*ttachment *r*egions“) bzw. *SARs* („*s*caffold-associated *r*egions“) sind in ihrer Funktion und Wirkung noch nicht besonders gut untersucht. Man nimmt allerdings an, daß sie sowohl die globale *Chromatinstruktur* (siehe Abschn. 1.4.), als auch die Lokalisation größerer DNA-Bereiche (mehrere Megabasen) im Zellkern entscheidend beeinflussen (Bell *et al.*, 2001; Fernandez *et al.*, 2001; Francastel *et al.*, 2000; Martin, 2001). Einen Hybridstatus nehmen die *LCRs* („*l*ocus *c*ontrol *r*egions“) ein, die einerseits als Kollektion mehrerer starker Enhancer die Aktivität eines von mehreren Genen definierten Locus (im Zusammenspiel mit MARs) positions- und orientierungsabhängig steuern, andererseits aber für die genspezifische Transkriptionsaktivierung essentiell sind (Francastel *et al.*, 2000).

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, daß globale Genschalter und distale Promotorelemente insbesondere bei mehrzelligen Organismen verwendet werden, bei einzelligen Eukaryonten (wie beispielsweise der Bäckerhefe *S. cerevisiae*) dagegen kaum vorkommen, was auf ihre Rolle in der Etablierung zelltypspezifischer Genexpressionsmuster hinweist. Zudem erlaubt eine definierte Kombination von *cis*-Elementen (*Erkennungssequenzen* genannt), die als Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren auf der DNA fungieren, die Bildung variabler und hochspezifischer Genschalter.

Im Falle von Enhancern kann man dabei zwei verschiedene Konzepte verwirklicht sehen. Bei modularen Enhancern trägt jeder gebundene Transkriptionsfaktor additiv zum Ausgangssignal bei, während bei nicht-modularen Enhancern jeder einzelne Faktor essentiell für die Transkription des Gens ist. Somit wird ein „AN-AUS“-Mechanismus generiert, wobei der Zustand „AN“ vom Aufbau eines funktionellen *Enhanceosoms* abhängig ist (Struhl, 2001). Strittig hingegen ist immer noch die Frage, ob Enhancer nun die Transkriptionsrate eines Gens erhöhen, d.h. die Effizienz mit der ein bestimmtes Gen transkribiert wird, oder den Transkriptionsstatus – die Wahrscheinlichkeit, daß ein Gen

abgelesen wird – positiv regulieren. Vermutlich verwendet die Zelle aber beide der zwei möglichen Mechanismen (Martin, 2001).

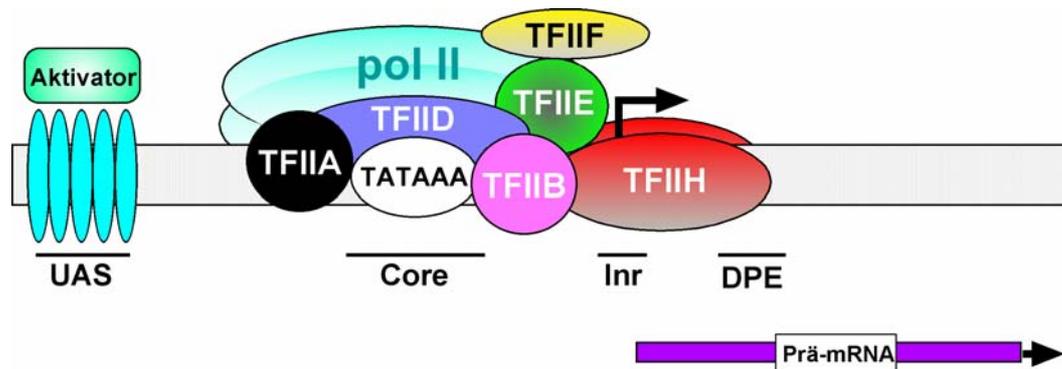
Am besten untersucht, sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Funktion, sind jedoch Promotoren. Ein Promotor enthält diejenigen Sequenzelemente, die für die Initiation der Transkription notwendig und hinreichend sind, und definiert somit die *basale* Transkription eines Gens. Hierzu gehören die *TATA-Box* (und sie umgebende Sequenzelemente), die ca. 30 bp vor dem Transkriptionsstart liegt und das pyrimidinreiche *Initiatorelement* (INR), das im Bereich des Transkriptionsstarts liegt. Die TATA-Box und das INR-Element können synergistisch, aber auch unabhängig voneinander funktionieren und definieren den Transkriptionsstart durch eine korrekte Positionierung des Transkriptionsapparates. „TATAlose“ Promotoren weisen im Vergleich zu „TATA-haltigen“ eine sehr viel geringere basale Aktivität auf. Fehlt zusätzlich noch das INR-Element, wird die Transkription an mehreren Stellen um den Startpunkt initiiert; eine heterogene Population von Transkripten unterschiedlicher Länge entsteht. In seltenen Fällen gibt es darüber hinaus Promotoren mit einem DPE („*downstream promoter element*“), 30 bp stromabwärts vom Transkriptionsstart, an Stelle der TATA-Box (Übersichtsartikel: Hampsey, 1998; Novina und Roy, 1996).



**Abb. 4:** Genregulatorische cis-Elemente dargestellt anhand eines hypothetischen Locus. Die Pfeile geben den Transkriptionsstart und die Richtung der RNA-Synthese an. LCR („*locus control region*“), UAS („*upstream activating sequence*“), MAR („*matrix attachment region*“), SAR („*scaffold-associated region*“). Der Insulator blockiert die Wirkung des Silencers auf das Gen stromaufwärts und die Wirkung des Enhancers auf das Gen stromabwärts.

### 1.2.3. Die Generellen Transkriptionsfaktoren

Die eukaryontischen nukleären RNA-Polymerasen erkennen, genauso wie die prokaryontische RNA-Polymerase, welche den  $\sigma$ -Faktor zur Promotorerkennung benötigt, nicht direkt den Transkriptionsstartpunkt von Genen, sondern nur in Verbindung mit weiteren Proteinen. Im Falle der RNA-Polymerase II sind dies die generellen Transkriptionsfaktoren, *GTFs* genannt, die den minimalen Satz an Faktoren darstellen, welche *in vitro* für die Transkription bestimmter Modellpromotoren benötigt werden (Abb. 5).



**Abb. 5:** Die Generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs). Der Pfeil gibt den Transkriptionsstartpunkt und die Richtung an. Der Transkriptionsfaktor (TF) TFIID erkennt und bindet die TATA-Box (TATAAA). UAS („*u*ps*u*ream *a*ct*v*ating *s*equence“), Core („*C*ore“-Promotor), Inr (Initiator), DPE („*d*ownstream *p*romoter *e*lement“), pol II (RNA-Polymerase II).

Die Herstellung von funktionellen Klasse II *in-vitro*-Transkriptionssystemen aus humanen Zellkernextrakten (Matsui *et al.*, 1980; Weil *et al.*, 1979) und die Fraktionierung dieser Extrakte führte zur Identifizierung der generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH (Übersichtsartikel: Hampsey, 1998; Lee und Young, 2000; Reinberg *et al.*, 1998; Roeder, 1996). Ein weiteres Charakteristikum der RNA-Polymerase II ist außerdem die Tatsache, daß sie, im Gegensatz zu allen anderen RNA-Polymerasen, die DNA im Bereich des Transkriptionsstartes der weitaus meisten Gene nicht selbst aufschmelzen kann, sondern dabei auf die Helikaseaktivität von TFIIH angewiesen ist. Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die RNA-Polymerase II sowohl zur Promotorerkennung als auch zur Promotoröffnung auf die Mithilfe der GTFs angewiesen ist. Deren genaue Zusammensetzung und Funktionsweise ist in Tabelle 2 dargestellt.

Faktor		Untereinheiten	M [kDa]	Funktion
TFIID	TBP	1	38	Promotorerkennung (TATA-Box); Rekrutierung von TFIIB;
	TAF <sub>II</sub> s	13	18-250	Promotorerkennung (INR, DPE); positive und negative regulatorische Funktionen;
TFIIA		3		Stabilisierung der TBP-DNA-Bindung; Stabilisierung von TAF <sub>II</sub> -DNA-Interaktionen; Antirepression;
TFIIB		1		Rekrutierung von RNA-Polymerase II und TFIIF; Determination der Transkriptionsstartstelle;
TFIIF		2		Rekrutierung von RNA-Polymerase II an den Promotor; Destabilisierung unspezifischer RNA-Polymerase II-DNA-Wechselwirkungen;
TFIIE		2		Rekrutierung von TFIIH; Modulation der Kinase-, Helikase- und ATPase-Aktivität von TFIIH; Erleichterung der Strangtrennung;
TFIIH	XPB/ ERCC3	1	89	3'-5'-Helikase; ATPase; essentiell für Promotoröffnung und frühe Elongationsphase der Transkription; NER;
	XPD/ ERCC2	1	80	5'-3'-Helikase; ATPase; wichtig für DNA-Reparatur: „ <i>nucleotide excision repair</i> “ (NER);
	MAT1	1	36	RING-Finger; stimuliert Kinaseaktivität; NER;
	Cdk7/ MO15	1	39	Cyclin-abhängige Kinase; Aktivierung durch Phosphorylierung von Threonin 170; Inaktivierung d. Phosph. von Serin 164 in Mitose; CTD-Kinasierung;
	Cyclin H	1	38	essentiell für Kinaseaktivität von Cdk7; kann durch Cdk8/Cyclin C phosphoryliert werden (Inaktivierung);
	p62	1	62	Bindungspartner für Aktivatoren (p53, VP16); NER;
	p52	1	52	NER;
	p44	1	44	Zink-Finger; wichtig für NER
	p34	1	34	NER;

**Tab. 2:** Die generellen Transkriptionsinitiationsfaktoren. Die Anzahl der Untereinheiten und die Molekulargewichte (M) gelten für die humanen Proteine. Der Faktor TFIIH spielt neben seiner Funktion in der Transkription auch eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur. TBP (TATA-Bindungsprotein), TAF<sub>II</sub>s (TBP-assoziierte Faktoren der Klasse II-Transkription), INR (Initiatorelement), DPE („*downstream promotor element*“), NER („*nucleotide excision repair*“).

TBP, das TATA-Box bindende Protein, nimmt in diesem Zusammenhang insofern eine besondere Stellung ein, als daß es bei der Transkription aller drei eukaryontischen RNA-Polymerasen beteiligt ist, und zwar als Bestandteil von SL1 bei der RNA-Polymerase I, von TFIID bei RNA-Polymerase II und als Komponente von TFIIB bei der RNA-Polymerase III. Außerdem ist TBP auch eine Untereinheit von SNAP<sub>C</sub>, einem Proteinkomplex der das „proximale Sequenzelement“ (PSE) erkennt, das die Transkription von snRNA durch RNA-Polymerase II und III steuert.

Im Kontext von TFIID ist TBP essentiell für die Erkennung und Bindung der TATA-Box, während bei „TATA-losen“ Promotoren und Genen mit einem DPE die TAF<sub>II</sub>s die essentiellen Kontakte mit der DNA vermitteln. Eine ausführliche Beschreibung der TAF<sub>II</sub>s (siehe auch Abschn. 8.1., Tab. 9) und ihrer Funktionen findet sich im folgenden Übersichtsartikel (Gangloff *et al.*, 2001). Ferner existieren noch zwei weitere TBP enthaltende Klasse II-Transkriptionsfaktoren – TAC (Mitsiou und Stunnenberg, 2000) und B-TFIID (Pereira *et al.*, 2001), welche TFIID *in vitro* ersetzen können, deren genaue Rolle in der RNA-Polymerase II-Transkription *in vivo* allerdings nicht bekannt ist.

Heute weiß man allerdings, daß TBP als GTF weder *in vivo* noch *in vitro* absolut essentiell für die RNA-Polymerase II-Transkription ist, sondern, daß es noch Paraloge von TBP gibt, die letzteres Gen- bzw. Promotor-abhängig ersetzen können (Muller *et al.*, 2001; Veenstra *et al.*, 2000). Man unterscheidet daher heute die *TBP-Familie*, zu denen TBP (Landpflanzen haben zwei, manche Archaen sogar drei TBP-Gene) und das Drosophila *TRF1* („*TBP-related factor*“) gehören, von der *TLF-Familie* („*TBP-like factor*“), die bisher nur in *Metazoa* gefunden wurde (Dantonel *et al.*, 1999). Für TRF1 konnte gezeigt werden, daß es an TC-Boxen bindet, die ca. 25 Nukleotide stromaufwärts von der Startstelle der Transkription liegen. Eine Consensussequenz für die TLFs ähnlich der TATA-Box im Falle von TBP ist bisher nicht bekannt.

#### 1.2.4. Mechanismen: Initiation, Elongation und Termination

Der Ablauf der Transkription proteincodierender Gene läßt sich formal in die drei Schritte *Initiation*, *Elongation* und *Termination* der Transkription einteilen. Die Initiation wird mit der Bildung des *Präinitiationskomplexes* („*pre-initiation complex*“, PIC), bestehend aus RNA-Polymerase II und den GTFs, eingeleitet. In einem gereinigten *in-vitro*-Transkriptionssystem läßt sich die PIC-Bildung in einen mehrstufigen Prozeß untergliedern. Inwiefern dies die *in-vivo*-Situation repräsentiert ist noch Objekt der aktuellen Forschung.

Beginnend mit der sequenzspezifischen Bindung von TFIID an den Promotor unter Ausbildung eines binären Komplexes, der durch TFIIA stabilisiert wird, erfolgt die Einleitung der PIC-Bildung. Der ternäre Komplex bildet so eine Andockstelle für TFIIIB, welches die Bindung eines bereits existierenden Komplexes aus RNA-Polymerase II und TFIIF durch eine gleichzeitige Interaktion mit TBP und der Polymerase ermöglicht. Die RNA-Polymerase rekrutiert zusammen mit TFIIF schließlich TFIIE und TFIIH unter Bildung eines „DABFpolEH“-Aggregates von nahezu 2 MDa. Bei Zufuhr von Energie in der Form von (d)ATP wandelt sich der „geschlossene“ PIC in die „offene“ Form um (*Isomerisierung*),

bei dem die beiden DNA-Stränge in einem kleinen Bereich „stromauf- und stromabwärts“ von der Initiationsstelle mit Hilfe der ATP-abhängigen 3`-5`-Helikaseaktivität von TFIIH aufgeschmolzen werden. Für den Adenovirus „*Major Late*“-Promotor (AdMLP) konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß der DNA-Bereich von -9 bis +2 (von der Startstelle aus gesehen) einzelsträngig wird. Werden dem *in-vitro*-System außer (d)ATP keine weiteren Nukleotide zugegeben, so kann keine RNA-Synthese stattfinden, und die Aufrechterhaltung des „offenen“ Zustandes erfordert eine kontinuierliche Hydrolyse von (d)ATP (an der  $\beta$ - $\gamma$ -Phosphodiesterbindung) durch TFIIH. Nach Zugabe von Nukleotiden, einhergehend mit der Bildung der dritten Phosphodiesterbindung, ist die Promotoröffnung auch ohne (d)ATP-Hydrolyse stabil und die Initiation ist abgeschlossen. Allerdings muß die RNA-Polymerase II immer noch zwei weitere Phasen durchlaufen bevor sie die elongationskompetente Form einnimmt, welche eine kontinuierliche RNA-Syntheserate ermöglicht. Erst mit dem Einbau des vierten Nukleotids in die wachsende RNA-Kette befindet sich die RNA-Polymerase II in einem Zustand, der im Englischen treffend mit „*escape commitment*“ bezeichnet wird, und dadurch gekennzeichnet ist, daß das Enzym nicht mehr durch Zugabe von Kompetitor-DNA von der DNA-Vorlage dissoziiert werden kann. Dieser Schritt und das Durchlaufen der Phase bis zur Knüpfung der neunten Phosphodiesterbindung – „*promoter escape*“ – werden von TFIIE, TFIIF sowie der XBP-Helikase von TFIIH extrem stimuliert, indem sie sowohl die Produktion abortiver Transkripte durch RNA-Polymerase II, als auch deren irreversibles Festsitzen verhindern. Diese Faktoren erhöhen also nicht die Transkriptionsrate sondern die Wahrscheinlichkeit für eine initiierte RNA-Polymerase II in die Elongationsphase überzugehen. Nach der Inkorporation des elften Nukleotids hat die XPB-Helikase keine Funktion mehr und mit der Ausbildung der fünfzehnten Phosphodiesterbindung ist das Verlassen des Promotors („*promoter clearance*“) abgeschlossen (Übersichtsartikel: Dvir *et al.*, 2001; Fiedler und Marc Timmers, 2000).

Kinetische Untersuchungen haben ergeben, daß beim AdMLP in der Abwesenheit von TFIIE und TFIIH und bei Verwendung von TBP und superhelikaler DNA der „*promoter escape*“-Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist (Kugel und Goodrich, 2000). In einem kompletten *in-vitro*-Transkriptionssystem, das alle GTFs sowie relaxierte AdML-Promotor-DNA enthält, ist zusätzlich die PIC-Bildung geschwindigkeitsbestimmend. Der Interleukin 2 (IL2)-Promotor hingegen weist nur einen kinetisch kontrollierten Schritt auf, und zwar die Rekrutierung von RNA-Polymerase II•TFIIF im Rahmen der Präinitiationskomplexbildung (Ferguson *et al.*, 2001). Genau diese Stufe bei der Ausbildung des PICs ist auch im Kontext des AdMLP geschwindigkeitslimitierend.

Die exakte Wirkungsweise der XPB-Helikase von TFIIH ist bis dato nicht im Detail verstanden. Sicher ist allerdings, daß das XPB-Protein keine klassische DNA-Helikase ist, sondern als eine Art molekularer Drehmomentschlüssel funktionieren muß,

der in einem ATP-getriebenen Prozeß die Rotation der DNA „stromabwärts“ relativ zur nicht frei drehbaren DNA „stromaufwärts“ vom Transkriptionsstartpunkt ermöglicht, was letztendlich zu einem Aufwinden der DNA am Initiationspunkt führt. Man nimmt an, daß in diesem Prozeß neben XPB-DNA-Kontakten auch Interaktionen von anderen TFIIH-Untereinheiten mit weiteren PIC-Komponenten eine entscheidende Rolle spielen (Kim *et al.*, 2000). Dafür spricht auch, daß für die volle Funktionalität von TFIIH *in vivo* dessen molekulare Integrität essentiell ist, wie das Beispiel von temperatursensitiven Punktmutationen in XPD bei vier Patienten, die an Trichothiodystrophy leiden, zeigt (Vermeulen *et al.*, 2001). Die Beschreibung von TFIIH als *PIC-Isomerase* wird somit dem aktuellen Wissensstand am besten gerecht, insbesondere wenn man davon ausgeht, daß die PIC-Bildung eine Windung der Promotor-DNA um die RNA-Polymerase II – mit allen topologischen Konsequenzen - zur Folge hat (Douziech *et al.*, 1999; Dvir *et al.*, 2001).

Eine weitere wichtige Rolle von TFIIH in der Initiation und frühen Elongation ist die Phosphorylierung der CTD von RPB1 durch den sogenannten *CAK*-Subkomplex, bestehend aus Cdk7, Cyclin H und MAT1. Während in gereinigten *in-vitro*-Transkriptionssystemen die CTD nur an ganz speziellen Promotoren gebraucht wird (z.B. DHFR-Promotor) ist die Phosphorylierung der CTD weder für die Initiation noch für die Elongation der Transkription nötig (Akoulitchev *et al.*, 1995). Im Kernextrakt hingegen ist sowohl die CTD als auch die Phosphorylierung der CTD abhängig von den Testbedingungen mehr oder weniger essentiell (Buermeyer *et al.*, 1995; Li und Kornberg, 1994), was sehr gut mit der *in-vivo*-Situation in der Bäckerhefe übereinstimmt, wo die Transkription - mindestens 87% aller Gene - von CAK abhängig ist (Holstege *et al.*, 1998). Allerdings ist auch im Fall der CTD-Phosphorylierung durch CAK, die molekulare Wirkungsweise nicht verstanden, und das simple Modell, daß nicht-phosphorylierte RNA-Polymerase II (Pol IIA) die initiationskompetente Form, an der CTD hyperphosphorylierte Polymerase (Pol IIO) dagegen die elongierende Form des Enzyms darstellt, wurde kürzlich in Frage gestellt (Castano *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 1999).

Als ziemlich sicher gilt hingegen, daß CAK Serin 5 und der positive Transkriptions-Elongationsfaktor b (*P-TEFb*; Price, 2000), der aus Cdk9 und Cyclin T1 besteht, Serin 2 in der Heptapeptidsequenz der CTD phosphoryliert, wobei der Transkriptionsaktivator Tat (Karn, 1999) aus HIV (humanes Immundefizienz-Virus) *P-TEFb* so umprogrammieren kann, daß dieser auch Serin 5 modifizieren kann. Für das „HIV-Kernextrakt-System“ konnte ferner gezeigt werden, daß die basale Transkription von Cdk7 bis zu einem Bereich zwischen Position +14 und +36, und von Cdk9 bis zur Position 79 abhängt (Zhou *et al.*, 2000).

Eine direkte Korrelation dieser Beobachtungen mit der CTD-Modifikation konnte bisher allerdings nicht bewiesen werden. Zudem scheinen die N-TEFs (negative Transkriptions-Elongationsfaktoren) DSIF und NELF durch Phosphorylierung inaktiviert zu werden (Kim und Sharp, 2001; Ping und Rana, 2001) und ihre hemmende Wirkung auf die Transkriptionselongation üben sie auch bei der Verwendung CTD-freier RNA-Polymerase II aus (Yamaguchi *et al.*, 1999).

Ein weiterer Grund für die essentielle Rolle der CTD *in vivo* liegt mit Sicherheit auch darin, daß Bestandteile der RNA-Prozessierungsmaschinerie mit der CTD interagieren und ihre Funktion von dieser abhängt (Übersichtsartikel: Hirose und Manley, 2000; Komarnitsky *et al.*, 2000). Die direkte stimulierende Wirkung von Komponenten des Spleißapparates auf die Elongation *in vitro* konnte kürzlich demonstriert werden (Fong und Zhou, 2001).

Im Elongationsmodus weist die RNA-Polymerase II eine beeindruckende Prozessivität auf, die es ihr unter anderem ermöglicht, ein Transkript mit einer Länge von zwei Millionen Nukleotiden – die Dystrophin-prä-mRNA – zu synthetisieren, ohne von der DNA-Vorlage zu dissoziieren. Ein Vergleich der prä-mRNA-Syntheserate *in vivo* (1200-1500 Nukleotide pro Minute) mit der *in-vitro*-Polymerisationsgeschwindigkeit gereinigter RNA-Polymerase II (300-400 Nukleotide pro Minute) führte zu der Beobachtung, daß das Enzym während der Elongation transient pausiert bzw. arretiert werden kann, und daß es Faktoren gibt (Elongationsfaktoren), welche die Elongationsgeschwindigkeit positiv beeinflussen (Übersichtsartikel: Conaway *et al.*, 2000). Als Beispiel sei hier der Transkriptions-elongationsfaktor TFIIS genannt, der es einer arretierten Polymerase, bei der das katalytische Zentrum im Bezug zur 3'OH-Gruppe der wachsenden RNA-Kette (was durch ein Zurückgleiten des Enzyms auf der DNA-Vorlage verursacht wird) falsch positioniert ist, erlaubt, in den produktiven Elongationsmodus zurückzukehren. TFIIS induziert dabei eine intrinsische Endoribonucleaseaktivität der RNA-Polymerase II, die ein Zurechtschneiden der RNA-Kette, einhergehend mit der Generierung eines neuen korrekt positionierten 3'OH-Endes, bewirkt. Interessanterweise wird auch die Elongationsphase der *E. coli*-RNA-Polymerase durch einen sehr ähnlichen Mechanismus reguliert, bei dem ein Heterodimer aus GreA und GreB die intrinsische Endoribonuclease aktiviert.

Schlußendlich muß die Transkription noch korrekt terminiert werden, wobei eine enge Kopplung der Termination mit der Polyadenylierung des 3'-Endes der prä-mRNA für diesen Vorgang als wesentlich betrachtet wird. Voraussetzung für die Termination ist die Freisetzung des Transkriptes, worauf die Dissoziation der Polymerase von der DNA erfolgt.

Dieses Zwei-Schritt-Modell ist durch folgende Abläufe charakterisiert. Zu Beginn der RNA-Synthese in einem Bereich von Position +1 bis +30 erfolgt das sogenannte „capping“, welches das 5'-Ende des Transkriptes markiert und die RNA vor einem Abbau durch RNasen schützt.

Fast alle eukaryontischen mRNAs werden an ihrem 3'-Ende polyadenyliert (eine Ausnahme bilden z.B. die Histon-mRNAs), eine Reaktion, die von einem cis-Element auf der prä-mRNA, dem Polyadenylierungssignal (poly(A)-Signal) mit der Consensussequenz AAUAAA, abhängt. Der Proteinkomplex CPSF („*cleavage polyadenylation specificity factor*“) erkennt und bindet diese Sequenz, woraufhin die RNA ca. 20 Nukleotide „stromabwärts“ meist nach einem A-, manchmal auch einem G-Rest, durch eine noch nicht-identifizierte Endoribonukleaseaktivität geschnitten wird. Ein GU- bzw. U-reiches cis-Element, das der Schnittstelle direkt folgt, ist zusätzlich für einen effizienten Ablauf dieser Reaktion notwendig, da es die Bindungsstelle für CstF („*cleavage stimulation factor*“) ist. Darüber hinaus wurden noch zwei weitere Faktoren beschrieben, CFI und CFII, die bei diesem Prozeß eine Rolle spielen. Eine Rekrutierung der poly(A)-Polymerase (PAP) durch CPSF leitet dann letztlich die Polyadenylierung ein (Proudfoot, 2001). Die Kopplung der 3'-Prozessierung mit der Termination der Transkription wird einerseits dadurch deutlich, daß sowohl CPSF als auch CstF mit der CTD der RNA-Polymerase II interagieren, und daß die CTD überdies essentiell für die Generierung des 3'-Endes der mRNA ist. Andererseits ist das Erkennen des poly(A)-Signals eine Voraussetzung für die korrekte Termination. Ungeachtet des Schneidens der prä-mRNA durch die 3'-Prozessierungsmaschinerie, die ja letztlich der Freisetzung des Transkriptes gleichkommt, setzt die Polymerase ihren Weg noch für 0.2 – 2.0 kb fort, bevor sie von der DNA-Vorlage dissoziiert. Die dabei produzierte RNA hat kein 5'-Cap, und wird deshalb äußerst rasch abgebaut. Wie dieser zweite Schritt genau gesteuert wird ist noch unklar, man geht aber davon aus, daß auch das Spleiß-Akzeptor-Signal des terminalen Introns, das heißt im Prinzip die Definition des terminalen Exons durch den Spleißapparat, die Dissoziation der RNA-Polymerase II in Gang setzt (Proudfoot, 2000; Proudfoot *et al.*, 2002). Die Polymerase steht nun für eine erneute Transkriptionsinitiation zur Verfügung.

### 1.2.5. Aktivatoren

Aktivatoren (und andere regulatorische Proteine) müssen zwei Voraussetzungen erfüllen. Sie müssen einerseits an spezifische Zielsequenzen eines bestimmten Gens binden und andererseits mit Komponenten des Transkriptionsapparates wechselwirken. Diese binäre Funktionalität äußert sich dementsprechend im modularen Aufbau dieser Proteine. Die weitaus meisten Aktivatoren haben eine DNA-Bindungsdomäne sowie eine (oder mehrere) Aktivierungsdomäne(n), die funktionell separierbar sind, und unabhängig voneinander agieren können. Zum Beispiel funktioniert die Aktivierungsdomäne des Hefeproteins Gal4 weiterhin als Transaktivator, wenn sie mit der DNA-Bindungsdomäne des bakteriellen Repressors LexA fusioniert wird, und gleichzeitig die Erkennungssequenzen für das

Gal4-Protein, „*Gal4-sites*“ genannt, durch „*LexA-sites*“ am Promotor ersetzt werden. Solche synthetischen Aktivatoren wirken an Reportergenen, welche die Erkennungsstellen für die jeweilige DNA-Bindungsdomäne enthalten, *in vitro* und *in vivo* (Ptashne und Gann, 1990). Die Rolle der DNA-bindenden Domäne ist also die Aktivierungsdomäne in die Nähe des Promotors zu bringen. Dementsprechend hat die Natur auch noch ein ähnliches Konzept entwickelt, indem sie die beiden Domänen (physikalisch getrennt) auf zwei Proteine verteilt, was eine höhere Flexibilität des Systems erlaubt, da nun die Aktivierungsdomäne (theoretisch) mit mehreren verschiedenen DNA-Bindungsdomänen interagieren kann und umgekehrt. Beispiele dafür sind das als Aktivator-wirkende Protein  $\beta$ -Catenin, das über die Wechselwirkung mit dem DNA-bindenden Protein TCF/LEF in Promotornähe gebracht wird (Übersichtsartikel: Eastman und Grosschedl, 1999), und die intrazelluläre Domäne von Notch (Notch-IC-Aktivator), welche durch CBF1/RBP-J $\kappa$  rekrutiert wird (Oswald *et al.*, 2001). Kürzlich wurde berichtet, daß auch TCF/LEF-1 Notch-IC an bestimmte Zielgene bringen kann (Ross und Kadesch, 2001). Zudem vermittelt CBF1/RBP-J $\kappa$  die Bindung des Epstein-Barr-Virus Transaktivators EBNA2 an virale Promotorelemente (Henkel *et al.*, 1994). Eine weitere Variation dieses Konzeptes repräsentiert das HIV TAT-Protein, welches an Stelle von DNA die TAR-RNA-Sequenz am 5'-Ende des viralen Transkriptes zusammen mit Cyclin T erkennt und bindet (Karn, 1999).

Man kann die Aktivatoren nun gemäß dem Typus ihrer DNA-Bindungs- sowie ihrer Aktivierungsdomäne in verschiedene Gruppen einteilen. Da diese Prinzipien schon in einschlägigen Lehrbüchern ausreichend behandelt sind, werde ich nur relativ kurz darauf eingehen.

In eukaryontischen Transkriptionsfaktoren findet man eine immer noch steigende Anzahl unterschiedlicher DNA-Bindungsmotive, deren am besten charakterisierte Vertreter an dieser Stelle kurz diskutiert werden (Übersichtsartikel: Harrison, 1991; Pabo und Sauer, 1992).

- Beim Zinkfinger (Mensch: SP1, Hefe: Gal4) ist im klassischen Fall ein  $Zn^{2+}$ -Ion über die Seitenketten von zwei Cystein- und zwei Histidinresten tetragonal koordiniert, und eine Schlaufe von ca. 23 Aminosäuren bildet dabei die fingerartige Ausstülpung. In der Regel hat ein Zinkfingerprotein mehrere Zinkfinger, die durch eine weitere Schlaufe von ca. sieben bis acht Aminosäuren getrennt sind, welche eine  $\alpha$ -helikale Struktur einnimmt, und die DNA bindet.
- Das „Helix-turn-helix (HTH)“-Motiv wurde zuerst bei DNA-Bindungsdomänen von Phagenrepressoren (z.B.  $\lambda$ cI-Repressor) gefunden. Zwei  $\alpha$ -Helices sind dabei über einen kurzen *Linker* (4 aa) miteinander verbunden, wobei eine  $\alpha$ -Helix in der großen Furche der DNA positioniert wird, während die andere in einem Winkel (ca.  $120^\circ$ ) quer zur DNA zum Liegen kommt. Die aktive Einheit ist ein Dimer, bei dem beide HTH-Domänen in enge räumliche Nähe kommen. Eine Abwandlung dieses Motivs findet man bei Eukaryonten in der *Homöobox* (ca. 60 aa) verwirklicht, welche aus drei  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist, wobei sich Helix 3 in die große Rinne der DNA legt (*Erkennungshelix*).

Helix 1 und Helix 2 liegen dabei in antiparalleler Anordnung eng beieinander, etwa in einem rechten Winkel zur Erkennungshelix positioniert. Prominente Vertreter sind die *Hox*-Proteine der Säuger, und die Polypeptide aus der Gruppe der *homöotischen* Gene von *Drosophila* (z.B. *engrailed* (*En*), *antennapedia* (*antp*), *ultrabithorax* (*ubx*), *even-skipped* (*eve*) und *fushi tarazu* (*ftz*)). All diesen Faktoren ist gemeinsam, daß sie eine essentielle Aufgabe bei der Embryogenese und der Umsetzung des Körperbauplans in der Entwicklung zum adulten Tier haben. Die Familie der POU-Proteine (Pit1, Oct, Unc86) stellen eine weitere Variation des beschriebenen Prinzips dar. Sie besitzen eine POU-Homöobox und eine POU-spezifische Domäne, die sich beide unabhängig voneinander zum HTH-Motiv falten können und durch ein flexibles Verbindungsstück von 14-26 Aminosäuren getrennt sind. Bei der POU-spezifischen Domäne konstituiert Helix 3 auch die Erkennungshelix, allerdings wird diese Domäne durch vier Helices gebildet.

- Das *bHLH*-Motiv („*basic helix-loop-helix*“) bei dem an zwei amphipathische  $\alpha$ -Helices, die über eine Schlaufe miteinander verbunden sind, eine basische Region angrenzt, findet man bei einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, welche Homo- bzw. Heterodimere bilden. Während die  $\alpha$ -Helices hauptsächlich die Dimerisierung vermitteln, ist die basische Region für die DNA-Bindung notwendig (z.B. E12, E47, MyoD).
- Beim *bZIP*-Motiv („*basic leucine zipper*“) ist eine amphipathische  $\alpha$ -Helix, bei der jeder siebte Aminosäurerest ein Leucin ist, ebenfalls mit einer basischen DNA-bindenden Region kombiniert. Das dadurch entstehende Gerüst ähnelt der Hälfte eines Reißverschlusses, bei dem die Leucinreste die Zacken bilden. Kombiniert mit einer weiteren *bZIP*-Domäne erfolgt die Dimerisierung zu einer „*coiled coil*“-Struktur, welche den Reißverschlußartigen Aufbau komplettiert. Durch die Dimerbildung kommen die basischen Regionen in eine Stellung, die mit dem Greifen einer Zange verglichen werden kann. Tatsächlich legen sich die basischen Regionen in der Form von  $\alpha$ -Helices – die Sekundärstruktur wird erst durch die Nucleinsäurebindung induziert - auf gegenüberliegenden Seiten in die große Furche der DNA. Vertreter dieser Gruppe im Säugersystem sind c-Jun, c-Fos und CREB, welche homo- bzw. heterodimerisieren können.
- Die *bHLH-ZIP*-Proteine c-Myc, Max, Mad und USF binden die DNA analog den *bZIP*-Faktoren, allerdings ist zwischen der basischen Region und der amphipathischen Helix noch eine HLH-Domäne inseriert.
- Die *T-Box* (Tbx1/Brachyury, Tbx3, Tbx4, Tbx5) hat Strukturelemente, die dem HTH-Motiv ähneln, allerdings sind die beiden Helices nur durch zwei Aminosäuren voneinander separiert, bilden im Gegensatz zum HTH-Motiv einen rechten Winkel miteinander, und die Erkennungshelix bindet die kleine Furche der DNA und nicht die große. Die gesamte DNA-Bindungsdomäne ist außergewöhnlich groß (200 aa), und besteht aus einem siebensträngigen „ *$\beta$ -barrel*“ (Immunglobulin-, „*fold*“) und vier Helices.

Zwei Helices binden wie erwähnt DNA (Helix 3 und Helix 4), während Helix 2 wichtig für die Dimerisierung der Domäne ist. Das Dimer überspannt dann in einer Art Bogen die DNA. Gleichzeitig interagiert eine Kombination aus zwei kurzen  $\beta$ -Faltblättern und Schlaufen mit der großen Rinne der DNA. Für T-Box-Faktoren konnte gezeigt werden, daß sie für die Embryonalentwicklung essentiell sind, insbesondere die Spezifizierung des Mesoderms hängt wesentlich von ihnen ab (Übersichtsartikel: Smith, 1999).

Aktivierungsdomänen bestehen gewöhnlich aus 30 bis 100 Aminosäuren und sind strukturell meist äußerst flexibel, so daß eine Klassifizierung nach Sekundärstrukturelementen nicht erfolgen kann. Ein Charakteristikum der Transaktivierungsdomänen ist allerdings das gehäufte Auftreten von Aminosäureresten mit gleichen chemischen Eigenschaften, so daß man *glutaminreiche* (Sp1, Oct1, Oct2, GAGA, Pu.1, CREB), *prolinreiche* (CTF/NF1, SMAD4, Oct2, AP-2, EKLF), *serin-/threoninreiche* (Sox-2, Sox-4, v-Rel) und *saure* (NF $\kappa$ B, VP16, E1A, Gal4, SREBP, Glucocorticoidrezeptor, p53, c-Jun, Pu.1) Domänen unterscheiden kann. Man nimmt daher an, daß die Aktivierungsdomänen in einem „*induced fit*“-Mechanismus, definierte Sekundärstrukturelemente ausbilden, wenn sie mit ihren Bindungspartnern interagieren (Bsp.: VP16, CREB; Parker *et al.*, 1998; Uesugi *et al.*, 1997). Dies ermöglicht im Gegenzug eine gewisse Variabilität im Hinblick auf mögliche Bindungspartner. Für die Transaktivierungsdomäne (TAD) von p53 konnte mit Hilfe von mehrdimensionalen NMR-Studien gezeigt werden, daß p53-TAD im ganzen zwar unstrukturiert vorliegt, trotzdem aber lokale Elemente mit Sekundärstruktur existieren (Lee *et al.*, 2000).

Interaktionspartner für Aktivierungsdomänen sind zum einen Komponenten der basalen Transkriptionsmaschine bzw. Elongationsfaktoren, zum anderen sogenannte Cofaktoren oder Coaktivatoren, welche eine Vermittlerrolle zwischen der regulatorischen Oberfläche des Aktivators und Bestandteilen der basalen Maschine einnehmen, oder Faktoren binden, welche die Chromatinstruktur (Abschn. 1.4.) ändern bzw. Histone modifizieren (Übersichtsartikel: Lemon und Tjian, 2000; Näär *et al.*, 2001; Orphanides und Reinberg, 2000). Diese Wechselwirkungen führen zu einer verstärkten Rekrutierung von generellen Transkriptionsfaktoren, allosterischen Änderungen im Präinitiationskomplex, Modifizierungen von GTFs und einer Öffnung der Chromatinstruktur bzw. Dissoziation negativer Regulatoren. Darüber hinaus wurde kürzlich über einen Einfluß von VP16 auf die RNA-Polymerase II-Elongation im Zusammenhang mit Effekten auf das Spleißen berichtet (Kadener *et al.*, 2001).

### 1.2.5.1. Nukleäre Hormonrezeptoren

Die nukleären Hormonrezeptoren sind Polypeptide, welche in einem ersten Schritt aufgrund des Hormonsignals vom Cytoplasma – wo sie durch Maskierung der Kernlokalisationssequenz durch Bindung an Hitzeschockproteine der Hsp90-Familie zurückgehalten werden – verstärkt in den Kern translokieren, um dort in einem zweiten Liganden-abhängigen Schritt die Transkription von Zielgenen anzuschalten. Insbesondere die Steroidhormonrezeptoren (Glucocorticoid-Rezeptor (GR), Androgen-Rezeptor (AR), Östrogen-Rezeptor (ER), Mineralcorticoid-Rezeptor (MR) und Progesteron-Rezeptor (PR)) sind auf diese Weise reguliert, während die zweite Gruppe von Hormonrezeptoren (Thyroidhormon-Rezeptor (TR), Vitamin D-Rezeptor (VDR), Retinsäure-Rezeptoren (RAR, RXR) und andere) meist schon ohne Ligand an ihre Erkennungssequenzen im Chromatin gebunden sind, und dort als negative Faktoren wirken. Die Steroidhormonrezeptoren binden als Homodimere an gegenläufige, palindrome Sequenzmotive, während die zweite Gruppe als Heterodimere, meist in Kombination mit RXR, direkte Sequenzwiederholungen, mit verschiedenen definierten Abständen, auf der DNA erkennen (diese Regeln werden aber nicht strikt eingehalten!). Die nukleären Hormonrezeptoren besitzen zwei entscheidende Gemeinsamkeiten. Erstens besteht ihre DNA-bindende Domäne aus zwei Cys2/Cys2-Zinkfingern, welche der gesamten Domäne einen globulären Zustand verleihen und zwei  $\alpha$ -Helices in einem rechten Winkel zueinander positionieren, wobei die N-terminale Erkennungshelix mit den HREs („*hormone response element*“) auf der DNA interagiert. Zweitens weisen sie eine N-terminal (AF1) bzw. eine C-terminal (AF2) gelegene Aktivierungsdomäne (Aktivierungsfunktion, kurz AF genannt) auf, wobei AF1 konstitutiv aktiv, AF2 hingegen nur bei Anwesenheit des Liganden aktiv ist.

### 1.2.5.2. Der virale Aktivator VP16

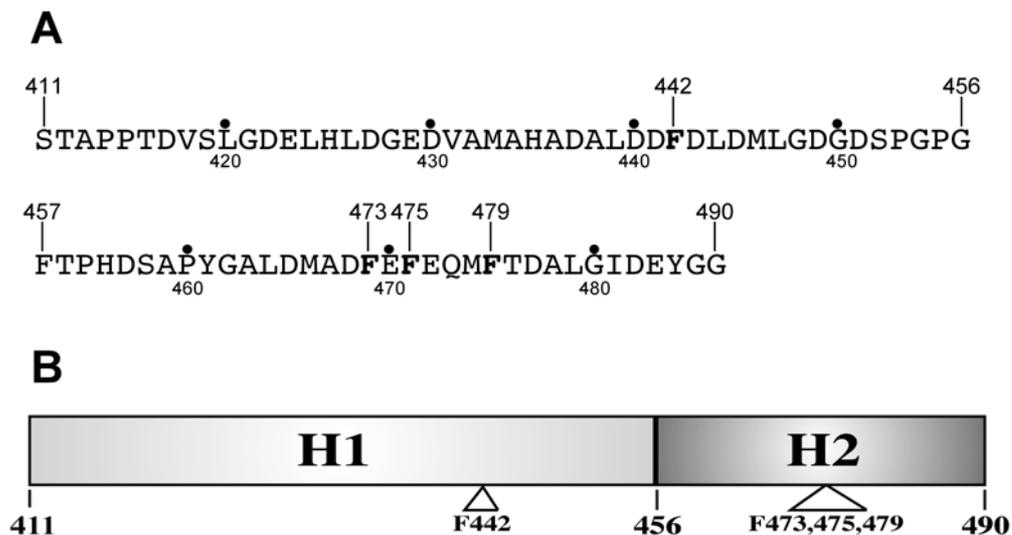
Das *Herpes simplex* Virus (HSV) Virion-Protein VP16 (Vmw65/ $\alpha$ TIF/VF65) ist ein außergewöhnlich starker Transaktivator, der eine saure Aktivierungsdomäne (aa 411-490) besitzt, aber aufgrund einer fehlenden (klassischen) DNA-Bindungsdomäne über eine Interaktion mit den zellulären Proteinen Oct-1 und HCF an seine Zielsequenzen (TAATGARAT) von Promotoren „früher“ („*immediate early*“) HSV-Gene gebracht wird. Die Kristallstruktur der hochkonservierten „*core*“-Domäne von VP16 (aa 49-412) zeigt zum einen ein neuartiges Sessel-ähnliches Faltungsmotiv, zum anderen liefert sie ein plausibles Modell, wie VP16 mit seinen Bindungspartnern Oct-1 bzw. HCF interagiert und selbst DNA-Kontakte machen kann (Liu *et al.*, 1999).

In zellulären Assays mit hohen Virusinfektionsraten von HSV-1 ist die Transkriptionsfunktion von VP16 nicht essentiell für die Virusreplikation, man konnte aber zeigen, daß unter natürlichen Bedingungen (im Kontext eines Organismus), wo ein Virus jeweils nur eine Zelle infiziert, der Transaktivator ein essentieller Faktor wird (Tal-Singer *et al.*, 1999). Dies gilt allerdings nur für Neuinfektionen, denn eine Reaktivierung der Virusvermehrung aus dem Ruhezustand einer bereits infizierten Zelle ist, abhängig vom metabolischen Zustand der Zelle, auch mit VP16-Mutanten zu verzeichnen, die defekt in der Transaktivierung sind (Preston und McFarlane, 1998; Smiley und Duncan, 1997).

Die Aktivierungsdomäne von VP16 (VP16-AD) läßt sich in zwei Subregionen unterteilen, die im folgenden VP16:H1 (aa 411-456) und VP16:H2 (aa 457-490) genannt werden (Abb. 6), und beide unabhängig voneinander in transienten Reporterassays funktional sind, aber zusammen in der VP16-AD synergistisch wirken. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die VP16-AD auch in der Bäckerhefe aktiv ist, was für einen hochkonservierten Mechanismus der Transaktivierung spricht. Studien haben gezeigt, daß die VP16-AD die Transkriptionsrate fördert, die Anzahl funktionaler PICs erhöht, die Prozessivität der RNA-Polymerase II steigert und die Isomerisierung des PICs zum offenen Komplex wesentlich erleichtert. Über folgende biochemische bzw. genetische Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren wurde berichtet:

- TFIIA (über VP16:H2)
- TFIIH: p62-Untereinheit (über VP16:H1 und VP16:H2)
- PC4
- TFIIF: RAP74-Untereinheit
- TFIIB
- TBP
- hTAF<sub>II</sub>31 (über VP16:H2)
- Swi/Snf-Komplex aus Hefe
- Hefe Ada2 (SAGA-Komplex)
- Tra-1 (SAGA- und NuA4-Komplex in Hefe)
- CBP/p300

Obwohl die VP16-AD einen hohen Anteil saurer Aminosäuren aufweist, haben Mutationsstudien demonstriert, daß neben E476, insbesondere die Phenylalaninreste an Position 442, 473, 475 und 479 wichtig für die Funktion sind (Abb. 6). Die mutierten Proteine VP16-H1F442P und VP16-H2FFF473-475-479AAA sind in zellulären Reporterassays deswegen nahezu inaktiv (Ikeda *et al.*, 2002).



**Abb. 6:** Die Aktivierungsdomäne des *Herpes simplex Virus 1* (HSV-1) Virion-Proteins VP16. (A) Aminosäuresequenz der VP16-Aktivierungsdomäne (VP16-AD). (B) Schematischer Aufbau der VP16-AD. Die für die Funktion äußerst kritischen Aminosäuren - F442 in der Subdomäne VP16:H1 (H1), F473, F475 und F479 in der Subdomäne VP16:H2 (H2) - sind hervorgehoben.

### 1.2.6. Repressoren

Die Kontrolle der Genexpression über Transkriptionsrepressoren ist, wie ein Blick auf die Entwicklungsgenetik von *Drosophila* zeigt (Mannervik *et al.*, 1999), ein enorm wichtiger Vorgang. Da das Hauptaugenmerk der Forschung lange Zeit auf Aktivierungsdomänen und ihre Interaktionspartner gerichtet war, ist der Wissensstand auf diesem Gebiet noch nicht so weit fortgeschritten. Vielleicht auch, weil es neben der „aktiven Repression“ auch eine „passive Repression“ gibt, beispielsweise dann, wenn in einem bestimmten Zelltyp essentielle Aktivatorproteine für eine Gruppe von Genen fehlen. Das Prinzip des modularen Aufbaus von DNA-bindenden Strukturen und repressorisch wirkender Oberflächen findet man zum Teil auch bei den Repressoren wieder. Generell kann man folgende Konzepte unterscheiden:

- Die direkte Konkurrenz mit generellen Transkriptionsfaktoren um die Promotorbindung. Ein Paradigma für diesen Mechanismus stellt der basale Repressor NC2, ein Heterodimer aus den Untereinheiten NC2 $\alpha$ /DRAP und NC2 $\beta$ /Dr1, dar, welcher durch Bindung von TBP (auch im Kontext von TFIID) an der TATA-Box, mit dem Einbau von TFIIA sowie TFIIB in den Präinitiationskomplex kompetitiert und somit die Rekrutierung von RNA-Polymerase II•TFIIF hemmt (Goppelt *et al.*, 1996).

In diesem Zusammenhang findet man auch das Konzept der *Antirepression* wieder, das sehr häufig in Prokaryonten Verwendung findet. In Hefe konnte gezeigt werden, daß die globale Genregulation vom Wechselspiel zwischen dem Repressor NC2 und dem Antirepressor TFIIA abhängt, da eine (ansonsten letale) Deletion von NC2 durch eine Punktmutation, welche TFIIA inaktiviert, supprimiert wird (Xie *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist TBP auch das Zielmolekül des Repressors *Eve* („*even-skipped*“) aus *Drosophila*. Ein anderes Protein der Taufliege, *Krüppel* genannt, reprimiert als Dimer durch direkte Interaktion mit der TFIIIE $\beta$ -Untereinheit die Transkription (Sauer *et al.*, 1995).

- Eine konkurrierende Bindung von Aktivator und Repressor um die Bindungsstelle auf der DNA. Hierfür können eine Reihe von Exempeln aufgeführt werden. Das bHLH-ZIP-Protein *Max* blockiert als Homodimer oder als Heterodimer im Komplex mit *Mad*, die Bindungsstelle für das Heterodimer Myc/Max. Da nur Myc eine TAD besitzt, wird die Transkription von Zielgenen von Myc/Max reprimiert. Das Homöoboxprotein *CDP* („*CCAAT displacement protein*“) kann, wie sein Name schon sagt Aktivatoren, die an die CCAAT-Sequenz binden (CTF, C/EBF), von dieser verdrängen, und so ein wichtiges positives proximales Promotorelement stillegen.
- Die Maskierung von Aktivierungsdomänen bzw. DNA-Bindungsdomänen, durch Heterodimerbildung mit Aktivatoren. Zum Beispiel kann das HLH-Protein *Id* (Inhibitor der Differenzierung) mit dem bHLH-Protein MyoD dimerisieren. Da *Id* aber die basische DNA-interagierende Region fehlt, kann MyoD/*Id* nicht an die Zielsequenz auf der DNA binden. Demgegenüber bindet das Gal80-Protein der Bäckerhefe an einen Teil der Aktivierungsdomäne von Gal4 und verhindert so die Transaktivierung.
- Eine Rekrutierung von Corepressoren (Übersichtsartikel: Courey und Jia, 2001). Diese wiederum können direkt mit der basalen Maschine interagieren, oder weitere Faktoren binden, die eine „geschlossene“ repressive Chromatinstruktur, entweder durch Modifikation von Histonen oder Änderungen in der globalen Struktur des Chromatins (Abschn. 1.4.), aufbauen. Vielfach benutzen Repressoren, die schon einem der eben beschriebenen Mechanismen gehorchen, diesen Weg als zusätzliche Möglichkeit die Transkription zu inhibieren. Als Beispiel hierfür soll das Mad/Max-Dimer dienen, das mit dem Corepressor mSin3a wechselwirkt, der wiederum die *Histondeacetylasen* (Abschn. 1.4.2.2.) HDAC1/mRpd3 und HDAC2 in einem Komplex mit anderen Proteinen bindet, und so eine „repressive“ Chromatinstruktur etabliert. Ganz ähnlich funktionieren die Corepressoren für nukleäre Hormonrezeptoren (in der Liganden-freien Form), wie N-CoR („*nuclear receptor corepressor*“) und SMRT („*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*“), die auch HDACs rekrutieren (Ayer, 1999). Eine interessante und evolutionär konservierte Klasse von Corepressoren ist die *Groucho/Tup1*-Familie. Kennzeichen sind eine „*seven-WD40-repeat*“-Domäne, die Tetramerisierung des Corepressors und die Wirkung aus der Distanz.

So ist das Drosophila Groucho-Protein ein Cofaktor für die Repressorproteine *Hairy*, *Runt*, *Engrailed*, *Gooseoid* und *Dorsal*. Der Hefe-Corepressor Ssn6(Cyc8)-Tup1 (Übersichtsartikel: Smith und Johnson, 2000) kann auch von einer Reihe von Heferepressoren rekrutiert werden, wie z.B. *Mig1* (Glucose-Repression von Genen), *Rox1* (Hypoxia-induzierte Gene) und *Nrg1* (Gene für Stärke-abbauende Enzyme). *CtBP*, ein anderer Drosophila-Corepressor kann hingegen nur von Promotor-proximalen Elementen aus seine Wirkung entfalten, und wird durch eine Reihe von Repressormolekülen aus dem frühen Drosophila-Embryo gebunden (*Giant*, *Knirps*, *Krüppel* und *Snail*). Das Orthologe aus Säugern bindet auch einige bekannte Transkriptionsfaktoren, darunter E1A, TCF und Ikaros.

- Indirekt kann die Transkription auch durch die Verhinderung des Transports von Aktivatoren in den Kern gehemmt werden. Ein Beispiel dafür ist der Aktivator NF- $\kappa$ B, der durch I- $\kappa$ B im Cytoplasma gebunden wird, was eine Maskierung seiner Kernlokalisationssequenz zur Folge hat. Eine Phosphorylierung von I- $\kappa$ B durch den I- $\kappa$ B-Kinasekomplex (IKK) führt zur Ubiquitinierung von I- $\kappa$ B und letztendlich zu seinem Abbau durch das Proteasom (Übersichtsartikel: Silverman und Maniatis, 2001). Der bereits erwähnte Aktivator  $\beta$ -Catenin liegt im Cytoplasma in einem Komplex mit *APC*, *Axin* und *Gsk3 $\beta$*  (Glycogensynthetase-Kinase 3 $\beta$ ) vor, was seine Phosphorylierung und einen Abbau durch das Proteasom zur Konsequenz hat. Durch ein extrazelluläres Signal (*Wnt*) wird das Protein *Dsh* („*dishevelled*“) aktiviert, welches durch Inhibition der Kinaseaktivität des Komplexes aus APC, Axin und Gsk3 $\beta$ ,  $\beta$ -Catenin stabilisiert, worauf letzteres in den Kern translokieren kann (Übersichtsartikel: Eastman und Grosschedl, 1999).

### 1.2.7. Akzessorische Proteine für die RNA-Polymerase II-Transkription

In den beiden vorangegangenen Abschnitten ist schon angedeutet worden, daß die Kontrolle der RNA-Polymerase II-Transkription durch Aktivatoren bzw. Repressoren nicht alleine durch Wechselwirkungen dieser regulatorischen Transkriptionsfaktoren mit den GTFs gesteuert wird, sondern daß dafür sogenannte Cofaktoren benötigt werden, welche die Signale von regulatorischen Oberflächen auf die basale Maschine übertragen. Nachdem Ende der achtziger Jahre zahlreiche Aktivatoren in Metazoen entdeckt wurden, war zunächst wenig über die Mechanismen der Transkriptionsaktivierung bekannt, insbesondere auch wegen der Komplexität der generellen Transkriptionsmaschine.

Nach Klonierung des TATA-bindenden Proteins (1989) wurden die TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) entdeckt (Dynlacht *et al.*, 1991) und ihre Beteiligung an der aktivatorabhängigen Transkription *in vitro* demonstriert. Da verschiedene Klassen von Aktivierungsdomänen an unterschiedliche TAFs im TFIID-Komplex binden, ergeben sich so zusätzliche Regulationsmöglichkeiten (Übersichtsartikel: Verrijzer und Tjian, 1996). Zur selben Zeit wurden Systeme aus gereinigten GTFs zur Untersuchung der Aktivierung durch regulatorische Proteine benutzt. Mit zunehmender Reinheit der Präparationen verloren diese Transkriptionssysteme ihre Fähigkeit von Aktivatoren stimuliert zu werden, was zur Entdeckung der als „Brückenproteine“ fungierenden Cofaktoren in Säugern (Meisterernst *et al.*, 1991) und in der Bäckerhefe (Flanagan *et al.*, 1991) führte.

Ausgehend von einem gereinigten funktionellen Klasse II *in-vitro*-Transkriptionssystem wurde nun durch säulenchromatographische Fraktionierung von HeLa-Zellkernextrakten ein biochemischer „Screen“ durchgeführt, um Faktoren zu identifizieren, welche die (*in vivo* unentbehrliche) Antwort auf Transaktivatoren wiederherstellen (Coaktivatoren). Zunächst gelang die Isolierung einer groben Fraktion, welche die Stimulation der Transkription durch Aktivatoren, wie das E-Box-bindende Protein USF oder das GC-Box-bindende Sp1 drastisch verstärkte, die basale Transkription hingegen reprimierte. Diese Cofaktorfraktion wurde USA („*upstream factor stimulatory activity*“) genannt (Meisterernst *et al.*, 1991), und war dann der Ausgangspunkt für die Reinigung der *generellen Cofaktoren*, die in der Folge *PCs* und *NCs* (positive und negative Cofaktoren) genannt wurden (Übersichtsartikel: Kaiser und Meisterernst, 1996). Eine Übersicht der Faktoren aus USA, die bis zum Beginn dieser Arbeit identifiziert wurden findet sich in Tabelle 3.

Aktivität	Identität	Wirkung	Funktionsweise	Literatur
PC1	PARP	positiv	stimuliert Transkription während der PIC-Bildung, aber nach Bindung von TFIID und TFIIA an den Promotor; Auto-ADP-Ribosylierung blockt Funktion; B-MYB Coaktivator; Cofaktor für AP-2; NFκB-Coaktivator; Repressor für Hormon-abhängige TR/RXR-Transaktivierung	(Cervellera und Sala, 2000; Hassa <i>et al.</i> , 2001; Kannan <i>et al.</i> , 1999; Meisterernst <i>et al.</i> , 1997; Miyamoto <i>et al.</i> , 1999)
PC2	-	positiv	stimuliert aktivatorabhängige und basale Transkription; MW ca. 500 kDa (SEC)	(Kretzschmar <i>et al.</i> , 1994b)
PC3/Dr2	Topo I	positiv und negativ	stimuliert aktivatorabhängige Transkription und inhibiert basale Transkription unabhängig von enzymatischer Aktivität; enzymat. Aktivität generell wichtig für Elongation <i>in vivo</i>	(Collins <i>et al.</i> , 2001; Kretzschmar <i>et al.</i> , 1993; Merino <i>et al.</i> , 1993)

Aktivität	Identität	Wirkung	Funktionsweise	Literatur
PC4	p15	positiv und negativ	stimuliert aktivatorabhängige Transkription durch verstärkte Rekrutierung von TFIIA und TFIID an den Promotor; Bindung an Heteroduplex-, ds- und ss-DNA; PC-Funktion durch Phosph. der N-terminalen SEAC-Region blockiert; Repression der basalen Transkription – Antirepression durch TFIIH-Helikase; Inhibition der CTD-Phosph. durch Cdk1, Cdk2 u. Cdk7; Cofaktor für Tat; Cofaktor für AP-2	(Branden <i>et al.</i> , 1997; Holloway <i>et al.</i> , 2000; Kaiser <i>et al.</i> , 1995; Kannan und Tainsky, 1999; Kretzschmar <i>et al.</i> , 1994a; Schang <i>et al.</i> , 2000; Werten <i>et al.</i> , 1998)
PC5	?	positiv	Coaktivator für USF; MW ca. 300 kDa (SEC)	(Halle <i>et al.</i> , 1995)
PC6	?	VP16-Spezifität	?	-
p52/p75	p52/p75	positiv	positiver Coaktivator; spezifische Bindung an VP16:H1; Interaktion mit Spleißfaktor ASF/SF2	(Ge und Roeder, 1994b; Ge <i>et al.</i> , 1998a; Ge <i>et al.</i> , 1998b)
NC1	HMG2	negativ	Inhibition der Transkription nach Bindung von TFIIA und TFIID an den Promotor; ohne Effekt nach Einbau des vierten Nukleotids; Antirepression durch TFIIH-Helikase	(Stelzer <i>et al.</i> , 1994)
Topo II	Topo II	positiv und negativ	Repression der basalen Transkription unabhängig von enzymat. Aktivität; Chromatin-abhängiger Coaktivator; enzymat. Aktivität generell wichtig für pol II-Transkript. <i>in vivo</i>	(Brou <i>et al.</i> , 1993; Collins <i>et al.</i> , 2001; Mondal und Parvin, 2001)
NC2	NC2 $\alpha$ , NC2 $\beta$	negativ	bildet mit TBP/TFIID und Promotor-DNA (TATA-Box) einen ternären Komplex; Kompetitiert um die Bindung von TFIIB und TFIIA; nach Einbau von pol II•F in den PIC wirkungslos; essentieller Faktor in <i>S. cerevisiae</i> ; Corepressor für Transkriptionsfaktor AREB6	(Goppelt <i>et al.</i> , 1996; Ikeda <i>et al.</i> , 1998; Kamada <i>et al.</i> , 2001; Meisterernst und Roeder, 1991; Xie <i>et al.</i> , 2000)
HMG1	HMG1	negativ	Bindung von TBP verhindert Einbau von TFIIB in den PIC	(Ge und Roeder, 1994a)

**Tab. 3:** Die humanen generellen Cofaktoren bestehen aus PCs (positiven Cofaktoren) und NCs (negativen Cofaktoren). Die Fähigkeit DNA zu binden, ist den meisten Cofaktoren gemein, und meist mit ihrer Funktion direkt korreliert. PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase), PIC („*pre-initiation complex*“), RXR (Retinsäurerezeptor), TR (Thyroidhormonrezeptor), MW (Molekulargewicht), SEC („*size exclusion chromatography*“, Gelfiltration), Topo (Topoisomerase), Dr2 (TFIID-Repressor 2), ds (Doppelstrang), ss („*single strand*“, Einzelstrang), VP16:H1 (Subdomäne H1 der Aktivierungsdomäne von VP16), HMG („*high mobility group protein*“, pol II (RNA-Polymerase II), pol II•F (RNA-Polymerase II•TFIIF-Komplex).

Eine ähnliche Studie mit einem *in-vitro*-Transkriptionssystem aus der Bäckerhefe führte zur Entdeckung des Hefe-Mediators (siehe Abschn. 1.3.1.), der sowohl die aktivierte als auch die basale Transkription stark stimuliert (Kim *et al.*, 1994).

Neben den generellen Cofaktoren gibt es allerdings noch eine Reihe weiterer Cofaktoren, insbesondere solche die das Chromatin modifizieren, bzw. den physikalisch-topologischen Zustand des Chromatins ändern (Abschn. 1.4.). Alternative Ansätze zur Suche nach Cofaktoren, die alleine auf der Identifizierung von Proteinen beruhen („*two-hybrid system*“, Affinitätschromatographie), welche mit Aktivierungsdomänen interagieren (nicht funktionsgekoppelter Ansatz), waren insbesondere bei den Hormonrezeptoren erfolgreich, und führten zu der Entdeckung von SRC-1/NCoA-1, SRC-2/TIF2/GRIP1/NCoA2 und SRC-3/RAC3/AIB1/ACTR/pCIP/TRAM-1 (Übersichtsartikel: Jenkins *et al.*, 2001; Lee und Lee Kraus, 2001; Leo und Chen, 2000).

### **1.2.8. Transkriptionsregulation: ein Wechselspiel zwischen positiven und negativen Faktoren**

Wie wichtig die konzertierte Aktion von Aktivatoren und Repressoren für die Homöostase der Zellen und damit für die Gesundheit eines ganzen Organismus ist, soll das folgende Beispiel demonstrieren (Liu *et al.*, 2001b). Bei der vererbaren Krankheit *Xeroderma pigmentosum* (XP) treten aufgrund von Mutationen in den beiden TFIIH-Untereinheiten XPB und XPD (Abschnitt 1.2.3.) verschiedene, meist mit der Haut assoziierte Krebsarten auf. Ein Grund für die frühe Carcinogenese in XP-Patienten, ist der Defekt in der XPD-Helikase, welche für die DNA-Reparatur benötigt wird. Damit ließ sich das Krankheitsbild aber nicht ausreichend erklären, so daß ein weiterer wichtiger Effekt in der Transkriptionsregulation gesucht wurde. Die Ähnlichkeit des Phänotyps bei XP mit dem einer fehlgesteuerten Überexpression des Transkriptionsfaktors c-Myc (Abschnitt 1.2.5.) in der Haut transgener Mäuse, veranlasste die Forscher die Regulation des Myc-Gens zu studieren. Ein wichtiges *cis*-Element auf diesem Gen, mit FUSE („*far upstream element*“) bezeichnet, wird durch das FUSE-Bindungsprotein (FBP) erkannt, welches direkt die Untereinheiten p62, XPD und XPB von TFIIH kontaktieren kann, und die 3'-5'-Helikaseaktivität von XPB *in vitro* stimuliert, was mit einem positiven Effekt auf die Initiation und frühe Elongationsphase einhergeht. Der Gegenspieler von FBP, der FBP-interagierende Repressor FIR, bindet einerseits an die DNA-Bindungsdomäne von FBP, andererseits blockiert er die aktivierte Transkription auf der Stufe der frühen Elongation („*promoter escape*“) durch einen negativen Effekt auf die XPB-Helikaseaktivität. Interessanterweise sind in XP-Zellen durch die Mutationen in XPB und XPD beide Regulationswege lahmgelegt, was eine spezifische Deregulation des Myc-Gens zur Folge hat. Die XP-Mutationen scheinen dabei keinen generellen Effekt auf die Transkription zu haben.

Da Myc zu den Mastergenen gehört, welche die Expression vieler anderer Gene steuern (Schuhmacher *et al.*, 2001), hat dies enorme Konsequenzen auf das Transkriptom einer Zelle. Es ist bekannt, daß eine Überexpression von Myc sowohl die Zellproliferation als auch die Apoptose verstärkt, und das Myc/Mad/Max-Regulationsnetzwerk über den Eintritt einer Zelle aus G<sub>0</sub> in den Zellzyklus entscheidet (Hölzel *et al.*, 2001). Deswegen leiden *myc*<sup>-/-</sup>-Mäuse an Hypoplasia, da bei der Entwicklung zum adulten Tier weniger Zellen gebildet werden, was zudem, im Vergleich zum Wildtyp, kleinere Mäuse zur Folge hat (Trumpp *et al.*, 2001). Man geht nun davon aus, daß die Deregulation von Myc die Zellen in einen Zustand bringt, bei dem sie für den Reparaturdefekt in TFIIH sensitiver werden, so daß XP-Patienten eine tausendfach höhere Wahrscheinlichkeit haben, ein Krebsleiden zu bekommen.

## 1.3. Mediatoren

### 1.3.1. Der Mediator der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*: ein Multiproteinkomplex

Die Entdeckung des Hefe-Mediators (auch Srb/Mediator genannt) ist den Labors von R.D. Kornberg (Stanford) und R.A. Young (MIT) zu verdanken (Übersichtsartikel: (Myers und Kornberg, 2000). Wie schon in Abschn. 1.2.7. kurz angesprochen, führte die Suche nach Aktivitäten, welche die Regulation eines gereinigten *in-vitro*-Transkriptionssystems durch Aktivatoren wiederherstellen können, zur Identifizierung des Mediators (Flanagan *et al.*, 1991) und schließlich zu seiner Reinigung bis zur Homogenität (Kim *et al.*, 1994). Im gleichen Zeitraum ergab die Analyse von extragenischen Suppressoren für Mutationen in der CTD der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II, die in einer verkürzten CTD mit einem kältesensitiven Phänotyp resultieren, daß vier dominante Srb („*suppressor of RNA polymerase subunit B*“)-Suppressoren, Srb2, Srb4, Srb5 und Srb6, sowie ein rezessiver Suppressor (Srb7) zusammen in einem großen Proteinkomplex vorliegen, der die CTD bindet. Vier weitere rezessive Suppressoren, Srb8, Srb9, Srb10 und Srb11 wurden in einem großen Komplex assoziiert mit RNA-Polymerase II und einigen GTFs (TFIIB, TFIIF, TFIIH) identifiziert, der RNA-Polymerase II-*Holoenzym* (Übersichtsartikel: Myer und Young, 1998) genannt wurde, da er in einem *in-vitro*-System, sowohl die basale als auch die Aktivator-abhängige Transkription in Anwesenheit von TBP und TFIIE vermitteln konnte.

In der Literatur wurden in der Folge weitere Holoenzympräparationen beschrieben, die sich in ihrer Zusammensetzung hinsichtlich des Vorkommens an einzelnen generellen Transkriptionsfaktoren unterscheiden. Außerdem enthalten manche Holoenzymreinigungen weitere Transkriptionscofaktoren, wie z.B. den Chromatinremodellierungskomplex *Swi/Snf* (siehe Abschn. 1.4.4.). Bei der Inkubation von RNA-Polymerase II-Holoenzym mit einem gegen die CTD gerichteten monoklonalen Antikörper, läßt sich das Holoenzym in RNA-Polymerase II, gebundene GTFs und den Mediator dissoziieren, welcher in einem hochgereinigten Hefe-Transkriptionssystem hinreichend für die Vermittlung der aktivierten Transkription ist. Bemerkenswerterweise zeigte der Mediator neben einer fünfzigfachen Stimulation der aktivierten Transkription stets auch eine Verstärkung der basalen Transkription um den Faktor zehn. Zudem stimuliert der Cofaktorkomplex die Phosphorylierung der CTD durch TFIIH *in vitro* in einer dramatischen Art und Weise. Allerdings konnte bisher keine eindeutige Korrelation dieser Aktivität mit der Rolle des Mediators als Cofaktor für die RNA-Polymerase II in einem gereinigten *in-vitro*-Transkriptionssystem bewiesen werden. Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, daß ein echtes Verständnis über die molekularen Mechanismen der Mediatorfunktion und die biochemischen Signalwege, welche diesen Komplex steuern, nahezu komplett unbekannt sind. Studien von temperatursensitiven Hefemutanten in *Srb4* und *Srb6* ergaben, daß diese Proteine *in vivo* global für die RNA-Polymerase II-Transkription gebraucht werden. Eine genomweite Expressionsanalyse ergab zudem, daß bis auf die beiden Gene *CUP1* und *SSA1* (Lee und Lis, 1998) die Transkription aller Klasse II-Hefegene *Srb4*-abhängig ist (Holstege *et al.*, 1998), während eine Mutation in *Med6* nur etwa 10% aller Hefegene betrifft. Aber selbst *CUP1* und *SSA1* sind mediatorabhängige Gene, da ihre Expression durch eine Mutation im Mediatorprotein *Rgr1* unterbunden werden kann (Lee *et al.*, 1999a). Diese Ergebnisse decken sich auch mit *in-vitro*-Studien, die belegen, daß die Proteine *Srb2* und *Srb5*, welche direkt mit *Srb4* im Komplex assoziiert sind (siehe Abb. 7), sowohl für die Stabilität des Mediators als auch für die Ausbildung eines stabilen PICs in Kernextrakten essentiell sind. Artifizielle Testsysteme bei denen man einzelne Komponenten des Mediators mittels einer Fusion mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne an Reportergene rekrutiert hat, welche Gal4-Bindungsstellen enthalten, kamen zu dem Schluß, daß einige dieser Fusionen (*Srb7*, *Gal11*, *Nut2* und *Med6*) die Aktivatorwirkung in einem *SRB4*ts Hintergrund ersetzen können, andere (*Srb5* und *Srb6*) aber nicht. Dies spricht zum einen für einen modularen Aufbau des Mediators (siehe Abb. 7) zum anderen aber auch für eine Multifunktionalität des Komplexes. Kürzlich wurde aufgrund von *in-vitro*-Daten das Modell vorgeschlagen, daß Mediator nach dem Verlassen des Promotors durch RNA-Polymerase II an diesem zusammen mit TFIID, TFIIE und TFIIH gebunden bleibt und so ein Gerüst für eine rasche Reinitiation des gleichen Gens sorgt (Yudkovsky *et al.*, 2000).

Eine elegante Quantifizierung der GTF-, RNA-Polymerase II und Mediatormoleküle in Hefe, die folgende Werte ergab (Tab. 4), zeigt, daß Mediator und TFIIH die limitierenden Faktoren in einer Hefezelle sind (Borggreffe *et al.*, 2001) und deshalb sehr wahrscheinlich selbst einer strikten Regulation unterworfen sind.

Transkriptionsfaktor	Quantifizierte Untereinheit	Kopien pro Zelle
RNA-Polymerase II	Rpb3 (hRpb3)	30 000
TFIIF	Tfg2 (Rap30)	24 000
TFIIE	Tfa2 (TFIIE $\beta$ )	24 000
TFIIB	Sua7	20 000
TFIID	TBP	20 000
Mediator	Med8, Rgr1, Med7	6 000
TFIIH	Tfb3 (Mat1), Ssl2 (XPB), Tfb4 (p34), Ccl1 (Cyclin H)	6 000

**Tab. 4:** Quantifizierung von Transkriptionsfaktoren in *S. cerevisiae* (modifiziert nach Borggreffe, T. *et al.*, 2001). Durch eine Insertion von TAP-tag-Sequenzen in 3'-Position zu den endogenen Cistrons im korrekten Leseraster ermöglicht eine genaue und vergleichende Bestimmung der Anzahl der Moleküle relativ zu einem externen Standard. Bemerkenswert ist, daß die Kopien an Mediator- und TFIIH-Untereinheiten in etwa zu der Anzahl der vorhergesagten Hefegene (ca. 6000) korrespondieren.

Diese Daten werfen natürlich die Frage nach der Existenz eines Holoenzym *in vivo* auf, ein Problemkreis der immer noch kontrovers diskutiert wird und in direktem Zusammenhang mit dem modularen Aufbau des Mediators steht, der sowohl durch genetische Interaktionen als auch aufgrund zahlreicher biochemischer Daten in drei Subkomplexe eingeteilt wird. Diese sind der Srb4-Subkomplex, der Rgr1-Subkomplex und der Srb8-11-Subkomplex, wobei der Rgr1-Subkomplex selbst in das Gal11-Modul und das Med9/10-Modul weiter unterteilt werden kann (Abb. 7). Der Einsatz von Elektronenmikroskopie kombiniert mit einer 3D-Bildrekonstruktion erlaubte dank der vorhandenen biochemischen Befunde die Lokalisation des Srb4-Subkomplexes am sogenannten „Kopf“ und die des Gal11-Moduls am „Schwanz“ des Mediators, während sich der restliche Rgr1-Subkomplex zusammen mit dem Srb8-11-Subkomplex für den zentralen mittleren Bereich („Mitte“) der Elektronendichte verantwortlich zeigt (Asturias *et al.*, 1999; Dotson *et al.*, 2000). Darauf soll nun nachfolgend näher eingegangen werden.

#### • Der Srb8-11-Subkomplex

In der RNA-Polymerase II freien hochgereinigten Mediatorpräparation aus dem Kornberg-Labor fehlt dieser Subkomplex. Zudem treten die Polypeptide in Holoenzymfraktionen (genauso wie die Polymerase selbst) substöchiometrisch auf, was auf eine reversible Interaktion des Srb8-11-Subkomplexes mit dem Rest des Mediators hinweist. Darüber hinaus bestimmt im übrigen der physiologische Zustand der Hefezellen das Vorhandensein von

Srb8-11 im Mediator. Während exponentiell wachsende, in glucosereichem Medium gezogene Hefekulturen große Mengen (überwiegend nicht an Mediator gebundenes) Srb10 aufweisen, wird dieses Protein nach dem Eintreten in die stationäre Phase („*diauxic shift*“) komplett aus den Hefezellen eliminiert. Überdies sinkt die Anzahl an Srb11-Molekülen drastisch beim Beginn der Meiose bzw. nach Hitzeschock. Die Heterogenität in den Mediatorpräparationen läßt sich somit teilweise auf unterschiedliches Ausgangsmaterial zurückführen. Nebenbei bemerkt stammen sämtliche Mediatorreinigungen aus dem Labor von R.A. Young aus Logphase-Hefekulturen, das Kornberg-Labor hingegen verwendete Hefen aus der stationären Phase (R.A. Young, persönliche Mitteilung). Genetische Daten weisen daraufhin, daß der Subkomplex überwiegend repressorisch wirkt, insbesondere die Transkription der Gene für den Galactosestoffwechsels wird bei Anwesenheit hoher Glucosemengen durch Srb8-11 inhibiert. Die Entdeckung, daß Srb10(Ssn8) und Srb11(Ssn3) ein Kinase-Cyclin-Paar bilden, welches die CTD der großen Untereinheit von RNA-Polymerase II (hauptsächlich an Ser2) phosphorylieren kann, bevor ein stabiler PIC gebildet wird, was nachfolgend die Initiation hemmt (Hengartner *et al.*, 1998), mag eine molekulare Erklärung für die Funktion des Srb8-11-Subkomplexes sein. Überdies hängt die Corepressorfunktion von Ssn6-Tup1 (Abschn. 1.2.6.) teilweise von den Komponenten des Srb8-11-Subkomplexes ab.

• Der Srb4-Subkomplex:

Unterzieht man Mediator•RNA-Polymerase II-Komplexe, die über einen anti-Rgr1-Antikörper an einer Säule immobilisiert sind, einer Prozedur, bei der ansteigende Mengen des Denaturierungsmittels Harnstoff verwendet werden, so ergibt sich folgendes Bild. Bei einer Konzentration von 1 M Harnstoff wird die Bindung der RNA-Polymerase II an Mediator unterbunden. 2 M Harnstoff dissoziieren den Srb4-Subkomplex, bestehend aus Srb4, Med6, Rox3, Med11, Srb6, Srb2, Srb5 und Med 8, wobei dieser Subkomplex in der Anwesenheit des Detergens und bei Zugabe von Hochsalz noch von einem anti-Med6-Antikörper präzipitiert werden kann, was für eine äußerst stabile Interaktion der Proteine spricht.

Ein in SF9-Zellen (durch Expression der Komponenten) rekonstituierter Srb4-Subkomplex bindet die CTD und verstärkt die basale (und damit auch die aktivierte) Transkription in einem Hefe *in-vitro*-System (Kang *et al.*, 2001). Neben seiner essentiellen Rolle für die basale Transkription bindet Srb4 direkt an den Aktivator Gal4 (Koh *et al.*, 1998), wobei zahlreiche genetische Daten zeigen, daß diese Interaktion nicht ausreichend für die Gal4-Funktion ist. Med6 wird nur für etwa 10% aller Hefegene „gebraucht“ (Holstege *et al.*, 1998), ist aber für die Ablesung induzierbarer Gene essentiell (Lee *et al.*, 1997).

Interessant ist die Tatsache, daß Med8 die UAS des *SUC2*-Gens (Invertase) und die DRS des *HXX2*-Gens (Hexokinase 2) über eine „HNF-3/*forkhead*“-DNA-Bindungsdomäne erkennt (Chaves *et al.*, 1999; Zilahi *et al.*, 2000), was auf eine potentielle DNA-Bindung des Srb4-Subkomplexes hinweist.

---

- Der Rgr1-Subkomplex:

In Anwesenheit von 2 M Harnstoff bleiben die Proteine Med10/Nut2, Srb7, Med7, Med1, Med4, Med9/Cse2, Rgr1, Sin4, Med2, Med3 und Gal11 stabil in einem Subkomplex assoziiert. Erst eine Erhöhung der Harnstoffkonzentration auf 3 M führt zum Auseinanderbrechen des Komplexes. Rgr1 ist ein essentielles Hefeprotein, das *in vivo* sowohl positive als auch negative Funktion auf die Transkription haben kann. Allerdings ist nur der N-Terminus des Proteins für die Bäckerhefe essentiell, der C-Terminus kann indessen deletiert werden, was mit einem Verlust des *Gal11-Moduls* (Sin4, Med2, Med3/Hrs1/Pgd1, Gal11) einhergeht. Die Existenz eines *Med9/10-Moduls* (Med9/Cse2, Med4, Med1, Med7, Srb7, Med10/Nut2) wurde postuliert, da sich die einzelnen Komponenten, nach Infektion von SF9-Zellen mit den jeweiligen Baculoviren, als stabiler Komplex aus Insektenzellen isolieren lassen.

Das Med9/10-Modul kann (auch ohne Rgr1) mit dem Srb4-Subkomplex interagieren (vgl. Abb. 7; Doppelpfeil zwischen Med8 und Med7) und bindet an die CTD. Außerdem dockt der Srb8-11-Subkomplex über das Med9/10-Modul an den Mediator an. Die drastische Stimulation der Cdk7-Cyclin H-Aktivität wird vom Rgr1-Subkomplex vermittelt, allerdings ist nicht bekannt, welche Untereinheiten in den Prozess der Steuerung der CTD-Phosphorylierung via CAK involviert sind. Es wird aber spekuliert, daß das Med9/10-Modul diese Funktion ausübt, da ein Fehlen von Rgr1 bzw. dem Gal11-Modul die Aktivität nicht beeinträchtigt, was übrigens eine interessante Hypothese ist, da man sich gleichfalls eine Regulation der Kinaseaktivität von Srb10/Srb11 durch das Med9/10-Modul vorstellen kann (Kang *et al.*, 2001). Demgegenüber stehen Resultate einer anderen Studie, die eine Interaktion von Gal11 mit TFIIE als essentiell für die CTD-Phosphorylierung via TFIIH beschreiben (Sakurai und Fukasawa, 1998). Das Protein Med9/Cse2 besitzt ein bZIP-Motiv (Abschn. 1.2.5.), so daß auch das Med9/10-Modul möglicherweise DNA-bindend ist.

Auch für das Gal11-Modul wurde eine transiente Wechselwirkung mit der CTD vorgeschlagen (Li *et al.*, 1995), die eigentliche Rolle dieses Moduls ist aber Interaktionsoberflächen zur Verfügung zu stellen, die eine Rekrutierung des Mediators an den Promotor durch Aktivatoren erlauben. Zum Beispiel binden sowohl Gal4p als auch Gcn4p an Med3/Hrs1/Pgd1. Allerdings ist für einen Verlust der Gcn4p-Aktivierung nicht nur ein Fehlen von Med3 sondern auch eine Deletion von Sin4 erforderlich. Neben der Bindung von Gal4p an Med3 und der niedrig-affinen Wechselwirkung von Gal4p mit Srb4 ( $K_D$  im millimolaren Bereich), konnte kürzlich auch noch eine hoch-affine Bindung an Gal11 ( $K_D \approx 10^{-7}$  M) mit einer Stöchiometrie von 1:1 gezeigt werden. Da der Gal4-Aktivator als Dimer an seine DNA-Zielsequenz bindet, ist es ein attraktives Modell, daß Aktivatoren gleichzeitig mehrere Mediatoruntereinheiten kontaktieren, was zu Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich führt (Jeong *et al.*, 2001).

Ein ähnliches Bild ergibt sich für den Aktivator VP16, der neben Med6 im Srb4-Subkomplex, ein intaktes Gal11-Modul für seine Funktion benötigt, da die Deletion von Med2 und Med3 die Transaktivierung um einen Faktor 30 reduziert (Myers *et al.*, 1999). Über eine Interaktion von VP16 mit Gal11 in einem artifiziellen *in-vitro*-Bindungstest wurde ebenfalls berichtet (Lee *et al.*, 1999b).

Das Gal11-Modul vermittelt jedoch nicht nur den Eingang positiver sondern auch den negativer Signale in den Mediator Komplex. Der Corepressor Ssn6-Tup1 (Abschn. 1.2.6.) bindet unter anderem Med3 (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2000), aber auch Srb7 (Gromoller und Lehming, 2000a). Ferner konnte eine direkte Interaktion von Tup1 mit Srb10 gezeigt werden (Zaman *et al.*, 2001).

Genetische Interaktionen mit Komponenten der Cofaktoren Swi/Snf und dem Histonacetyltransferasekomplex SAGA weisen auf eine Rolle des Gal11-Moduls in der Kommunikation mit anderen coregulatorischen Proteinkomplexen hin (Roberts und Winston, 1997). Modelle nach denen Sin4 ein Teil von SAGA ist (Yu *et al.*, 2000), bzw. daß die Zusammensetzung des Gal11-Moduls insgesamt dynamischer Natur und nicht statisch ist, werden inzwischen ebenfalls diskutiert (Nishizawa, 2001). Eine proteomweite Interaktionsstudie in Hefe hat kürzlich demonstriert, daß Gcn5 und Ada2, beides Bestandteile von SAGA, mit Mediatoruntereinheiten komplexiert sein können (Gavin *et al.*, 2002).

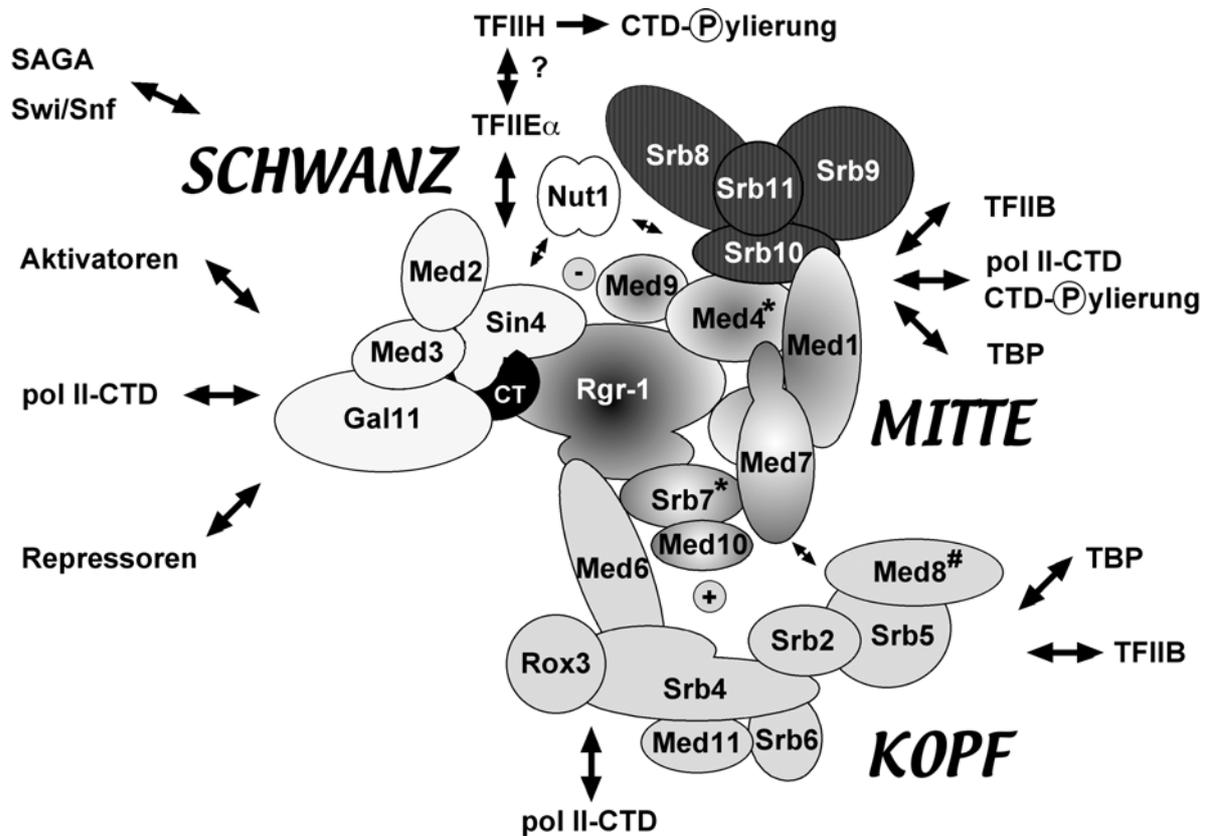
Zusammenfassend kann man den Rgr1-Subkomplex folgendermaßen charakterisieren und folgende Funktionsweise postulieren. Positive und negative Signale, wie auch die Kommunikation mit anderen regulatorischen Komplexen werden im Gal11-Modul registriert, sowie vermittelt. Die Transformation des Signaleingangs findet dann im Med9/10-Modul statt. Während Med9 und Med4 negative Eingangssignale in negative Ausgangssignale integrieren (Han *et al.*, 2001), indem sie z.B. die Funktion von Srb10/Srb11 modulieren, werden positive Eingangssignale von Srb7 und Med10 in positive Ausgangssignale integriert, möglicherweise durch eine Steuerung der Funktion des Srb4-Subkomplexes. Dafür spricht, daß Med10-Mutanten nicht die Bindung des Mediators an VP16 und seine Rekrutierung an den Promotor verhindern, aber die Wirkung von VP16 als Transaktivator merklich schwächen (Han *et al.*, 1999). Temperatursensitive Mutanten in Srb7, welche die Expression von ca. 30% aller Hefegene beeinträchtigen – die meisten davon anschaltbar und nicht konstitutiv aktiv – favorisieren ebenso dieses Modell (Gromoller und Lehming, 2000b). Genetische Interaktionen von Med9 mit Histondeacetylasen wie Rpd3 sind ein weiterer Hinweis darauf, daß dieser Teil des Moduls hauptsächlich negative Signale integriert.

- Nut1:

Standardmediatorpräparationen enthalten stets Nut1. Allerdings ist die genaue Lokalisation des Proteins im Komplex noch nicht klar. Eine Interaktion mit Komponenten des Rgr1- und Srb8-11-Subkomplexes läßt sich allerdings aus dem bekannten Hefe-*Interaktom* ableiten, weil ein mit einem C-terminalen TAP-tag versehenes Srb10-Protein die MediatorKomponenten Nut1, Sin4 und Srb8 copräzipitiert (Gavin *et al.*, 2002). Untersuchungen im Kornberg-Labor haben ergeben, daß Nut1 Acetyltransferaseaktivität besitzt, und präferentiell Histon H3, in geringerem Maße auch Histon H4 in Nukleosomen acetyliert (Lorch *et al.*, 2000).

- Das Holoenzymproblem

Neben den multiplen Interaktionen von Mediator mit der CTD müssen auch Kontaktpunkte der beiden Faktoren außerhalb der CTD der RNA-Polymerase II existieren, da eine CTD-Deletionsmutante des Enzyms immer noch mit Mediator interagieren kann. Da allerdings nur etwa 2% der Gesamtpolymerase einer Zelle im Komplex mit Mediator vorliegen, und der Anteil an GTFs in diesen sogenannten Holoenzympräparationen substöchiometrisch ist, stellt sich natürlich die Frage nach der Relevanz des Holoenzymmodells, das besagt, daß die PIC-Bildung nicht durch sukzessive Bindung der einzelnen GTFs erfolgt, sondern nach Bindung von TFIID•TFIIA an die TATA-Box, Mediator•RNA-Polymerase II zusammen mit den restlichen GTFs in einem Schritt an den Promotor rekrutiert wird. Eine Antwort auf diese Frage lieferten kürzlich zwei Untersuchungen, die das Zellzyklus-regulierte HO-Gen als Studienobjekt für „*chromatin immunprecipitation (ChIP) assays*“ (Orlando, 2000) benutzten. Beide Analysen kamen zu dem Ergebnis, daß *in vivo* Mediator stets vor dem Andocken der RNA-Polymerase II am Promotor gebunden ist, und sprechen daher gegen ein Holoenzymmodell (Bhoite *et al.*, 2001; Cosma *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001b). Eine abschließende Klärung ist aber wohl erst nach dem Studium einer großen Zahl weiterer Gene möglich. Eine aktuelle biochemische Studie, die auf der Isolierung von MediatorKomplexen mittels Immunaffinitätschromatographie - bei physiologischen Puffer- und Ionenstärkebedingungen - gekoppelt mit einer Analyse der Komplexe durch Gelfiltration basiert, kommt zu dem Schluß, daß Hefezellen zwei Mediatorformen enthalten, und zwar einen 1.5-2.0 MDa großen Komplex, der aus dem Srb4-, dem Rgr1- und dem Srb8-11-Subkomplex (inklusive Nut1) besteht, und substöchiometrisch RNA-Polymerase II enthält, und einen sogenannten „core“-Komplex (Med-c) bestehend aus dem Srb4-Subkomplex und dem Med9/10-Modul (ohne Rgr1) mit einem Molekulargewicht von ca. 0.5 MDa (Liu *et al.*, 2001d). Auch diese Ergebnisse sprechen gegen die generelle Funktion eines Holoenzym in der Genregulation, lassen diesen Mechanismus aber für die Transkription mancher Gene noch zu.



**Abb. 7:** Der Mediator aus *Saccharomyces cerevisiae*. Der Multiproteinkomplex kann formal in ein *Kopf*-Teil (Srb4-Subkomplex: Med6, Rox3, Srb4, Med11, Srb6, Srb2, Srb5, Med8), ein *Mittel*-Teil (Rgr1 und Med9/10-Submodul: Med10, Srb7, Med7, Med1, Med4, Med9), an welches optional der Srb8-11-Subkomplex (Srb8, Srb9, Srb10, Srb11) assoziiert ist (siehe Text), und ein *Schwanz*-Teil (Gal11-Modul: Sin4, Med2, Med3, Gal11) untergliedert werden. Biochemisch lässt sich Mediator in drei Subkomplexe trennen: Srb4-Subkomplex, Srb8-11-Subkomplex und Rgr1-Subkomplex (Gal11-Modul, Rgr1, Med9/10-Modul), wobei das Gal11-Modul über den C-Terminus (CT, in Schwarz hervorgehoben) von Rgr1 an den Komplex bindet. Für den Srb4-Subkomplex, das Med9/10-Modul und das Gal11-Modul konnte eine Interaktion ( $\leftrightarrow$ ) mit der CTD der größten Untereinheit von RNA-Polymerase II (pol II-CTD) gezeigt werden. Interaktionen ( $\leftrightarrow$ ) des Srb4-Subkomplexes mit TFIIB und TBP bzw. des Rgr1-Subkomplexes mit TFIIB, TBP und TFIIE sind dargestellt. Regulatorische Signale (Aktivatoren, Repressoren) werden hauptsächlich im Gal11-Modul registriert. Negative Signale (-) werden im Bereich von Med9 und Med4, positive Signale (+) hingegen im Bereich von Srb7 und Med10 integriert. Alle gezeigten Wechselwirkungen zwischen den jeweiligen Mediatoruntereinheiten sind experimentell bestätigt. Hefe-2Hybrid-Daten (\*) argumentieren überdies für eine Interaktion von Srb7 und Med4, die nicht explizit gezeigt ist (Uetz *et al.*, 2000). Der Srb4-Subkomplex kann nicht nur über Med6 sondern auch über Med8 an den Rgr1-Subkomplex binden (#). Nut1 bindet an den Rgr1- und den Srb8-11-Subkomplex, die genauen Interaktionspartner sind aber nicht bekannt. Genetische Interaktionen des Mediators mit weiteren Cofaktoren (SAGA, Swi/Snf) betreffen Komponenten des Gal11-Moduls (siehe Text).

---

- Der PAF-Komplex

Immobilisiert man RNA-Polymerase II mittels eines anti-CTD-Antikörpers an Protein A Sepharose und inkubiert diese Affinitätsäule mit Hefekernextrakten, so läßt sich ein Komplex isolieren, der neben den Proteinen Hpr1, Ccr4, Paf1 und Cdc73, bemerkenswerterweise auch Gal11 enthält (Shi *et al.*, 1997). Genetische Interaktionsdaten sprechen für eine Rolle von PAF im Proteinkinase C-Signalweg (Chang *et al.*, 1999). Es wurde daher die Existenz eines alternativen Holoenzym postuliert, welches unter bestimmten Bedingungen für die Transkription eines kleinen Teils des Hefegenoms benötigt werden könnte (Chang und Jaehning, 1997; Mueller und Jaehning, 2002).

Eine tabellarische Zusammenfassung des in diesem Abschnitt Gesagten findet sich im Anhang (Abschn. 8.2.).

### 1.3.2. Mediator Komplexe in Metazoen

Nach der Entdeckung der Mediatoraktivität in *S. cerevisiae* im Jahr 1994 (Kim *et al.*, 1994) dauerte es erstaunlicherweise fast vier Jahre, bis die Existenz eines orthologen Cofaktorkomplexes in murinen bzw. humanen Tumorzelllinien demonstriert werden konnte (Jiang *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998). Dies lag wohl zum einen daran, daß die meisten Polypeptide des Hefe-Mediators in ihrer Primärsequenz schlecht oder gar nicht evolutionär konserviert sind, zum anderen waren die Genome von Metazoen (*Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* und *Fugu rubripes*) bzw. das Humangenom erst Ende der neunziger Jahre teilweise oder komplett sequenziert, was die Identifizierung orthologer Proteine mittels Homologiesuche erheblich erschwert hat. Heute weiß man, aufgrund der Arbeiten im Labor von Dr. R.G. Roeder (Rockefeller University) und der hier vorliegenden Arbeit, daß die USA-Fraktion (Abschn. 1.2.7.), welche etwa im gleichen Zeitraum wie der Mediator der Bäckerhefe beschrieben wurde, einen großen Anteil der humanen Mediatoraktivitäten beherbergt. Hinzu kommt noch, daß in den frühen Neunzigern zwar TFIID in Metazoen charakterisiert und (in Verbindung mit den TAF<sub>II</sub>s) als universeller Coaktivator gehandelt wurde, die Hefeforscher aber glaubten, daß die RNA-Polymerase II-Transkription nur mit TBP, GTFs und Mediator stattfindet, da Hefe-TFIID zu diesem Zeitpunkt nicht „existierte“. In der Tat gelang erst 2000 die komplette Reinigung von TFIID aus der Bäckerhefe (Sanders und Weil, 2000). Dies führte dann vielleicht zu dem voreiligen Schluß, daß die Transkription in *S. cerevisiae* zum Teil anders reguliert sei, als in Metazoen. Heute, im Zeitalter der Genomforschung, wird es allerdings immer klarer, daß grundlegende Stoffwechselmechanismen von der Hefe bis zum Menschen konserviert sind.

### 1.3.2.1. Mediatorkomplexe in Säugern

Erste Hinweise auf ein „Holoenzym“ in *Mammalia* brachten Arbeiten in den Labors von R.A. Young und D. Reinberg (Piscataway, NJ). Die Identifizierung eines humanen Orthologen von Srb7 über Homologiesuchprogramme ermöglichte die Isolierung eines groben Komplexes über Immunfällung, der RNA-Polymerase II und GTFs beinhaltete (Chao *et al.*, 1996), sowie den Nachweis, daß in Kernextrakten von Tumorzelllinien ein Teil der RNA-Polymerase II in einem Aggregat von 60S mit humanem Srb7 (hSrb7), hSrb10/Cdk8, hSrb11/Cyclin C, GTFs und DNA-Reparaturproteinen cosedimentierte bzw. auf einer Gelfiltrationssäule coeluierte (Maldonado *et al.*, 1996). Im gleichen Jahr konnte ein grober Komplex beschrieben werden, der über die Bindung an die Aktivierungsdomänen von VP16 und E1A13S isoliert wurde, und CTD-Kinaseaktivität aufwies. Die Autoren konnten hSrb7, Cdk8 und Cyclin C als Bestandteile verifizieren (Gold *et al.*, 1996). Im Jahr 1997 folgte dann die Entdeckung eines humanen Med6-Orthologen (Lee *et al.*, 1997) und der Nachweis, daß  $\alpha$ -RAP74 (TFIIF)-Antikörper TFIIE, TFIIH, RNA-Polymerase II und hSrb7 bzw. hSrb10/Cdk8 coimmunpräzipitieren (Cho *et al.*, 1997). Nachdem 1998 zwei weitere humane Orthologe – hMed10 (Gustafsson *et al.*, 1998) und hMed7 (Myers *et al.*, 1998) – identifiziert wurden, gelang auch die erste Reinigung eines humanen Mediatorkomplexes mit Hilfe einer Kombination von klassischer Säulenchromatographie und Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung eines  $\alpha$ -hMed6-Antikörpers (Sun *et al.*, 1998). Dieser Faktor wurde *NAT* („*negative regulator of activated transcription*“) genannt, und man kann es schon fast als Ironie der Geschichte bezeichnen, daß der erste humane Mediatorkomplex in einem funktionalen *in-vitro*-Transkriptionssystem, bestehend aus Gal4-VP16, PC4 und den GTFs, als Corepressor spezifisch für die aktivierte Transkription beschrieben wurde. Im gleichen Jahr konnte auch ein Maus-Mediator gereinigt werden, der allerdings keine Funktion in einem gereinigten Transkriptionssystem zeigte, aber die Phosphorylierung der CTD von RNA-Polymerase II durch TFIIH stimulierte (Jiang *et al.*, 1998).

Ein komplett anderer Ansatz, und zwar die Suche nach Coaktivatoren, die Liganden-abhängig an die AF2 (Abschn. 1.2.5.1.) des Thyroidhormonrezeptors bzw. des Vitamin D-Rezeptors binden, führte zur Identifizierung der *TRAPs* („*thyroid hormone receptor associated proteins*“) bzw. *DRIPs* („*vitamin D receptor interacting proteins*“), wobei anfangs die Verwandtschaft dieser Coaktivatoren mit dem Hefe-Mediator nicht erkannt wurde (Fondell *et al.*, 1996; Rachez *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 1998). Erst die Klonierung einer Reihe von cDNAs dieser Multiproteinkomplexe zeigte dann die Homologie zu Mediator auf (Ito *et al.*, 1999; Rachez *et al.*, 1999).

Darüber hinaus ergab die Reinigung und Charakterisierung eines Cdk8-assoziierten Proteinkomplexes aus einer transgenen HeLa-Zelllinie, die stabil Flag-Cdk8 exprimiert, daß dieser Komplex, mit *SMCC* („*Srb/Mediator containing complex*“) bezeichnet (Gu *et al.*, 1999), identisch zu TRAP ist. Während DRIP nur in Verbindung mit Reportergenen, welche in Chromatin verpackt sind, in einem *in-vitro*-Transkriptionssystem als Coaktivator fungiert, funktioniert TRAP/SMCC, abhängig von den experimentellen Bedingungen sowohl als positiver als auch als negativer Cofaktor (vergleichbar zu NAT) in einem gereinigten *in-vitro*-System, allerdings mit Chromatin-freien Reportern.

Der erste humane Mediator Komplex mit einer eindeutig positiven Wirkung wurde indes im Labor von Dr. R. Tjian (Berkeley) dargestellt (Ryu *et al.*, 1999). Seine Reinigung erfolgte aufgrund seiner Eigenschaft die Aktivatorfunktion von Sp1 in einem gereinigten *in-vitro*-Transkriptionssystem zu vermitteln, weswegen der Komplex *CRSP* („*cofactor required for Sp1*“) genannt wurde. Die Reinigungsstrategie (Ryu und Tjian, 1999) folgte im Prinzip dem USA-Protokoll und einem alternativen PC2-Reinigungsschema (Halle *et al.*, 1995). Obwohl die Charakterisierung der einzelnen Untereinheiten der oben aufgeführten Cofaktoren zu diesem Zeitpunkt (und auch heute) noch nicht abgeschlossen war (und ist), unterschied sich CRSP dadurch, daß ihm die Bestandteile des Hefe-Srb8-11-Subkomplexes zu fehlen schienen.

Noch im selben Jahr erschienen zwei weitere Publikationen, die über humane Mediator Komplexe berichteten. *ARC* („*activator required cofactor*“) erwies sich einerseits in seiner Zusammensetzung als auch in seiner *in-vitro*-Funktion als nahezu identisch zu DRIP, und wurde über Affinitätschromatographie an den immobilisierten Aktivierungsdomänen von SREBP („*sterol receptor enhancer binding protein*“) bzw. VP16 gereinigt (Näär *et al.*, 1998; Näär *et al.*, 1999). Dem Labor von A. Berk (UCLA) gelang die Identifizierung von Hefeorthologen in einem Proteinkomplex, der mit der Aktivierungsdomäne von E1A13S interagiert, eine unklare *in-vitro*-Funktion aufwies, und den Namen hSrb/Mediator bekam (Boyer *et al.*, 1999).

In Anbetracht der vielen unterschiedlichen Komplexe, die mit Hilfe verschiedenster Reinigungsmethoden dargestellt wurden, war es nicht klar, ob nun viele verschiedene oder nur ein Mediator Komplex in Säugern existiert. Die beschriebenen Cofaktoren hatten zwar viele Untereinheiten gemein, zeigten aber trotzdem zum Teil deutliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung (Übersichtsartikel: Hampsey und Reinberg, 1999; Lemon und Tjian, 2000; Malik und Roeder, 2000; Näär *et al.*, 2001; Rachez und Freedman, 2001). Eine Übersicht der humanen Mediator Komplexe bezüglich ihres Aufbaus findet sich in Tabelle 5. Aufgrund der Tatsache, daß identische Proteine verschiedene Namen besitzen, werde ich im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine für den Leser eindeutige und einheitliche Nomenklatur verwenden, die sich zum größten Teil danach richtet, in welchem Komplex diese Untereinheit mit Peptid- bzw. vollständiger cDNA-Sequenz zum ersten mal beschrieben wurde.

TRAP/ SMCC	DRIP	ARC	CRSP	NAT	muMED	Alternativer Name, bekannte Eigenschaften bzw. Funktion
<b>240</b>	250	250	—	N.E.	N.E.	
<b>230</b>	240	240	—	230	160a	OPA-repeats
<b>220</b>	205	200	200 <sup>+/-</sup>	N.E.	160b	bindet an AF2 von HR und p53
170	150	150	150	<b>hRgr1</b>	110	bindet AF1 von HR
150 $\alpha$	—	—	—	—	—	
150 $\beta$	<b>130</b>	130	130	140	N.E.	hSur2; bindet an E1A
N.E.	N.E.	<b>105</b>	N.E.	N.E.	N.E.	TIG-1; bindet an SREBP-1a
<b>100</b>	100	100	100 <sup>+/-</sup>	N.E.	N.E.	
(97)	(97)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	TAO-Ser/Thr-Kinase ?
					(96a)	Hefe-Bdf1-Homolog, Kinase?
<b>95</b>	92	—	—	N.E.	96b	
N.E.	N.E.	(92)	N.E.	N.E.	N.E.	
(93)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	
N.E.	N.E.	N.E.	(85 <sup>+/-</sup> )	N.E.	N.E.	
<b>80</b>	77	77	77	70	78	Bindet p53- und VP16-AD
78 ?	70	70	<b>70</b>	—	N.E.	N-Terminus homolog zu TFIIIS
56	56 <sup>+/-</sup>	56 <sup>+/-</sup>	—	<b>Cdk8</b>	—	Cyclin-abhängige Kinase
					(55)	
				(45)		
N.E.	N.E.	<b>42</b>	N.E.	N.E.	N.E.	
37	N.E.	N.E.	<b>34</b>	N.E.	N.E.	
<b>36/28</b>	36	36	N.E.	37	34/33	
34	34	34	33/hMed7	36	36	
33	33	33	—	<b>Cyclin C</b>	31	Cyclinpartner von Cdk8
32	33	33	—	<b>hMed6</b>	32	
N.E.	N.E.	<b>32</b>	N.E.	N.E.	N.E.	
				(30)		
					(28b)	
<b>hTRFP</b>	N.E.	N.E.	N.E.	23	28a	nicht im Hefe-Mediator
(24)				(22)		
(22)				(21)		
19	N.E.	+	+	<b>hSrb7</b>	21	„Knock-out“ in Mäusen letal
18/hSoh1	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	nicht im Hefe-Mediator
<b>hMed10</b>	N.E.	N.E.	N.E.	14	N.E.	
(12)						

**Tab. 5:** Mediator Komplexe aus Säugern. NAT („*negative factor for activated transcription*“), TRAP („*thyroid hormone receptor associated proteins*“), DRIP („*vitamin D receptor interacting proteins*“), SMCC („*Srb/Mediator containing complex*“), CRSP („*cofactor required for Sp1*“), ARC („*activator required cofactor*“), muMED (Muriner Mediator). Proteine sind entweder gemäß ihres apparenten Molekulargewichts, ihres vorher bekannten Namens bzw. als Orthologe der entsprechenden Hefe-eiweiße aufgeführt. Polypeptide in einer Tabellenzeile sind identisch. Der Name der fettgedruckten Untereinheiten wird im Text als Standardbezeichnung dieser Mediator-Komponente verwendet. Für Proteine in Klammern sind bisher keine Nukleotid- bzw. Peptidsequenzen veröffentlicht. N.E. (nicht evaluiert); — (nicht vorhanden); AF2 (Aktivierungsfunktion 2); HR (Hormonrezeptor); OPA-repeats (CAG-Trinukleotidwiederholungen in Proteinen, die in Zusammenhang mit der Ausbildung mentaler Retardation stehen); +/- (fakultative Untereinheit).

Die entsprechenden Namen sind in der Tabelle 5 fettgedruckt zu finden. Eine weitere Orientierungshilfe, welche die Homologiebeziehungen zum *S. cerevisiae* Mediator herausarbeitet, kann im Anhang (Abschn. 8.2.1.) gefunden werden.

### 1.3.2.2. Mediatorkomplexe der Taufliege und des Fadenwurms

Die Anzahl biochemisch arbeitender Forscher die *Drosophila melanogaster* bzw. *Caenorhabditis elegans* als Modellsystem benutzen ist eher begrenzt, so daß viele Studien zur Organisation von Mediator-ähnlichen Aktivitäten in diesen Organismen mit Hilfe molekulargenetischer Methoden durchgeführt wurden.

Im Fadenwurm (*C. elegans*) sind bis dato folgende Mediatororthologe entweder auf Proteinebene oder aufgrund von cDNA-Vorhersagen aus der Genomsequenz bekannt (siehe <http://bio.lundberg.gu.se/cgi-bin/medb/index.cgi>): CeMED6 (LET425), CeMED7, CeMED10, CeSRB7, SUR-2 (DRIP130-Ortholog), CeRGR1, CeMED4, CeMED8 (teilweise), CeSRB4 und SOP-3 (CeSRB8, TRAP230-Ortholog). Vorläufige Daten sprechen dafür, daß in Fadenwurmembryos zwei Mediatorkomplexe vorliegen, die beide mit RNA-Polymerase II interagieren, und sich durch Chromatographie an Heparinsepharose trennen lassen. Ein Komplex enthält CeMed7, CeMed10 und CeSrb7, der andere CeMed6. RNA-Interferenzexperimente (Fire *et al.*, 1998) mit RNA<sub>i</sub>, die gegen CeMed7, CeMed6 und CeMed10 gerichtet ist, beweisen eine essentielle Rolle der CeMed-Komplexe in der Embryonalentwicklung des Wurms, und zeigen, daß CeMed6, CeMed7 und CeMed10 (zum Teil ähnlich zu den Hefeorthologen) für die Expression induzierbarer Gene gebraucht werden (Kwon *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 1999).

Der entsprechende *Drosophila*-Mediator (dMed) ist biochemisch wesentlich besser definiert, und zeigt eine starke Verwandtschaft zu TRAP/SMCC. Eine Liste der Orthologen zu den entsprechenden Hefe- bzw. Säugerproteinen befindet sich im Anhang (Abschn. 8.2.2.).

Die Reinigung aus Embryoextrakten erfolgte durch mehrere klassische Chromatographiestritte gefolgt von einer abschließenden Immunpräzipitation mit einem Antikörper, der gegen das *Drosophila*-Orthologe des Hefeproteins Soh1 gerichtet ist (Park *et al.*, 2001a). Ein Soh1-orthologes Protein konnte auch in TRAP/SMCC identifiziert werden (Ito *et al.*, 1999), ist aber bisher nicht als Komponente des Hefe-Mediators beschrieben worden. Der 2 MDa-Komplex fungiert als Coaktivator für VP16, *Dorsal* und dHSF (Hitzeshockfaktor), funktioniert aber nicht als Corepressor für *even-skipped*. Zudem konnte auch eine Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren *Krüppel*, *Bicoid* und *Fushi-tarazu* gezeigt werden, während die *Drosophila*-Proteine *Twist* und *Hunchback* keine Bindung an dMed demonstrierten.

Der Coaktivator bindet darüber hinaus an dTBP, dTFIIB, dTFIIE $\beta$ , dRAP74 und dTFIIS (Park *et al.*, 2001a).

Genetische Untersuchungen weisen den Drosophila-Komponenten eine wesentliche Rolle in der Embryonalentwicklung zu, wobei für dTRAP80 und dMED6 gezeigt ist, daß sie essentiell für den Zellmetabolismus sind (Boube *et al.*, 2000; Gim *et al.*, 2001). Auch eine Mutation (Deletion der ersten 23 Aminosäuren) im Protein *poils aux pattes* (pap/dTRAP240) ist für den Organismus rezessiv letal, allerdings wird Pap/dTrap240 nicht für das Überleben einer Zelle benötigt, sondern ist wichtig für die Entwicklung der labialen und maxillaren Fühler, sowie den Tarsus des ersten Beins (Boube *et al.*, 2000). Für dMed6 konnte überdies gezeigt werden, daß es für die Entwicklung der Taufliegenlarve zur Puppe essentiell ist, da bei diesem Stadium kein maternales Protein mehr vorhanden ist, was ein nahezu komplettes Fehlen der Flügel-, Bein-, und Antennenanlagen sowie Defekte in der Hirnausbildung zur Folge hat (Gim *et al.*, 2001). Ähnliche Studien einer anderen Arbeitsgruppe identifizierten *Kohtalo*, daß sich als identisch zu Pap/dTrap240 herausstellte, und *Blind spot/dTrap230* als wichtige Proteine für die Entwicklung der Organanlagen für den Bereich Augen/Antennen („*eye-antennal disc*“) im Imago (Treisman, 2001). Zellen, welche Kohtalo- bzw. Blind spot-Mutationen tragen sind in der terminalen Differenzierung zu Photorezeptorzellen blockiert, einem Entwicklungsvorgang, der durch den Notch- sowie den Hedgehog-Signalweg induziert wird (Treisman, 1999). Interessanterweise konnte Kohtalo/dTrap240 schon in den späten achtziger Jahren als Suppressor des *Polycomb*-Phänotyps kloniert werden (Kennison und Tamkun, 1988), was dTrap240 als Mitglied der Gruppe der *Trithorax*-Proteine (van Lohuizen, 1999) einordnet, zu denen unter anderem auch *Brahma* und *Moira* gehören, die zusammen im Brm-Chromatinremodellierungskomplex (Abschn. 1.4.4.) der Taufliege zu finden sind.

### 1.3.3. Mediator als Endpunkt von Signalübertragungskaskaden

Die Erforschung der Rolle des Mediators bei der Übertragung von Signalen von der Zellmembran in den Nukleus hat noch einen sehr rudimentären Charakter, und beruht ausschließlich auf molekulargenetischen und entwicklungsgenetischen Daten. Trotzdem scheint sich eine wichtige Funktion des Transkriptionscofaktors in der Ras-Signalkaskade (Kolch, 2000; Tan und Kim, 1999) und im Wng/Wnt-Signalweg (Eastman und Grosschedl, 1999) abzuzeichnen.

Wenn Zellen der Bäckerhefe von der Logphase in die stationäre Wachstumsphase übergehen, nehmen sie einen G<sub>0</sub>-ähnlichen Ruhezustand ein, wobei der Übergang unter anderem durch ein Anschalten des YGP1-Gens und den Ras-Signalweg reguliert wird. In einem *Screen* für Suppressoren einer deregulierten YGP1-Expression in der Logphase wurden die sogenannten RYE („*regulation of YGP1 expression*“)-Gene gefunden, und es stellte sich heraus, daß diese identisch mit den Mediatoruntereinheiten, SRB9/SSN2, SRB10/SSN3, SRB11/SSN8 und SIN4 sind (Chang und Kornberg, 2000; Howard *et al.*, 2001). Eine Deletion der SSN-Gene hat zum Beispiel – genauso wie eine reduzierte Ras-Aktivität - ein Anschalten von YGP1 zur Folge. Der direkte Endpunkt der Signalkaskade – auf den Mediator bezogen – liegt allerdings im Gal11-Modul, da konstitutiv aktives Ras (RAS2<sup>Val19</sup>) synthetisch letal mit SIN4-, GAL11-, MED3/HRS1 und MED2-Mutationen ist. Außerdem führen Deletionen in den Genen für GAL11 und MED3/HRS1 zu einer Hochregulierung von YGP1 in der Logphase (Anmerkung: MED2Δ-Mutanten haben keinen Effekt), während beispielsweise eine Mutation im Med9/10-Modul (MED1Δ) keinen Einfluß auf die YGP1-Expression hat. Weitere genetische Analysen konnten zeigen daß PKA (Proteinkinase A) stromaufwärts von SIN4 liegt. Das Sin4-Protein scheint für das Überleben von Hefe in der stationären Phase äußerst wichtig zu sein, da SIN4 (RYE)-Mutanten eine zweihundertfach reduzierte Überlebensrate nach acht Tagen „Hungerperiode“ haben.

Weitere Hinweise auf eine Funktion von Mediator im Ras-Signalweg kommen aus genetischen Untersuchungen beim Fadenwurm. So wurde das DRIP130-orthologe *C. elegans*-Protein Sur-2 in einem *Screen* auf Suppressoren für konstitutiv aktives Ras identifiziert. Mutationen von Ras, die einen Funktionsverlust des G-Proteins bewirken, führen zu einem Fehlen der Geschlechtsorgane (z.B. Vulva) in den Hermaphroditen. Konstitutiv aktives Ras (Ras<sup>G13E</sup>) hingegen hat die Ausprägung eines Multivulvaphänotyps zur Folge (Nilsson *et al.*, 2000; Singh und Han, 1995). Von einer anderen Gruppe konnte zusätzlich gezeigt werden, daß auch eine Deletion von LET425 (CeMED6) Ras<sup>G13E</sup> supprimiert (Kwon und Lee, 2001). Ein Schema des Signalwegs findet sich im Anhang (Abschn. 8.3.1., Abb. 38).

Mediatorkomponenten von *C. elegans* und *D. melanogaster* spielen darüber hinaus eine Rolle als (mögliche) Endpunkte des Wng/Wnt-Signaltransduktionsprozesses. So kann das Anschalten eines im Wng/Wnt-Signalweg liegenden Fadenwurm-Gens (PAL-1), welches für die Ausprägung männlicher Geschlechtsmerkmale in postembryonalen Neuroblasten am Schwanz des Wurmes verantwortlich ist, in anderen Zelltypen durch Sop-1/CeTrap230 blockiert werden, während genetische Daten gleichzeitig dafür sprechen, daß CeMed6 essentiell für die positive Regulation des PAL-1-Gens durch Bar-1/Ceβ-Catenin ist (Kwon und Lee, 2001; Zhang und Emmons, 2000; Zhang und Emmons, 2001).

Bemerkenswerterweise ist auch in den postembryonalen Neuroblasten die Wng/Wnt-Kaskade durch Sop-1/CeTrap230 blockiert, allerdings ermöglicht ein Intron-Enhancer, der in diesen Zellen aktiv ist, die Expression von PAL-1. Ein Funktionsverlust des Enhancers kann durch eine Mutation in Sop-1 supprimiert werden, welche eine Deletion der C-terminalen glutaminreichen Domäne zur Folge hat. Die vergleichbare Deletion in Blind spot/dTrap230 hat eine fehlende Augen- und Antennenentwicklung in der Taufliege zur Konsequenz. Eine schematische Darstellung kann im Anhang (Abschn. 8.3.2., Abb. 39) gefunden werden.

## 1.4. Chromatin und Transkriptionsregulation

### 1.4.1. Die DNA im Zellkern ist in Chromatin verpackt

Die Regulation der Genexpression ist in gewisser Weise auch mit der Frage verbunden, wie es eine menschliche Zelle schafft, die 2 m DNA ihres diploiden Chromosomensatzes, ein hochgeladenes Polymer, welches ihr Genom konstituiert, in einem Zellkern mit einem Durchmesser von ca. 10  $\mu\text{m}$  und einem Volumen von ca. 500  $\mu\text{m}^3$  unterzubringen. Die prinzipielle Antwort darauf kennen wir bereits seit knapp 30 Jahren, und sie lautet: Verpackung in eine kompakte Nukleoproteinstruktur, das Chromatin. Die nukleäre DNA ist dabei mit stark basischen Eiweißen, den Histonen, assoziiert, welche zu den in der Evolution am besten konservierten Proteinen überhaupt gehören. Die fundamentale Grundeinheit des Chromatins ist das Nukleosom, welches aus einem Oktamer der Histonproteine H2A, H2B, (H3)<sub>2</sub> und (H4)<sub>2</sub>, sowie 146 bp DNA, die sich knapp zweimal um den Proteinkern winden (1.65 superhelikale Windungen), aufgebaut ist (Thomas und Kornberg, 1975). Das Nukleosom (Durchmesser ca. 10 nm) besitzt eine hochgeordnete Struktur, nur die N-Termini der Histone sind hochflexibel, und stehen möglicherweise wie die Stacheln einer Beere nach außen (Luger *et al.*, 1997; Luger und Richmond, 1998). Nukleosomen verleihen dem Chromatin ein „perlschnurartiges“ Aussehen und induzieren positive Superhelices in der DNA. An die sogenannte *Linker*-DNA zwischen den einzelnen Nukleosomen kann Histon H1 binden, welches auch mit sich selbst interagiert, und so zusammen mit den N-terminalen Fortsätzen den nächst höheren Grad der Verpackung zur Solenoid- bzw. 30 nm-Fibrille induziert. Ein Gerüst aus Nicht-Histonproteinen (z.B. HMG- und SIR-Proteine) ermöglicht die Anlagerung der 30 nm-Fibrille in Schleifen, was zur Ausbildung einer Struktur mit einem Durchmesser von 300 nm führt, die sich letztlich zu den 0.7 –1.0  $\mu\text{m}$  breiten Chromosomen faltet.

Damit Transkriptionsfaktoren effizient an ihre Zielsequenzen auf der DNA binden können und die RNA-Polymerase II die RNA-Synthese durchführen kann, muß das Chromatin lokal aufgewunden werden (Bildung von Euchromatin). Diese Aufgabe übernehmen Enzyme, die in der Lage sind Histone, überwiegend an ihren N-Termini, zu modifizieren, bzw. Nukleosomen auf der DNA zu verschieben (Chromatinremodellierungsmaschinen).

## 1.4.2. Chromatinmodifikationen

### 1.4.2.1. Histone können acetyliert werden

Eine Korrelation aktiv transkribierter Gene mit einer verstärkten Histonacetylierung in ihrem Chromatinbereich, kombiniert mit der Erkenntnis, daß stillgelegte Gene im Heterochromatin in einem hypoacetylierten Zustand vorliegen, führte zu der Hypothese, daß eine Acetylierung der N-terminalen Fortsätze von Histonen einen positiven Effekt auf die Genexpression hat. In der Tat sind inzwischen zahlreiche Interaktionen von Aktivatoren und Coaktivatoren mit Histonacetyltransferasen (HATs) beschrieben. Das primäre Substrat für diese Enzymklasse sind die  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten in den N-Termini der Histone. Als Acetylgruppendonor fungiert Acetyl-Coenzym A (AcCoA). Es wird spekuliert, daß die Modifikation dieser Lysinreste die Wechselwirkung zwischen Nukleosomen, sowie zwischen Histonen und DNA schwächt, und so die Chromatinstruktur auflockert. Außerdem besitzen eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (und auch HATs) sogenannte *Bromodomänen*, für die gezeigt werden konnte, daß sie *in vitro* spezifisch an acetylierte Peptide binden, die den Histonfortsätzen entsprechen. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß der Swi/Snf-Chromatinremodellierungskomplex (Abschn. 1.4.4.) *in vitro* weitaus effizienter funktioniert, wenn die Nukleosomen durch den HAT-Komplex SAGA acetyliert wurden (Hassan *et al.*, 2001).

Obwohl die verschiedenen Histonmodifikationen, wie z.B. Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Ribosylierung und Methylierung bereits seit Jahrzehnten bekannt sind, wurde erst 1996 die erste HAT mit Transkriptionsfunktion im Labor von David Allis (Charlottesville, Virginia) aus dem Ciliaten *Tetrahymena* isoliert. Es stellte sich dann heraus, daß das Enzym homolog zu dem Hefeprotein Gcn5 war, ein Faktor, welcher bereits aufgrund genetischer und biochemischer Daten als Coaktivator bekannt war, und später als enzymatische Komponente in den Multiproteinkomplexen SAGA und ADA identifiziert werden konnte. In den folgenden vier Jahren wurde dann eine ganze Reihe weiterer HATs in *S. cerevisiae*, Pflanzen, Protozoen und Metazoen gefunden, die strukturell in mehrere Klassen unterteilt werden können (Übersichtsartikel: Marmorstein und Roth, 2001; Roth *et al.*, 2001). Generell kann man zwei Gruppen von HATs unterscheiden.

Die Vertreter der HAT-B-Gruppe sind überwiegend im Cytoplasma lokalisiert und scheinen für den Transport der am Ribosom synthetisierten Histone in den Kern verantwortlich zu sein. HATs vom A-Typ hingegen befinden sich im Nukleus und üben dort wichtige Funktionen in der Transkription, DNA-Replikation und DNA-Reparatur aus. Anhand von Homologiebeziehungen kann man die HAT-A-Gruppe in die folgenden Klassen unterteilen:

- **GNAT („*Gcn5-related N-acetyltransferases*“)-Familie:** Gcn5 (Hefe, Metazoen), PCAF (Säuger), Elp3 (Elongatorkomplex, Hefe), Hpa2 (Hefe) und TFIIC (RNA-Polymerase III-Initiation, Säuger). Vertreter dieser Klasse acetylieren präferentiell den Lysinrest 14 von Histon H3, und besitzen eine C-terminale Bromodomäne.
- **MYST -Familie:** MOZ (Mensch), Ybf2/Sas3 (Hefe, NuA3-Komplex), Sas2 (Hefe), Tip60 (Mensch), Esa1 (Hefe, NuA4-Komplex), MOF (Drosophila) und HBO1 (Mensch, Replikation). Bis auf Ybf2/Sas3 erfolgt eine bevorzugte Acetylierung von Histon H4. Die meisten Mitglieder dieser Familie besitzen eine Chromodomäne, die RNA (Akhtar *et al.*, 2000) und methylierte Histonfortsätze binden kann (Bannister *et al.*, 2001).
- **CBP/p300 (CREB-bindendes Protein):** Die beiden Proteine mit großer Homologie in ihrer Primärstruktur, wurden unabhängig voneinander als E1A-interagierende Cofaktoren bzw. als Proteine, die phosphoryliertes CREB binden, entdeckt. Neben der Acetylierung von Histonen sind auch eine Reihe anderer Proteine als Substrate (z.B. p53, TFIIE, TFIIF und E2F1) beschrieben. CBP/p300 besitzen eine zentrale Bromodomäne, mehrere potentielle Zn-Finger und zwei unabhängige Domänen, die mit einer Myriade verschiedener Transkriptionsfaktoren wechselwirken können. Dies macht sie zu einem zentralen Coaktivator in der Zelle, dessen Expression strikt reguliert sein muß, was man auch daran sieht, daß eine Deletion von p300 bzw. CBP in der Maus letal ist. Die CBP-Menge in den Zellen scheint noch kritischer zu sein, da eine Haploinsuffizienz von CBP das Rubinstein-Taybi-Syndrom beim Menschen und Skelettanomalien bei der Maus verursacht (Übersichtsartikel: Chan und La Thangue, 2001).
- **SRC (Steroidrezeptor-Coaktivator)-Familie:** SRC-1, ACTR/pCIP/TRAM-1/RAC3, SRC-3, TIF-2, GRIP1, ATF-2.
- **TAF<sub>II</sub>250-Familie:** Hefe-TAF<sub>II</sub>145 und TAF<sub>II</sub>250 (Säuger, Drosophila) besitzen zwei Bromodomänen und könne daher äußerst effizient an acetylierte Histone binden.

#### 1.4.2.2. Histone können deacetyliert werden

Da die Acetylierung von Chromatin in den meisten Fällen die Transkription positiv reguliert, muß es auch eine Möglichkeit geben, dieses Signal wieder abzuschalten. Diese Funktion wird von den Histondeacetylasen (HDACs) vermittelt (Übersichtsartikel: Khochbin *et al.*, 2001).

Die erste HDAC wurde in Säugern 1996 identifiziert, und führte zu der Entdeckung einer ganzen Familie von Enzymen in höheren Eukaryonten, die verwandt zum Hefeprotein Rpd3 sind, und als Klasse I-HDACs bezeichnet werden (Leipe und Landsman, 1997). Die Suche nach HDACs homolog zum Hefeenzym HDA1 wies den Weg zur Charakterisierung von HDACs, die eine zweite Klasse von Deacetylasen bilden (Grozinger *et al.*, 1999). Als dritte Klasse von HDACs wurde dann schließlich die Sir2-Proteinfamilie erkannt, welche eine Rolle im dauerhaften Stilllegen von Genen hat (Imai *et al.*, 2000).

- **Klasse I-HDACs:** HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8 besitzen eine hochkonservierte katalytische Domäne die große Teile der Enzyme einnimmt. HDAC1 und HDAC2 sind Komponenten der Multiproteinkomplexe Sin3/HDAC und NuRD/Mi2. Die Hauptaufgabe von HDAC3 ist eng mit der Aktivität von Corepressoren für nukleäre Hormonrezeptoren gekoppelt, und ist in der Lage, ähnlich wie diese zwischen Cytosol und Nukleoplasma hin- und her zu wandern.

- **Klasse II-HDACs:** Die HDACs4-7 sind noch wenig charakterisiert, spielen aber möglicherweise auch eine Rolle in der negativen Regulation von nukleären Hormonrezeptoren. HDAC6 besitzt interessanterweise zwei katalytische Domänen, ist hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert und wird nicht durch den Deacetylaseinhibitor Trapoxin in ihrer Wirkung beeinträchtigt. Auch HDAC4 und 5 sind fakultativ cytoplasmatisch, da sie nach Phosphorylierung durch die Ankerproteine der 14-3-3-Familie im Cytosol zurückgehalten werden.

- **Klasse III-HDACs:** Die enzymatische Aktivität dieser Familie ist *in vitro* NAD<sup>+</sup>-abhängig, was die Deacetylasefunktion in Zusammenhang mit dem zellulären Redox- und Energiezustand bringt. Hefe-Sir2 zeigt zudem eine ADP-Ribosyltransferaseaktivität. In Säugern sind sieben Klasse III-Enzyme beschrieben, die SIRT1-7 benannt werden.

### 1.4.2.3. Histone können methyliert werden

Die Modifikation von Histonfortsätzen durch Anhängen einer Methylgruppe kann an Lysin- und Argininresten erfolgen. Dementsprechend kann man Arginin- und Lysin-Methyltransferasen (MTasen) unterscheiden, welche beide S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Methylgruppendonor verwenden. Die Methylierung von Histonen ist eine relativ stabile Modifikation mit einer langen Halbwertszeit. Bis dato konnten noch keine Demethylaseaktivitäten gereinigt bzw. identifiziert werden, und es wird diskutiert ob diese in der Zelle überhaupt existieren (Übersichtsartikel: Jenuwein, 2001; McBride und Silver, 2001; Zhang und Reinberg, 2001).

In Säugern sind bis dato die Argininmethyltransferasen PRMT (Protein-Arginin-Methyltransferase)1, PRMT2, PRMT3, PRMT4/CARM1 (Coaktivator-assozierte Arginin-Methyltransferase) und PRMT5/JBP-1 (Januskinase-bindendes Protein) bekannt. PRMT1 ist essentiell für die Embryonalentwicklung der Maus, und die Methylierung von H4 R3 spielt eine Rolle in der Coaktivatorfunktion des Enzyms für nukleäre Hormonrezeptoren. Die Methylierung von H4 R3 stimuliert die Acetylierung von Histon H4 durch CBP *in vitro*. Außerdem ist PRMT1 eine essentielle Komponente des Interferon-Signalwegs, da die Bindung des Transkriptionsfaktors STAT1 an seine Zielsequenzen auf der DNA von seiner Methylierung am Argininrest 31 abhängt. Auch CARM1 ist ein Cofaktor für Hormonrezeptoren und interagiert mit der GRIP1/SRC-Familie der Coaktivatoren für nukleäre Hormonrezeptoren, in deren Kontext eine synergistische Funktion zusammen mit CBP/p300 gezeigt werden konnte. Die Methylierung von p300 in der KIX-Domäne hat eine Störung der CREB-Interaktion zur Folge, was CARM1 als Corepressor für die cAMP induzierten Signalkaskaden ausweist (Xu *et al.*, 2001). Das Enzym methyliert hauptsächlich H3 R17, in geringerem Maße auch R2 und R26 in Histon H3.

Zahlreiche Lysin-MTasen sind bisher in Eukaryonten beschrieben worden, wobei ihre zelluläre Rolle bzw. die physiologischen Zielmoleküle zum größten Teil noch unbekannt sind. Histone können *in vivo* an den Lysinresten K4, K9, K17, K27 und K36 an H3, sowie K20 an H4, methyliert werden (siehe Abb. 8). Alle bisher identifizierten Lysin-MTasen besitzen als gemeinsames Merkmal eine sogenannte evolutionär konservierte SET-Domäne, die zuerst in den Drosophila-Proteinen Su(var)3-9 (Suppressor von Positionseffekten), Enhancer of Zeste (Polycomb-Familie) und Trithorax gefunden wurde. Zudem weisen einige der Lysin-MTasen Prä-SET und Post-SET-Regionen auf. In der Maus existieren zwei Homologe zu Su(var)3-9 (Suv39H1, Suv39H2), welche, genauso wie das *S. pombe*-Ortholog Clr4, überwiegend Lysin 9 in H3 modifizieren. Eine weitere Säuger-MTase, G9a genannt, ist in der Lage K9 und K27 von Histon H3 zu methylieren (Konsensussequenz: TKxxARKS). Kürzlich wurde das Säugerprotein SET7 kloniert und demonstriert, daß es sich um eine MTase handelt, die H3 K4 *in vitro* und *in vivo* modifiziert (Wang *et al.*, 2001). In *Tetrahymena* konnte demonstriert werden, daß die H3 K4-Methylierung mit transkriptionsaktivem Euchromatin, die H3 K9-Methylierung hingegen mit Heterochromatin korreliert ist. Außerdem schließen sich die Methylierung von K4 und K9 auf Histon H3 gegenseitig aus, was diese beiden Modifikationen zu einer wichtigen Markierung für den Regulationszustand eines Gens macht.

#### 1.4.2.4. Weitere Modifikationen

Über die ADP-Ribosylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung des Chromatins ist in funktioneller Hinsicht noch nicht sehr viel bekannt (Übersichtsartikel: Spencer und Davie, 1999; Wu und Grunstein, 2000).

- **Ubiquitinierung:** Die Histone H2A, H2B und H3 liegen *in vivo* ubiquitiniert (an den  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten) vor. Ubiquitiniertes H2B scheint dabei mit aktiv transkribierten Genen korreliert zu sein. *Drosophila* TAF<sub>II</sub>250 steht im Verdacht eine Ubiquitinkonjugierende Enzymaktivität zu besitzen, welche eine Ubiquitinierung von Histon H1 *in vitro* zur Folge hat. Eine Deletion der enzymatischen Aktivität resultiert in einer verringerten Expression von Zielgenen des Aktivators Dorsal in Embryonen der Taufliege (Pham und Sauer, 2000). Die Ubiquitinierung von Histon H2A durch das murine Hefe-Rad6-Ortholog HR6B spielt eine wichtige Rolle in der Spermatogenese (Baarends *et al.*, 1999). Kürzlich konnte eine Verbindung zwischen einem HDAC6-Komplex und dem Ubiquitin-Signalweg festgestellt, und eine direkte Bindung von HDAC6 an Ubiquitin demonstriert werden (Seigneurin-Berny *et al.*, 2001).

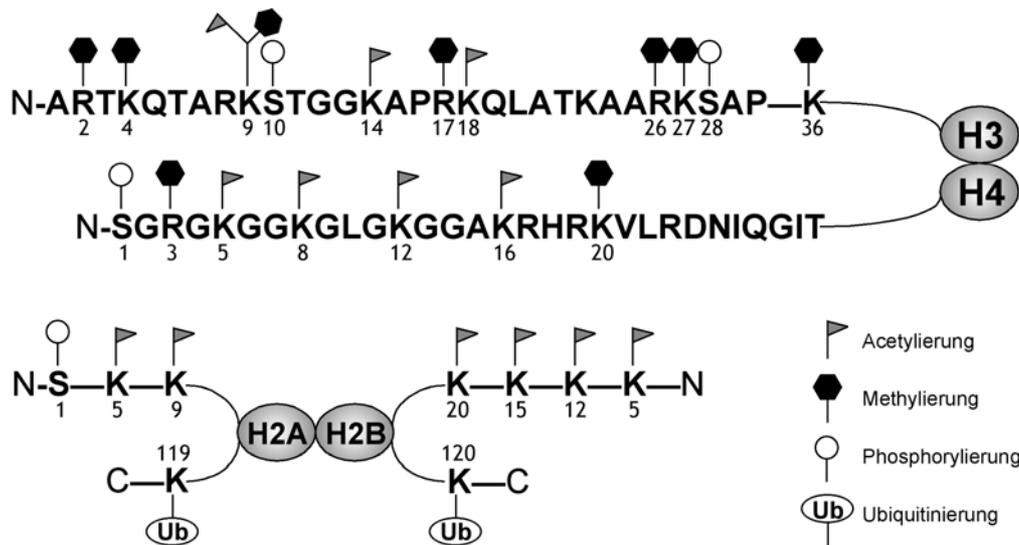
- **ADP-Ribosylierung:** Poly(ADP-Ribose) ist ein natürlich vorkommendes Polymer, daß große Ähnlichkeit zu Nukleinsäuren hat. Es wird ausgehend von NAD<sup>+</sup> präferentiell an acetylierten Histonen und wenigen anderen Kernproteinen (HMG-Proteine, T-Antigen) durch PARP (Abschn. 1.2.7.) synthetisiert. Es wird spekuliert, daß diese Modifikation Chromatinschlaufen in einem transkriptionskompetenten Zustand halten kann (Boulikas, 1991). Die Auto-ADP-Ribosylierung von Chromatin-gebundener PARP führt zu einer transienten Verdrängung von Histonen von der DNA und einer Reassoziaton derselben, nachdem das Enzym poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolase die ADP-Ribose-Polymere abgebaut hat (Althaus *et al.*, 1994).

- **Phosphorylierung:** Die Kinasierung von Histon H3 an den Serinresten 10 und 28 beeinflusst sowohl die Transkriptionsregulation als auch die Mitose (Cheung *et al.*, 2000). Während im Interphasenkern ausschließlich die Ser10-Phosphorylierung vorliegt, ist die Modifikation von Ser10 und Ser28 mit einer Kondensation des Chromatins in der Metaphase der Mitose korreliert. Man nimmt an, daß die Aurora-Kinasefamilie für diesen Schritt am G2/M-Übergang des Zellzyklus verantwortlich ist (Crosio *et al.*, 2002). Untersuchungen in der Bäckerhefe zeigen, daß die H3 Ser10-Phosphorylierung die Genexpression positiv reguliert, indem sie die Acetylierung von H3 durch Gcn5 drastisch stimuliert (Lo *et al.*, 2001).

Bei Säugern findet man diese Modifikation vorwiegend bei IE („*immediate early*“)-Genen, welche durch Phorbol ester und den MAPK-Weg angeschaltet werden. Eine essentielle Rolle für die Rsk2-Kinase in diesem Prozeß wird diskutiert (Merienne *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist auch Histon H1 ein wichtiges Zielmolekül, und das Auftreten von phosphoryliertem H1 ist kongruent zu aktiv transkribierten Genen (Spencer und Davie, 1999).

### 1.4.3. Der Histoncode

Die zahlreichen Modifikationsmöglichkeiten der N-terminalen Histonfortsätze in Verbindung mit deren Konsequenz auf die Chromatinstruktur, sowie die Existenz von Proteinmodulen, welche spezifisch diese Modifikationen erkennen können (z.B. Bromodomäne), führte zum Postulat, daß neben dem genetischen Code, ein zusätzlicher *Histoncode*, insbesondere in höheren Organismen die epigenetische Regulation der Erbinformation steuert (Strahl und Allis, 2000). Eine ausführliche Darstellung der Histonmodifikationen findet sich in Abb. 8. Ein wichtiges Konzept dabei ist die sich abzeichnende Tatsache, daß sich verschiedene Modifikationen am selben Histonfortsatz gegenseitig ausschließen, bzw. Synergismen eine zeitliche Abfolge von Modifikationen diktieren können. Eine Schlüsselrolle in diesem „Spiel“ nimmt wahrscheinlich K9 von Histon H3 ein, weil es als einziger Lysinrest sowohl acetyliert als auch methyliert werden kann. Die Methylierung von H3 K9, die zu einer Rekrutierung des Heterochromatinbindungsproteins HP1 führt, repräsentiert einen wichtigen epigenetischen Marker für die Stilllegung eines Gens, und steht daher ursächlich im Zusammenhang mit der Repression der Genexpression auf einem der X-Chromosomen, „*dosage compensation*“ genannt, bei weiblichen Säugetieren (die ja bekanntlich zwei davon haben). Die ganze Komplexität wird deutlich, wenn man beachtet, daß die Chromatinremodellierungsmaschinen vom ISWI-Typ (Abschn. 1.4.4.) intakte Histonfortsätze für ihre Funktion brauchen, und daß im allgemeinen auch die Chromatin-modifizierenden Enzyme selbst unterschiedliche Erkennungsmodule für bereits vorhandene Modifikationen besitzen: Chromodomänen, Bromodomänen, SET-Domänen, Shadowdomänen und Chromo-Shadow-Domänen. Darüber hinaus existieren Proteine, welche 5-Methyl-Cytosinreste in der DNA erkennen, und nach ihrer Bindung eine Rekrutierung von HDACs initiieren. Die DNA-Methylierung an sogenannten CpG-Inseln im Genom, ein weiterer epigenetischer Marker ist immer mit einer Stilllegung dieses Chromatinbereiches verbunden. Schließlich könnte die Mono- bzw. Dimethylierung von Argininresten, welche überdies noch symmetrisch bzw. asymmetrisch erfolgen kann, oder die Mono-, Di- bzw. Trimethylierung von Lysinresten der Histonfortsätze eine weitere Codierungsebene einführen (Übersichtsartikel: Jenuwein und Allis, 2001; Rice und Allis, 2001; Zhang und Reinberg, 2001).



**Abb. 8:** Histonmodifikationen in Metazoen. Die bisher bekannten potentiellen Modifikation in den Histonen H3, H4, H2A und H2B sind gezeigt. Es ist zu beachten, daß niemals alle Modifikationsmöglichkeiten gleichzeitig benutzt werden, und daß sich Modifikationen zum Teil gegenseitig ausschließen (siehe Text).

#### 1.4.4. Chromatinremodellierungsmaschinen

Die ATP-abhängigen Remodellierungskomplexe beeinflussen die Chromatinstruktur, indem sie die Position und damit die Anordnung von Nukleosomen auf der DNA verändern, die Konformation von Nukleosomen manipulieren und den Aufbau kompletter Oktamere aus den H3•H4-Tetrameren stimulieren (Übersichtsartikel: Guschin und Wolffe, 1999; Kingston und Narlikar, 1999; Varga-Weisz und Becker, 1998; Vignali *et al.*, 2000; Wade und Wolffe, 1999). Es existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Multiproteinkomplexe mit orthologen Vertretern sowohl in niederen Eukaryonten als auch in höheren Organismen, wobei letztere zum Teil zelltypspezifische Heterogenitäten in der Zusammensetzung von Remodellierungsmaschinen, die der gleichen Familie angehören, aufweisen. Die einzelnen Familien dieser Proteinkomplexe werden anhand ihrer ATPase-Untereinheit klassifiziert, wohingegen die diversen Familienmitglieder durch das Vorhandensein der für sie spezifischen Untereinheit(en) gekennzeichnet sind. Alle diese Enzyme gehören zur SNF2-Subgruppe der *DEAD/H-Box*-Familie von Nucleinsäure-stimulierten ATPasen. Da Mitglieder der SNF2-Familie bei vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie homologe Rekombination (Rad54-Protein), DNA-Reparatur (ERCC&/CSB-Protein), Schwester-chromatidsegregation (Hrp1-Protein) und

Aufrechterhaltung des DNA-Methylierungsstatus (ATRX-Protein, Lsh-Protein) eine Rolle spielen (Fyodorov und Kadonaga, 2001), kann hier nur auf die für die Transkription relevanten Vertreter eingegangen werden.

Die ATP-abhängige Remodellierung von Nukleosomen kann als ein erster Schritt bei genregulatorischen Vorgängen betrachtet werden, welcher der Bindung vieler Transkriptionsfaktoren an die DNA vorangeht. Es gibt allerdings auch Aktivatoren, wie Gal4, HNF3 oder nukleäre Hormonrezeptoren, die ohne die Hilfe dieser ATPasen in der Lage sind an DNA zu binden. An dieser Stelle ist es auch wichtig darauf hinzuweisen, daß Chromatinremodellierung *per se* die Transkription positiv und negativ regulieren kann. Dies liegt in der Natur der Enzyme, deren Eigenschaft es ist, Übergänge zwischen verschiedenen Chromatinzuständen (unterschiedlicher Struktur) durch eine Herabsetzung der Energiebarriere zu katalysieren, was eine Entscheidung darüber ausschließt, ob der neue Zustand nun aktivierend oder reprimierend ist. Dieser Entschluß wird sehr wahrscheinlich durch Bindung von Transkriptionsfaktoren bzw. durch die Ausbildung spezifischer DNA-Strukturen an den Promotoren von Genen gefaßt (Liu *et al.*, 2001c). Man unterscheidet zur Zeit drei Familien von Remodellierungsenzymen, welche gut untersucht sind, wobei sicherlich zahlreiche weitere noch nicht charakterisierte Spezies in den Zellen der *Metazoa* existieren. Erstere sind die *Swi2*-, die *ISWI*- sowie die *Mi-2/CHD*-Familie. Die Einteilung beruht sowohl auf Homologiebeziehungen basierend auf der Aminosäuresequenz, als auch aufgrund funktioneller Unterschiede. Mitglieder der *Swi2*-Familie besitzen stets eine Bromodomäne (Abschn. 1.4.2.), die *Mi-2*-Enzyme weisen Chromodomänen (Abschn. 1.4.2.) und PHD-Finger (Aasland *et al.*, 1995; Aasland und Stewart, 1995) auf, wohingegen für *ISWI*-ATPasen das Vorhandensein einer SANT-Domäne (Aasland *et al.*, 1996) kennzeichnend ist (Längst und Becker, 2001; Peterson, 2000).

Den Prototyp dieser Enzymklasse stellt die *Swi2/Snf2*-ATPase der Bäckerhefe dar, welche ursprünglich in zwei genetischen „*Screens*“ identifiziert wurde (daher der Doppelname). Mutationen in den *SNF* („*sucrose non-fermenting*“)-Genen hatten Defekte in der *SUC2*-Expression zur Folge, dessen Genprodukt für das Wachstum von *S. cerevisiae* in Medien, welche Sucrose- bzw. Raffinose als einzige Kohlenstoffquelle bereitstellen, wichtig ist. Ähnliche Mutationen in den *SWI* („*switching defective*“)-Genen resultierten in einem Abschalten der Expression des *HO*-Gens, welches für die Umschaltung des Paarungstyps im Fortpflanzungszyklus der Hefe essentiell ist (Sudarsanam und Winston, 2000). Die *Swi2/Snf2*-ATPase ist die enzymatische Komponente des Hefe *Swi/Snf*-Komplexes, der *in vitro* in der Lage ist, Nukleosomen auf der DNA zu verschieben, DNA-Schleifen sowie Torsionsspannung im Chromatin zu induzieren, sowie Histonoktamere von einem DNA-Molekül auf ein anderes zu transferieren. Kennzeichnend sind außerdem, daß die Aktivität nicht essentiell von der Anwesenheit der Histonfortsätze abhängt und die ATPase-Funktion bereits durch „nackte“ DNA stimuliert wird.

Die Bäckerhefe besitzt darüber hinaus noch eine zweite ATPase (Sth1), die homolog zu Swi2/Snf2 ist, und die enzymatische Komponente des Rsc-Komplexes (Lorch *et al.*, 2001) repräsentiert. Die zelluläre Funktion von Swi/Snf in der Hefe, abgesehen von der Regulation der induzierbaren Gene SUC2 und HO, war lange Zeit unklar, neuere Studien deuten aber darauf hin, daß der Swi/Snf-Komplex für die Transkription bestimmter Gene während der Mitose wichtig ist, indem er eine Acetylierung der Histonfortsätze durch Gcn5 in der kompakten Chromatinstruktur mitotischer Chromosomen erlaubt (Krebs *et al.*, 2000).

Biochemische Untersuchungen in Embryoextrakten aus *Drosophila* führten zur Entdeckung des so bezeichneten *Brahma*-Komplexes, der neben zahlreichen anderen Proteinen (BAPs) die Trithoraxproteine (Abschn. 1.3.2.2.) *Brahma* (ATPase), *Osa* und *Moirai* enthält, und ortholog zum Hefe Swi/Snf-Komplex ist. Wahrscheinlich besitzt *Drosophila* eine zweite ATPase (*Kismet*) aus der Trithorax-Gruppe, die Bestandteil einer Remodellierungsmaschine sein könnte (Muller und Leutz, 2001).

Auch Säugerzellen enthalten zwei Swi2/Snf2-orthologe ATPasen, und zwar *Brg1* („*Brahma related gene 1*“) und *Brm* („*Brahma-like*“). Die beiden Proteine sind in ca. 70% ihrer Primärstruktur identisch, allerdings ist *Brg1*, im Gegensatz zu *Brm*, essentiell für die Embryonalentwicklung der Maus (Bultman *et al.*, 2000) und die zelluläre Integrität der embryonalen Krebszelllinie F9 (Sumi-Ichinose *et al.*, 1997). Der funktionelle Unterschied spiegelt sich auch in der proteinchemischen Analyse der Swi/Snf-ähnlichen Komplexe in Mammalia wieder. Während der humane BAF-Komplex sowohl *Brm* als auch *Brg1* als ATPase-Untereinheit aufweisen kann, besitzt der PBAF-Komplex ausschließlich *Brg1* als enzymatische Komponente. Die beiden Komplexe unterscheiden sich auch noch in weiteren Bestandteilen. BAF enthält zusätzlich das Hefe-Swi1/*Drosophila*-*Osa*-Ortholog BAF250, während PBAF exklusiv das Polybromoprotein BAF180, das homolog zum Rsc-Protein Rsc1 ist, als Untereinheit besitzt (Übersichtsartikel: Klochender-Yeivin *et al.*, 2002). BAF ist daher sehr wahrscheinlich der humane Swi/Snf-Komplex, wohingegen PBAF vermutlich ortholog zu Rsc ist (Nie *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2000). Ein echter biochemisch-funktioneller Unterschied zwischen BAF und PBAF konnte kürzlich in einem *in-vitro*-Chromatin-Transkriptionssystem demonstriert werden (Lemon *et al.*, 2001). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise, daß noch weitere *Brg1*- bzw. *Brm*-enthaltende Remodellierungskomplexe existieren, die zusätzlich HDACs als weitere enzymatische Bestandteile in sich tragen (Klochender-Yeivin *et al.*, 2002).

Histondeacetylasen (HDAC1, HDAC2) sind zudem integrale Bestandteile der Mi-2/CHD-enthaltenden Komplexe Mi-2 (*Xenopus laevis*) und NuRD (*Drosophila*, Säuger), bei denen man annimmt, daß die Remodellierungsfunktion direkt für eine Erhöhung der Zugänglichkeit von kompakten Chromatinstrukturen für die HDACs verwendet wird (Ayer, 1999).

Die Mi-2-ATPase wurde ursprünglich als Autoantigen bei der Krankheit Dermatomyositis identifiziert. Computeranalysen hatten zunächst die Präsenz zweier Chromodomänen, einer Helikase (irrtümlich)- und einer DNA-Bindungsregion vorhergesagt, daher der alternative Name CHD. Die Anwesenheit von MBD („*methyl-CpG dinucleotide-binding domain-containing*“)-Proteinen in den NuRD-Präparationen aus menschlichen Tumorzelllinien bzw. Oocytenextrakten des Krallenfrosches, gibt Grund zu der Annahme, daß die Wirkung der Mi-2-Remodellierungsmaschinen mit der Methylierung von DNA und damit mit dem Stilllegen von Chromatinabschnitten verbunden sein könnte (Muller und Leutz, 2001).

Mitglieder der Familie der ISWI („*imitation SWItch*“)-Komplexe findet man sowohl in der Bäckerhefe als auch in Metazoen. Prominente Vertreter sind NURF („*nucleosome-remodeling factor*“), CHRAC („*chromatin assessibility complex*“) und ACF („*ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor*“) in *Drosophila*, sowie ISW1 und ISW2 in *S. cerevisiae*. Genauso wie die Hefe (ISWI1 und ISWI2) besitzen auch humane Zellen zwei ISWI-Homologe, die Snf2h bzw. Snf2L genannt werden. WCRF/hACF, hCHRAC und RSF („*remodeling and spacing factor*“) wurden im menschlichen System identifiziert. Für NURF und RSF konnte *in vitro* ein positiver Effekt auf die Transkription in Verbindung mit Gal4-Aktivatorfusionen gefunden werden, *in-vivo*-Analysen in *Drosophila* hingegen weisen auf eine eher unspezifische Rolle der ISWI-Remodellierungsmaschinen in der Genregulation hin. Dafür spricht auch, daß in der Embryonalentwicklung der Taufliege RNA-Polymerase II und ISWI auf polytären Chromosomen nicht colokalisieren. Allen ISWI-Komplexen gemein ist die Eigenschaft Chromatin für DNA-bindende Proteine zugänglich zu machen. CHRAC vermittelt dabei eine äquidistante Positionierung von Nukleosomen, während NURF eine irreguläre Anordnung der Nukleosomen fördert (Längst und Becker, 2001).

## 1.5. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es nun zum einen Polypeptide zu identifizieren, die mit der molekular bis dato nicht charakterisierten PC2-Aktivität (Abschn. 1.2.7.) coeluiieren, sowie funktionell korreliert sind. Zum anderen sollte ein zellfreies *in-vitro*-Testsystem etabliert werden, das es ermöglicht PC2-assoziierte Cofaktoren schnell und einfach auf ihre Transkriptionsfunktion hin zu untersuchen. Dabei sollte das Verfahren der Depletion von Kernextrakten für die zu testenden Komponenten unter Verwendung spezifischer Antikörper zum Einsatz kommen. Ein weiterer Schwerpunkt sollte die Aufklärung des funktionellen Proteoms der Aktivierungsdomäne des Modellaktivators VP16 (Abschn. 1.2.5.2.) sein, was letztlich ein verbessertes Verständnis von Aktivatoren und damit von Cofaktoren zur Folge haben sollte.

## 2. Material

---

### 2.1. Geräte und Hilfsmittel

ÄKTA	Amersham Pharmacia Biotech (APC)
Agarosegelelektrophoreseapparaturen	BioRad
Analysewaagen	SPB55, SPB63, Scaltec
Autoradiographiekassetten	Appligene, APB
Chromatographiesäulen (vorgepackt)	Mini S PC3.2/3, Mono S PC1.6/5, Mono Q PC1.6/5, Mono S HR5/5, Mono Q HR5/5, Superdex 75 HR 10/30, Phenyl-Superose PC1.6/5, $\mu$ RPC C2/18 PC3.2/3 Superose 6 PC3.2/30, Superose 12 PC3.2/30 von Amersham Pharmacia Biotech (APC)
	Bio-Gel TSK DEAE-5 PW (75X7.5 mm), BioRad
Confocales Lasermikroskop	Leica
Direct Imager	Instant Imager, Packard
EconoGradient-System	BioRad
ELISA-Reader	Lambda F, MWG-Biotech
Entwicklermaschine	Hyperprocessor, APB
Elektroblot-Apparatur (semi-dry)	BioRad
Elektroporationsapparatur (Gene Pulser)	Typ 1652077, BioRad
FPLC	APB
Gefrierschränke	HFU686, HFU 630, Heraeus
Geigerzähler	LB122, Berthold
Geldokumentationssystem	Eagle Eye II, Strategen
Geltrockner	Slab Gel Dryer, Modell GD2000, Hoefer
Heizblöcke	Eppendorf-Thermostat 5320
Heizrührgeräte	RCT basic, IKA Labortechnik
Homogenisator	Douncer, Wheaton
Hybridisierungssofen	Uniequipe 6/12
Inkubatoren (Brutschränke)	Forma Scientifique
	Heraeus B6200
Konduktometer	Typ 703, Knick
Kühlschränke	Liebherr
Leersäulen	Econo, BioRad
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss
Lumat	Typ LB 9501, Berthold
Magnetic Beads	MagneSphere, Promega
Magnetrührer	REO, IKAMAG
Naßblotapparatur	BioRad
PCR-Thermocycler	Robocycler, Strategen GeneAmp 2400, Applied Biosystems GeneAmp 5700, Applied Biosystems T Gradient, Biometra
pH-Meter	Calimatic 760, Knick
Pipetten	Gilson Pipetman P2, P20, P200, P1000
Pipettierhilfe	Pipetus-akku, Hirschmann

Photometer	Beckman DU-640 Spektrophotometer
Pumpe	Modell P1, APB
Reaktionsgefäßschüttler	Thermomixer 5437 u. 5438, Eppendorf
Roller Mixer	Typ SRT1, Stuart Scientific
Rotoren	SS34, GSA, GS3, SLA-1500, SLA-300, SA600 von Sorvall 50.2 Ti, 70.2 Ti von Beckman
Säulenmaterial	Heparin Sepharose CL-B, Protein G Sepharose FF, Protein A Sepharose FF, Blue Sepharose CL-6B, Glutathionsepharose 4B, Chelating Sepharose FF von APC Nickel-NTA-Agarose, Qiagen DEAE-Cellulose DE52, Phosphocellulose P11 von Whatman Bromcyan-aktivierte Sepharose 4B, Streptavidin- Agarose von Sigma Fractogel EMD 650 (M) COO <sup>-</sup> , Merck Biorex 70, BioRad Innova 4400, Innova 4430, New Brunswick Scient. Typ 1083, GFL Hofer APB Branson Sonifier, Modell 250-D EPS 3500, APB PS250-2, Sigma PowerPAC 200, PowerPAC 3000, BioRad EPS 2A200, Hofer E734, Consort Witeg, Wheaton Typ UVF 6.12 S, BDK Typ XLC-230, MCE Cryogenics Beckman LS 6000 TA Polymax 1040, Heidolph KS250, IKA Labortechnik Typ 3011, GFL MELAG REAX2, Heidolph L7, L8-M von Beckman Bachofer (254 nm, 366 nm) RVC2-18 mit Kühlfalle CT02-50, Christ Gel Intensifying Screen, Kodak Vortex Genie, Bender & Hobein Thermo C10, Haake J6 MC, Beckman Multifuge 3 L-R, Varifuge 3.OR, Biofuge 28RS von Heraeus Tischzentrifuge EBA 3S, Hettich Zentrifuge 5417, 5415R, Eppendorf 2K15, Sigma 5B Plus, Sorvall 5C Plus, Sorvall
Schüttelinkubator	
Schüttelwasserbad	
SDS-PAGE-Apparaturen	
SMART-System	
Sonifikator	
Spannungsgeräte	
Spinnergefäße	
Sterile Werkbank	
Stickstofftank	
Szintillationszähler	
Taumlern	
Tischautoklav	
Überkopfschüttler	
Ultrazentrifugen	
UV-Illuminatoren	
Vakuumkonzentrator	
Verstärker-Folie	
Vortex	
Wasserbäder	
Zentrifugen	

## 2.2. Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial

DC-Plastikfolien, PEI-Cellulose F, 20 x 20 cm	Merck
DC-Plastikfolien, Kieselgel 60W F <sub>254</sub> S, 20 x 20 cm	Merck
Dialysefilter (0.025 µm Porendurchmesser)	Millipore
Dialyseschläuche (Viking, MWCO 15 kDa)	Roth
ECL Western Blot Kit	NEN
Einwegplastikmaterial	Greiner, NUNC
Filme	X-OMAT, BioMax von Kodak
Gel Drying Kit	Promega
Gelfiltrationssäulchen (G-25)	APB
Gelfiltrationssäulchen (MicroSpin S-200)	APB
Gewebekulturplatte (96-Loch), Microtest III, Falcon 3075	Becton Dickinson
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	APB
Luciferase Assay System	Promega
Sephadex G-50 (Nick column)	APB
Nitrocellulosemembran (0.45 µm Porendurchmesser)	BioRad
Nitrocelluloserundfilter (BA85)	Schleicher & Schüll
Nucleobond AX Plasmid DNA Kit	Macherery & Nagel
Nylonmembran (Hybond Plus)	APB
Oligotex Direct mRNA mini Kit	Qiagen
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym
pH-Indikatorpapier (Neutralit pH 5-10)	Merck
PVDF-Membran (Transblot)	BioRad
Silent Screen Plate (96-Loch), w/Nylon, 66 Biotyne B	Nunc
Membrane Btm N/Str PS, 0.45 µm Pore	
Silikonisierte Plastikreaktionsgefäße, 1.7 ml, prelubricated	Sorenson Bioscience Inc.
Silver Staining Kit: <i>plusone</i>	APB
Sterilfilter (Millex-GP, 0.22 µm)	Millipore
Ultrafiltrationseinheit (MWCO 30 kDa)	Amicon
Ultrafiltration-Filtereinheit (MWCO 10 kDa)	Millipore
Ultrafree-Filtereinheit (0.45 µm Porendurchmesser)	Millipore
Whatman 3MM Papier	Bender & Hobein
Zellkulturflaschen, Nunclon Surface	Nalge Nunc International

## 2.3. Chemikalien und Biochemikalien

Aceton	Merck
Acetonitril	Fluka
Acrylamid	BioRad
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung 40% (Rotiphorese Gel 40)	Roth
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung 30% (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Acrylamidlösung 30% (Rotiphorese Gel A)	Roth
Actinomycin D	Sigma
Agarose	Gibco BRL
α-Amanitin	Sigma
Ammoniak	Riedel-de Haën
Ammoniumchlorid	Merck

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Roth
AMPPNP	Roche
Aprotinin	Roche
ATP $\gamma$ S	Roche
8-Aza-Guanin (50x), A-5284	Sigma
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bacto Yeast Extract	Difco
Benzamidin	Sigma
Bisacrylamidlösung 2% (Rotiphorese Gel B)	Roth
Borat (Natriumsalz)	Roth
Borsäure	Roth
Bradford-Reagenzlösung	BioRad
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranosid (X-Gal)	Peqlab
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Peqlab
Bromphenolblau	Sigma
n-Butanol	Merck
BSA acetyliert (20 mg/ml Lösung)	Roche
Calciumchlorid	Merck
Camptothecin	Sigma
Carbenicillin	Roche
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Merck
Citronensäure	Merck
Citronensäuremonohydrat	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
Deoxycholat	Sigma
Deoxyribonukleosidtriphosphate	APB
Dichlordimethylsilan	Merck
Dimethylformamid	Merck
Dimethylpimelimidat	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DMEM-Medium (high glucose)	Gibco BRL
Einzelstrang-DNA-Agarose	Sigma
Eisessig	Merck
Ethanol	Riedel-de Haën
Ethanolamin	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	Merck
Ethylenglycol	Serva
Etoposid	Sigma
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Systems
Ficoll	Biochrom
Freund's Adjuvans, komplett, F-5881	Sigma
Formamid	Merck
G418 (Geneticin)	PAA Laboratories

---

Gelatine 2% Suspension für Zellkultur (G1393)	Sigma
„Glivec“ (STI571 Abl-Inhibitor)	Novartis
Glukose	Merck
Glutathion	Sigma
L-Glutaminlösung (200 mM)	Gibco BRL
Glycerin	Roth
β-Glycerophosphat	Sigma
Glycin	Roth
Guanidiniumhydrochlorid	Merck
H8	Sigma
Harnstoff	Roth
HAT Media Supplement (50x), H-0262	Sigma
HEPES	Biomol
Hexadecyltriammoniumbromid (CTAB)	Sigma
HT Media Supplement (50x), H-0137	Sigma
Hygromycin B	PAA Laboratories
Igepal CA630 (früher NP-40)	Sigma
Imidazol	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roche
Joklik-Medium (Fests substanz)	Gibco BRL
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kanamycin	Roche
Latrunculin B	Calbiochem
N-Laurylsarcosin	Sigma
Leupeptin	Roche
Lithiumchlorid	Sigma
Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH (Radolfzell, D)
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Manganchlorid	Merck
MDE gel solution	Serva (AT Biochem)
Methanol	Roth
Methothrexat	Calbiochem
N,N'-Methylenbisacrylamid	BioRad
β-Mercaptoethanol	Sigma
Mimosin	Sigma
Mineralöl für die PCR	Sigma
MOPS	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumfluorid	Sigma
Natriumhydrogencarbonat (Bicarbonat)	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck

Natriumhydroxid	Merck
Natriummolybdat	Sigma
Natrium-ortho-vanadat	Sigma
Natriumpyruvat (100x) MEM 100MM	Gibco BRL
Nickelsulfat	Merck
Nitroblautetrazolium (NBT)	Peqlab
Nocodazol	Sigma
Non essential amino acids MEM (100X)	Gibco BRL
OMG (3'-O-Methylguanosin)	APB
ONPG (ortho-Nitro-phenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid)	Sigma
Penicillin-/Streptomycinlösung 100X	Biochrom
Pepstatin A	Roche
o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid Tabletten, 60mg pro Tablette, P-1063	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Biomol
Phenol (saure Lösung)	Roth
Phenol (TE-gesättigte Lösung)	Roth
Phorbolmyristylester (PMA)	Sigma
Phosphorsäure	Merck
PIPES	Biomol
Poly(dAdT)	Sigma
Poly(dGdC)	Sigma
Poly(dIdC)	Sigma
Polyethylenglycol 1500, steril	Roche
Polyethylenglycol 4000 (PEG-4000)	Clontech
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Ribonukleaseinhibitor	Stratagen
Ribonukleosidtriphosphate	APB
Rinderserumalbumin Fraktion V	Sigma
Roti-Phenol/Chloroformlösung (TE-gesättigt)	Roth
RPMI 1640-Medium	Gibco BRL
Rubidiumchlorid	Merck
Saccharose	Merck
Salzsäure (37%)	Merck
Salycilat	Sigma
Tetracyclin	Roche
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva
Tetranatriumpyrophosphat	Sigma
Tosyl-phenylalanyl-chloromethyl-Keton (TPCK)	Sigma
Trichloressigsäure	Fluka
Tricin	Roth
Trifluoressigsäure	Fluka
Triton-X100	Sigma
Trishydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Sigma
Trypsininhibitor	Sigma
Wasserstoffperoxid 30%, Perhydrol	Merck
Xylenyanol	Sigma
Yeast total RNA	Serva
Zinkchlorid	Merck

## 2.4. Radiochemikalien

$\alpha$ -(32-P)-CTP	APB
$\alpha$ -(32-P)-dCTP	APB
$\alpha$ -(32-P)-dATP	APB
$\alpha$ -(32-P)-UTP	APB
$\gamma$ -(32-P)-ATP	APB
(14-C)-Acetyl-CoA	APB

## 2.5. Lösungen, Puffer und Kulturmedien

### 2.5.1. Lösungen und Puffer

<b>10 x TBE:</b>	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA, pH 8.0	<b>20 x PBS:</b>	160 g NaCl 4 g KCl 23 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O ad 1000 ml pH 7.2 –7.4
<b>10 x TGS:</b>	250 mM Tris 1.92 M Glycin 1 % (w/v) SDS	<b>20 x SSC:</b>	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat, pH 7.0 mit HCl
<b>10 x M9:</b>	39 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 30 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 g NH <sub>4</sub> Cl H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	<b>TE:</b>	10 mM Tris-HCl, pH 7.5 1 mM EDTA, pH 8.0
<b>20 x SSPE:</b>	3 M KCl 200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM EDTA, pH 8.0 mit 10 M NaOH, pH 7.4	<b>10 x TAE:</b>	48.4 g Tris 11.4 ml Essigsäure 10 mM EDTA, pH 8.0
<b>BC-Puffer:</b>	20 mM Tris-HCl, pH 7.3 0.2 mM EDTA, pH 8.0 0 – 2000 mM KCl 20 % (v/v) Glycerin	<b>HEGN-Puffer:</b>	25 mM HEPES-KOH, pH 7.6 0.2 mM EDTA, pH 8.0 0 – 2000 mM KCl 10 % (v/v) Glycerin 0.1 % (v/v) Igepal CA630

### 2.5.2. Medien

<b>LB-Medium (low salt):</b>	1 % (w/v) Bacto Trypton 0.5 % (w/v) Bacto Yeast Extract 0.5 % (w/v) NaCl mit NaOH auf pH 7.5 einstellen für Festmedium wurden 1.5 % (w/v) Bacto-Agar zugegeben	<b>TBG-Medium:</b>	10.0 g Trypton 5.0 g NaCl H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
------------------------------	---	--------------------	---

<b>LB-Medium (high salt):</b> 1 % (w/v) Bacto Trypton	<b>2x YT-Medium:</b> 16.0 g Bacto-Trypton
0.5 % (w/v) Bacto Yeast Extract	10.0 g Yeast Extract
1.0 % (w/v) NaCl	5.0 g NaCl
mit NaOH auf pH 7.5 einstellen	pH 7.5 mit NaOH
<b>TBG-M9-Medium:</b> 440 ml TBG	<b>TB-Medium:</b> 16 g Bacto Trypton
50 ml 10 x M9	24 g Bacto Yeast Extract
0.5 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> (sterilfiltr.)	4 ml Glycerin
10 ml 20% (w/v) Glucose (sterilfiltr.)	H <sub>2</sub> O ad 900 ml
	2.31 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	12.54 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	H <sub>2</sub> O ad 100 ml
	beide Lösungen getrennt auto-
	klavieren und nach dem
	Abkühlen vereinigen

### 2.5.3. Antibiotikastammlösungen

**Ampicillin 1000x:** 100 mg/ml in H<sub>2</sub>O, steril filtrieren, bei -20° C lagern  
**Carbenicillin 1000x:** 50 mg/ml in Ethanol, steril filtrieren, bei 4° C lagern  
**Chloramphenicol 1000x:** 34 mg/ml in Ethanol, steril filtrieren, bei -20° C lagern  
**G418 (Geneticin) 100x:** 100 mg/ml in sterilem 1x PBS, bei -20° C lagern  
**Hygromycin B 100x:** 100 mg/ml in sterilem 1x PBS, bei -20° C lagern  
**Kanamycin 1000x:** 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O, steril filtrieren, bei -20° C lagern  
**Tetracyclin 1000x:** 20 mg/ml in 50% Ethanol (in H<sub>2</sub>O), steril filtrieren, bei -20° C lagern

## 2.6. Enzyme

AMV-Reverse-Transkriptase	USB
Calf intestine phosphatase (CIP, Alkalische Phosphatase)	MBI Fermentas
Casein-Kinase II	Roche
DNA-Polymerase I (Kleenow-Fragment)	MBI Fermentas
λ-Protein-Phosphatase	NEB
Lysozym	Sigma
Meerrettich-Peroxidase-Avidin D	Vector Laboratories Inc, CA, USA
M-MuLV-Reverse-Transkriptase	Promega
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagen
Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
	NEB
RNase A	Roche
RNase T1	Roche
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas

T4-Polynukleotidkinase  
 Topoisomerase I (calf thymus)  
 Vent-DNA-Polymerase

MBI Fermentas  
 Takara Bioscience, Japan  
 NEB

## 2.7. Oligodesoxyribonukleotide

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz (5'→3')
biosp1	Affinitätssäule	Biotin-GCG TGG CCT GGG CGG GAC TGG GCG GGC GGG CGG
sp1comp	Affinitätssäule	CCG CCC GCC CGC CCA GTC CCG CCC AGG
C-less1	PCR, "solid phase"	Biotin-CTC TCT CTC TAT TGA GAT AAT TTT ATG ATT
Seq.Primer-40	PCR, "solid phase"	GTT TTC CCA GTC ACG AC
PC4-22-127WT	PCR, <i>NdeI</i> -Schnittstelle	CAT ATG GAC AAA AAG TTA AAG AGG AAG AAG CAA GTT G
PC4mut23-28	PCR-Mutagenese <i>NdeI</i> -Schnittstelle	CAT ATG GAC GCG GCG TTA GCG AGG GCG AAG CAA GTT G
PC4mutVKK_novo	PCR-Mutagenese	AAA AAG CAA GTT GCT CCA GAA AAA CCT GCA GCG GCA CAA AAG
PC4mut23,29	PCR-Mutagenese <i>NdeI</i> -Schnittstelle	CAT ATG GAC GCA AAG TTA AAG AGG AAA GCG CAA GTT G
PC4mut24	PCR-Mutagenese <i>NdeI</i> -Schnittstelle	CAT ATG GAC AAA GAA TTA AAG AGG
PC4mut28	PCR-Mutagenese <i>NdeI</i> -Schnittstelle	CAT ATG GAC AAA AAG TTA AAG AGG GAA AAG CAA G
KK17 (PC4down)	PCR	GGA ATT CTC ACA GCT TTC TTA CTG CGT CAT CTA
crsp70_3*	PCR, <i>BamHI</i> -Schnittstelle	CGC GGA TCC TCA GTC CAA GCA GAC
crsp70_5*	PCR, <i>EcoRI</i> -Schnittstelle	GGG AAT TCC ATA TGA CAG CGG CTC CG
CRISP70_5IN	PCR	ATG ACA GCG GCT CCG GCG TCT CCG C
CRISP70_3IN	PCR	GCA GAC ATA AGG CAG AAT GTT CAA GCG CCC G
hMed7ab_5*	PCR, <i>NdeI</i> -Schnittstelle	ATA GGA TCC CAT ATG CCA CAG CAA GTG AGT GCA CTT CCA C
hMed7ab_3*	PCR, <i>BamHI</i> -Schnittstelle	CGC GGA TCC TCA TTT TAT ACT CCC AGG GCT CCT TAT TAA AAT ATC
hMed6_5*	PCR, <i>NdeI</i> -Schnittstelle	ATA GGA TCC CAT ATG GCG GCG GTG GAT ATC CGA GAC
hMed6_3*neu	PCR, <i>EcoRI</i> -Schnittstelle	CCG GAA TTC TCA AAA AAG AAT GGG CTC TTG AGC ATG
TRAP80_IN5*	PCR	ATG GGG TGC GTT CTG GGA AAG TTG
TRAP80_IN3*	PCR	TCA TAG TAG ACA AGG GCT AAG TGC AGA C
TRAP80pt1_up	PCR, <i>HindIII</i> - Schnittstelle	CCC AAG CTT ATG GGG TGC GTT CTG GGA AAG
TRAP80pt1_down	PCR, <i>XhoI</i> -Schnittstelle	CCG CTC GAG TCA GAA GTC TCT TTG TAG CTT GTT TTC

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz (5'→3')
5*-pep1_dkfz	PCR-Klonierung, 300 bp Produkt, PAQ cDNA	GAC GAA TAC CTT TCT CTC GTG G
3*-pep1_dkfz	PCR-Klonierung, 300 bp Produkt, PAQ cDNA	AGT TGC CGT AGA CAC GAC AGC
DG-NotI	PCR-Klonierung, Exons 1 und 2 von PAQ cDNA	ATA AGA ATG CGG CCG CGG GAA CAG GCA TGG
DG-Xho-1000	PCR-Klonierung, Exons 1 und 2 von PAQ cDNA	AAT CTC GAG CTT GCG CCT GTG ACA
DRIP77ptIIdown	PCR, XhoI-Schnittstelle	CTT TTG TTC GAT GTT TCT CTG AAG GAG CTC GCC
DRIP77ptIup	PCR, NotI-Schnittstelle	CAT GGC GTG ACG AGA GTG CGC CGG CGT AAG AAT A
DRIP77ptIIIdown	PCR, XhoI-Schnittstelle	CTC TGA AAG CCC AGG AGT TCG AGA GCT CGC C
DRIP77ptIIup	PCR, NotI-Schnittstelle	CTT GAC AGA CAA CTA GAA CAA AAG CGC CGG CGT AAG AAT A
DRIP77ptIIIdown	PCR, XhoI-Schnittstelle	CGT GAA TCG GGA ACA GAT GAT GAG CTC GCC
DRIP77ptIIIup	PCR, NotI-Schnittstelle	GAA CTC CTG GGC TTT CAG AGT ACG CCG GCG TAA GAA TA
rep9cassette_up1	Insertionskassette	CAC CAT GGA CTA CAA AGA CGA TGA CGA CAA GGG C
rep9cassette_up2	Insertionskassette	GGC CGC GGA TCC CTC GAG AGC GGC CAC CAC CAC CAC CAC TGA
rep9cassette_down1	Insertionskassette	GAT CTC AGT GGT GGT GGT GGT GGT GGC CGC TCT CGA GGG ATC CGC
rep9cassette_down2	Insertionskassette	GGC CGC CCT TGT CGT CAT CGT CTT TGT AGT CCA TGG TGG TAC
Gless_30	Primer-Extension, Vektoren mit G-freier Kassette	GAT GGA GGA AGG GTA TGG AGG
G-less new	Primer Extension, Vektoren mit G-freier Kassette	GAT TTG GGA AAT ATA GAA GAA GGA GAG
pGL2	Primer-Extension, pGL-Vektoren	CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA
pGL3	Primer-Extension, pGL-Vektoren	GCC TTA TGC AGT TGC TCT CCA G
mMp103ATG-EcoRI	PCR-Klonierung, Maus p103	CGA ATT CGA TGG TCC CCG GAT CCG AA
mMp103-930-XbaI	PCR-Klonierung, Maus p103	GCT CTA GAT CAC TCC ACA GCA TTC TGC GC
PC6_ndeI-up	PCR-Klonierung, humanes p103	GGA ATT CCA TAT GGT CCC CGG GTC CG
hp103-Ende-EcoRI	PCR-Klonierung, humanes p103	CGA ATT CTT ACT TCC CAG GAG CAC TTG
p103_5*_up	PCR-Klonierung, humanes p103	ATG GTC CCC GGG TCC GAG GGC

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz (5'→3')
p103hm6_down	PCR-Klonierung, humanes p103	GGA ACT GGA CCA TCC TTG AGT TCC G
pIZ_upper	Sequenzierungs-Primer für pIZV5His	CAG CAT CTG TTC GAA TTT AAA GCT TGG
GST-Sequenz- Primer	Sequenzierungs-Primer für pGEX-Vektoren (APB)	GCC TTT GCA GGG CTG GCA AGC
M13-Primer (Seq.-40)	Helikaseassay	GTT TTC CCA GTC ACG AC

**Tab. 6:** Verwendete Oligodesoxyribonukleotide. Die beschriebenen Oligodesoxyribonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) bzw. Dr. G. Arnold (Genzentrum der LMU, München) bezogen.

## 2.8. Plasmide

M13mp19(+)-strand-DNA	Gibco BRL
pUC19	Stratagen
pBluescript II KS+	Stratagen
pREP9	Invitrogen
pREP9der_cassette	Derivat von pREP9, diese Arbeit
pcDNA3.1	Invitrogen
pET11a	Novagen
pET11d	Novagen
pET16b	Novagen
pGSTpar3	(Sheffield <i>et al.</i> , 1999)
pMLIN4	(Stelzer <i>et al.</i> , 1994)
pHIV-WT	(Meisterernst <i>et al.</i> , 1991)
pMLC2AT	(Sawadogo und Roeder, 1985)
pMRG5	(Kretschmar <i>et al.</i> , 1994a)
pMLΔ53	(Meisterernst <i>et al.</i> , 1991)
pML5xGal	(Ge und Roeder, 1994a)
pGLCD45xGal	(Halle <i>et al.</i> , 1997)
pGLMRG5	(Ikeda <i>et al.</i> , 2002)
pIZV5His	Invitrogen
pGEX-4T	APB
pGEX-B	Derivat von pGEX-4T, M. Meisterernst
pDR2	Clontech
pTAdV	Clontech

## 2.9. Peptide

CPG (TFIIA $\alpha$ ):	H <sub>2</sub> N-CPQVIVIDSKLIQHMINASNM-OH	Dr. H. Stunnenberg, NL
CRSP70-IIS (aa 49-64):	AcO-EEETRLGKLINDVRKK(C)-OH	Advanced ChemTech, D
CRSP70-NC (aa 142-156):	AcO-DRLGSRKRRRGDQRDFG(C)-OH	Advanced ChemTech, D
HA-Peptid:	H <sub>2</sub> N-(M)YPYDVPDYA-OH	Roche
Flag-Peptid:	H <sub>2</sub> N-(M)DYKDDDDK-OH	Dr. G. Arnold, München
VCI/p103 (N-Terminus, DE99490):	H <sub>2</sub> N-MVPGSEGPARGSV(C)-OH	Eurogentec, Brüssel
PAQ (N-Terminus, DE99525):	H <sub>2</sub> N-MDVSQGQETDWRSTAF(C)-OH	Eurogentec, Brüssel

## 2.10. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> (Nal <sup>R</sup> ), <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argFU169</i> ), $\phi$ 80 $\delta$ <i>lac</i> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15	(Hanahan, 1985)
SURE	$\Delta$ ( <i>hsdRMS</i> , <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>sbcC201</i> , <i>umuC</i> , <i>uvrC</i> , Tn5 (Kan <sup>R</sup> ), <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15, Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]	Stratagen
MC1061	F <sup>-</sup> , <i>araD139</i> , DE( <i>araA-leu</i> )7697, DE( <i>codB-lacI</i> )3, <i>galK16</i> , <i>galE15</i> , LAM <sup>-</sup> , e14 <sup>-</sup> , <i>mcrA0</i> , <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>spoT1</i> , <i>mcrB9999</i> , <i>hsdR2</i>	(Casadaban und Cohen, 1980)
K802	<i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>hsdR2</i> ( $r_k^-$ , $m_k^-$ ), <i>lacY1</i> , <i>mcrA</i> <sup>-</sup> , <i>mcrB</i> <sup>-</sup> , <i>metB1</i> , <i>mrr</i> <sup>+</sup> , <i>supE44</i>	Clontech
AM1	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , F'[ <i>lac</i> <sup>q</sup> , <i>lac2</i> <sup>+</sup> , <i>proAB</i> <sup>+</sup> ], pcItsCRE3	Clontech
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> <sup>-</sup> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^-$ , $m_B^-$ ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , $\lambda$ (DE3)	(Studier und Moffatt, 1986)
BL21 (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> <sup>-</sup> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^-$ , $m_B^-$ ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , $\lambda$ (DE3), pLysS (Cm <sup>R</sup> )	(Studier und Moffatt, 1986)
BL21 (DE3) Codon Plus-RP	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> <sup>-</sup> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^-$ , $m_B^-$ ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , $\lambda$ (DE3), <i>endA</i> , Hte[ <i>argU</i> , <i>proL</i> , Cm <sup>R</sup> ]	Stratagen
C43 (DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> <sup>-</sup> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^-$ , $m_B^-$ ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , $\lambda$ (DE3), weitere noch nicht kartierte Mutationen (BL21-Derivat)	(Miroux und Walker, 1996)
BL21 (DE3) STAR XL1Blue	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> <sup>-</sup> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^-$ , $m_B^-$ ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , $\lambda$ (DE3), <i>rne131</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15, Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]	Invitrogen (Yang, 1992)

**Tab. 7:** Laborstämme von *Escherichia coli* (*E. coli*). Die Stämme DH5 $\alpha$ , SURE, MC1061 und XL1Blue eignen sich für Klonierungen, da der RecA-Rekombinationsweg und endogene Restriktionsenzyme ausgeschaltet sind. Außerdem erlauben die Stämme DH5 $\alpha$ , SURE und XL1Blue das „blue-white-screening“. *E. coli* K802 wird zur stabilen Vermehrung von  $\lambda$ -Vektoren verwendet (Herstellung und Amplifikation von Genbanken). Der Stamm AM1 dient zur *in-vivo*-Rekombination mittels Cre-Rekombinase. Die BL21-Derivate finden bei der heterologen Proteinexpression in *E. coli* Verwendung, insbesondere für Vektoren, die einen T7-Promotor aufweisen.

## 2.11. Eukaryontische Zelllinien

**HeLa-Zellen:** humanes Cervix-Karzinom

**Jurkat-J6-Zellen:** humane Leukämie T-Zell-Lymphoblasten

**SW13-Zellen:** humane Adenokarzinomzellen (adrenaler Cortex)

**F9-Zellen:** transformierte murine embryonale Stammzellen aus Testis

**XP-t3-Zellen:** transgene murine Fibroblastenzellen, die rekombinantes p89 (XPB) exprimieren (Winkler *et al.*, 1998)

**293T-Zellen:** transformierte primäre humane embryonale Nierenzellen

**12CA5-Zellen:** Maus-Hybridomazellen, die anti-HA-Antikörper sezernieren

**Δ8wq16.1-Zellen:** Maus-Hybridomazellen, die anti-CTD-Antikörper sezernieren

## 2.12. Antikörper

### Primärantikörper:

anti-poly(Q)	1F8	Maus	H.Th.M. Timmers, Utrecht
anti-PAQ	1H7	Ratte	E. Kremmer, München
anti-PAQ (N-T., DE99525)	SA7454	Kaninchen	Eurogentec, Brüssel
#	SA7453	Kaninchen	Eurogentec, Brüssel
anti-PAQ	6C9	Ratte	E. Kremmer, München
anti-CBP (HAT)	6D6	Ratte	E. Kremmer, München
#	1C8	Ratte	E. Kremmer, München
anti-hMed7	3E12	Ratte	E. Kremmer, München
#	1G1	Ratte	E. Kremmer, München
#	2A6	Ratte	E. Kremmer, München
anti-TP (LMP1)	14B7	Ratte	E. Kremmer, München
anti-HA	1F10	Ratte	E. Kremmer, München
anti-HA	12CA5	Maus	Eigenproduktion
anti-NC2 $\alpha$	4G7	Ratte	E. Kremmer, München
anti-NC2 $\alpha$	6G8	Ratte	E. Kremmer, München
anti-CTD	Δ8wq16.1	Maus	Eigenproduktion
anti-GST	6G9	Ratte	E. Kremmer, München
anti-CPG	6B4	Ratte	E. Kremmer, München
#	3A2	Ratte	E. Kremmer, München
#	7G7	Ratte	E. Kremmer, München
#	1D5	Ratte	E. Kremmer, München
anti-VCI/p103	9C2	Ratte	E. Kremmer, München
anti-VCI/p103 (N-T., DE99490)	SA7387	Kaninchen	Eurogentec, Brüssel
#	SA7493	Kaninchen	Eurogentec, Brüssel
anti-hRPB1	sc-899 (N-20)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.
anti-CTD (Phospho-Ser2-Epitop)	H5 (IgM)	Maus	HISS-Diagnostics/Babco
anti-CTD (Phospho-Ser5-Epitop)	H14 (IgM)	Maus	HISS-Diagnostics/Babco
anti-Brm	sc-6450 (N19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-Brg1	sc-8749 (N-15)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
#	sc-10768 (H88)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.
anti-BAF170	sc-9744 (C-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-Ini1	sc-9749 (N-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-PCAF	sc-8999 (H-369)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.

anti-TRRAP	sc-5405 (T-17)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-ING1	sc-7566 (C-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-hGcn5	2GC-2C11	Maus	Dr. L. Tora, Illkirch-Strasbourg
anti-hSpt3	1SP-2C10	Maus	Dr. L. Tora, Illkirch-Strasbourg
anti-SAP130	1YO-1B10	Maus	Dr. L. Tora, Illkirch-Strasbourg
anti-p300	cs-584 (N-15)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.
anti-TRAP100		Kaninchen	Dr. R. G. Roeder, New York
anti-TRAP95	sc-5366 (N-16)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-TRAP150 $\alpha$	sc-5378 (N-18)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-TRAP220	sc-8998 (M-255)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.
anti-TRAP240	sc-5369 (Y-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-CRSP77	sc-9428 (S-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-CRSP70	sc-9426 (T-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-DRIP130		Kaninchen	Dr. L. P. Freedman, New York
anti-DRIP150		Kaninchen	Dr. L. P. Freedman, New York
anti-hMed6	sc-9433 (E-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-Cdk8	sc-1521 (C-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-Cyclin C	sc-1061 (T-19)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.
anti-PC1/PC4		Kaninchen	Eigenproduktion
anti-TAF <sub>II</sub> 30	6TA-2B11	Maus	Dr. L. Tora, Illkirch-Strasbourg
anti-TAF <sub>II</sub> 80	25TA	Maus	Dr. L. Tora, Illkirch-Strasbourg
anti-TAF <sub>II</sub> 100	12TA-2D2	Maus	Dr. L. Tora, Illkirch-Strasbourg
#	1TA-1C2	Maus	Dr. L. Tora, Illkirch-Strasbourg
anti-TBP		Kaninchen	Dr. R. G. Roeder, New York
#	sc-421 (58C9)	Maus	Santa Cruz Biotechnol.
anti-Cdk9 (Pitarle)	sc-7331 (L-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-hSpt16	sc-5915 (C-21)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.
anti-RAP74	sc-234 (N-16)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.
anti-TFII $\alpha$	sc-237 (C-17)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.
anti-TFIIB	sc-225 (C-17)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.
anti-Cdk7	sc-529 (C-19)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.
anti-Cyclin H	sc-855 (FL323)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.
anti-XPB (p89)	sc-293 (S-19)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.
anti-TFIIH (p62)		Kaninchen	Eigenproduktion
anti-Topoisomerase II	(Ab-1)	Maus	Calbiochem
#	RB-117-P1 (Ab-1)	Kaninchen	NeoMarkers, Fremont-CA/USA
anti-CALIF	#8441	Kaninchen	H.Th.M. Timmers, Utrecht
anti-p52	#N462	Kaninchen	Dr. H. Ge, Bethesta
anti-Snf-2L		Kaninchen	Dr. R. G. Roeder, New York
anti-HIRA	C190 A FB	Kaninchen	Dr. P. Scambler, London
anti-Flag	M2	Maus	Sigma

### Sekundärantikörper:

Maus <i>anti-Ratte</i> IgG-L kappa (TIB172, RG7/7.6.HL)	nicht konjugiert	E. Kremmer, München
Esel <i>anti-Ziege</i> IgG (sc-2022)	HRP-Konjugat	Santa Cruz Biotechnol.
Esel <i>anti-Ziege</i> IgG (sc-2022)	AP-Konjugat	Santa Cruz Biotechnol.
Ziege <i>anti-Maus</i> IgG H+L (S3721)	AP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Kaninchen</i> IgG Fc (S3731)	AP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Ratte</i> IgG H+L (S3831)	AP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Kaninchen</i> IgG H+L (W4011)	HRP-Konjugat	Promega

Ziege <i>anti-Maus</i> IgG H+L (W4021)	HRP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Ratte</i> IgG u. IgM H+L (112-035-068)	HRP-Konjugat	Dianova (Jackson Labs.)
Esel <i>anti-Ziege</i> IgG H+L (705-035-147)	HRP-Konjugat	Dianova (Jackson Labs.)

**Monoklonale Antikörper zur Determination der IgG-Subklasse:**

Maus <i>anti-Ratte</i> IgG2c	nicht konjugiert	Sigma Immunochem.
Maus <i>anti-Ratte</i> IgM	Biotinyliert	Zymed
Maus <i>anti-Ratte</i> IgG-L kappa (TIB172, RG7/7.6.HL)	Biotinyliert	E. Kremmer, München
Maus <i>anti-Ratte</i> IgG1 Fc' (TIB170, RG11/39.4)	Biotinyliert	E. Kremmer, München
Maus <i>anti-Ratte</i> IgG2a Fc' (TIB173, RG7/1.30)	Biotinyliert	E. Kremmer, München
Maus <i>anti-Ratte</i> IgG2b Fc' (TIB174, RG7/11.1)	Biotinyliert	E. Kremmer, München

## 2.13. Längenstandards

### 2.13.1. DNA-Längenstandards

- 1 kb DNA-Leiter (GeneRuler), MBI Fermentas  
Fragmentlängen in bp: 10 000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250
- 1 kb DNA-Leiter, Gibco BRL  
Fragmentlängen in bp: 12 216, 11 198, 10 180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506, 517, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75
- 100 bp DNA-Leiter (GeneRuler), MBI Fermentas  
Fragmentlängen in bp: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

### 2.13.2. Protein-Längenstandards

- SDS-PAGE Protein-Standard, niedriger Bereich, BioRad
- SDS-PAGE Protein-Standard, hoher Bereich, BioRad

Protein	Molekulargewicht (Da)	Protein-Standard (niedriger Bereich)	Protein-Standard (hoher Bereich)
Myosin	200 000		X
β-Galaktosidase	116 250		X
Phosphorylase B	97 400	X	X
Serum Albumin	66 200	X	X
Ovalbumin	45 000	X	X
Carboanhydrase	31 000	X	
Trypsininhibitor	21 500	X	
Lysozym	14 400	X	

## 3. Methoden

---

### 3.1. Prokaryontische Zellkultur

#### 3.1.1. Anzucht von Bakterienkulturen

Alle Arbeiten mit Bakterien werden unter einer sterilen Werkbank oder direkt neben einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. Kunststoffgeräte wie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen werden autoklaviert. Glaswaren werden bei 180° C für 3 h trocken autoklaviert. Platinösen werden in offener Flamme durch Ausglühen sterilisiert, andere hitzebeständige Geräte oder Gefäße durch kurzes Abflammen keimfrei gemacht. Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgt in sterilen Plastikreagenzgefäßen. *Escherichia coli* wird in Flüssigkultur unter guter Belüftung bei 37° C im Schüttler inkubiert; dies erfolgt entweder in LB-Medium oder in einem mit einem Antibiotikum versetzten LB-Medium.

Auf Festmedien wird *E. coli* mit einer sterilen Platinöse im Verdünnungsausstrich überimpft und bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

#### 3.1.2. Dauerkulturen

Für Dauerkulturen von *E. coli* werden 713 µl einer stationär gewachsenen Übernachtskultur mit 287 µl sterilem, 87%igem (v/v) Glycerin vermischt und in 2 ml Nunc-Reaktionsgefäßen (mit Schraubdeckel) bei -80° C eingefroren.

### 3.2. Eukaryontische Zellkultur

#### 3.2.1. Zellvermehrung eukaryontischer Zelllinien

Alle Arbeiten werden unter Laminarfluß mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, autoklavierten Glaswaren und mit vom Hersteller entkeimten Kunststoffmaterialien sowie Nährmedien durchgeführt. Das FCS wird vor Gebrauch zur Inaktivierung des Komplementsystems 30 min bei 55° C im Wasserbad inkubiert. Jurkat J6 Zellen werden in RPMI 1640-Medium gehalten, welches mit 10 % FCS (v/v), 1000 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin supplementiert wird. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Haltung erfolgt in horizontal gelagerten Zellkulturflaschen oder Spinnergefäßen auf Magnetrührern.

Die Zellen wurden jeden Tag auf eine Zelldichte von  $2.5-3.0 \times 10^5$  Zellen/ml (bei Spinnerkulturen auch  $5.0 \times 10^5$  Zellen/ml) verdünnt. Bei logarithmischem Wachstum verdoppelt sich die Zelldichte bei  $37^\circ\text{C}$  in ca. 20 h. Suspensionszellen sollten bei Kultur in Plastikflaschen eine Dichte von  $6.0 \times 10^5$  Zellen/ml, bei Haltung in Spinnergefäßen eine Zelldichte von  $1.0 \times 10^6$  Zellen/ml nicht überschreiten. In einer Neubauer-Zählkammer wurden unter dem Lichtmikroskop die Zellen gezählt. Die Zellkultur von HeLa-Zellen erfolgt identisch. Stabile transgene Zelllinien werden bei einer finalen Antibiotikakonzentration von  $200 \mu\text{g/ml}$  (G418 bzw. Hygromycin B) gehalten.

Die Zellvermehrung der adhärennten 293T-Zellen erfolgt in DMEM-Medium (*“high glucose”*), welches mit 10 % FCS (v/v), 1000 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin supplementiert wird. Die Zellen dichtgewachsener Platten (70-90 % Konfluenz) werden 1:4 verdünnt. Dazu wird das Medium von der Kulturschale abgezogen, die Zellen mit sterilem 1x PBS gewaschen, 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung auf der Schale verteilt und diese 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die dadurch von der Oberfläche der Schale abgelösten Zellen werden auf 4 Schalen verteilt und neues Medium zugegeben (7 ml Medium für 6 cm Ø Schalen, 15 ml Medium für 10 cm Ø Schalen, 24 ml Medium für 14 cm Ø Schalen).

F9-Zellen und SW13-Zellen werden identisch kultiviert, wobei konfluente SW13-Zellen maximal 1:10 verdünnt werden können.

XP-t3-Zellen werden wie beschrieben gezogen (Winkler *et al.*, 1998).

Die Hybridomazelllinien 12CA5 und  $\Delta 8\text{wq}16.1$  werden in HT-Medium (Abschn. 3.14.3.) kultiviert.

Sollen Kulturschalen mit Gelatine beschichtet werden, gibt man 0.2 % (v/v) endotoxinfreie Gelatine in 1x PBS zu, inkubiert für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$ , nimmt den Überstand ab, und läßt die Kulturschalen unter Laminarfluß in der Sicherheitswerkbank trocknen.

Eine Stimulation von Zellen mit PMA wurde durch eine 1:10000 Verdünnung einer PMA-Stammlösung in DMSO auf eine Endkonzentration von  $10 \text{ ng/ml}$  Kulturmedium durchgeführt.

Alle kontaminierten Einwegmaterialien werden autoklaviert und dann dem Abfall zugeführt. Mediumreste wurden durch Hypochlorid-Lösung sterilisiert bzw. autoklaviert.

### 3.2.2. Anlegen von Dauerkulturen

Für Dauerkulturen eukaryontischer Zellen wird eine logarithmisch wachsende Suspensionskultur abzentrifugiert (Heraeus, 1000 rpm, 5 min). Es werden je  $2 \times 10^7$  Zellen mit 1 ml eiskaltem Freeze-Medium aufgenommen, und in 2 ml Nunc-Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckeln gut wärmeisoliert 48 h bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Endgültig gelagert werden die Aliquots in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen werden die Zellen rasch auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt, mit 10 ml komplettem Medium vermischt, abzentrifugiert (Heraeus, 1500 rpm, 5 min), und in

40 ml neuem Medium resuspendiert. Adhärenz wachsende Zellen (70-90% Konfluenz; 14 cm Ø Schale) werden durch Trypsin-EDTA-Behandlung (siehe oben) abgelöst, für 3 min bei 1000 rpm (Heraeus Multifuge 3 L-R) zentrifugiert, einmal mit 1x PBS gewaschen, in 1 ml eiskaltem Freeze-Medium aufgenommen, und wie beschrieben kryokonserviert.

**Freeze-Medium:** 45 % (v/v) RPMI- bzw. DMEM-Medium  
45% (v/v) FCS  
10% (v/v) DMSO

### 3.3. Transformation von DNA

#### 3.3.1. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*

Der Bakterienstamm wird auf einer LB-Platte ausgestrichen, die gegebenenfalls mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt ist, und ÜN bei 37° C bebrütet. Eine einzelne Kolonie wird in 20 ml TYM bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.2 – 0.8 vermehrt. Die Suspension wird auf 100 ml TYM verdünnt und in einem 1 l-Kolben bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 gezogen. Anschließend wird mit TYM-Medium auf 500 ml aufgefüllt, und abermals bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 inkubiert. Nun wird durch sanftes Schütteln des Kolbens in einem Eis/Kochsalzbad rasch auf 0° C heruntergekühlt, bei 4000 U/min und 0° C im GSA-Rotor 10 min zentrifugiert und das Sediment vorsichtig in kaltem (4° C) 100 ml TfBI suspendiert. Danach wird wie oben, jedoch nur 8 min, abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Sediment durch vorsichtiges Schütteln auf Eis in 20 ml kaltem (4° C) TfBII suspendiert. Schließlich werden 0.1 ml Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

**TYM-Medium:** 2% (w/v) Bactotrypton  
0,5% (w/v) Hefeextrakt  
100 mM NaCl  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

**TfBI:** 30 mM Kaliumacetat  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
100 mM NaCl  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

**TfBII:** 10 mM MOPS pH 7,0  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM KCl  
10 % (v/v) Glycerin

**MgSO<sub>4</sub>-Stammlösung:** 1 M, steril filtrieren; wird dem TYM-Medium erst nach dem Autoklavieren zugefügt

**MnCl<sub>2</sub>-Stammlösung:** 1 M, steril filtrieren; wird dem TfBI-Puffer erst nach dem Autoklavieren zugefügt

### 3.3.2. Transformation nach Hanahan *et al.*

Zur Transformation von Ligationsansätzen wurde das Protokoll von (Hanahan *et al.*, 1991) verwendet. 100 µl einer kompetenten *E. coli* Suspension werden auf Eis aufgetaut und 20 - 50 µl eines mit TE 1:5 verdünnten, Hitze-behandelten (65° C, 10 min) Ligationsansatzes vorsichtig zugemischt. Der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert, 30 sec auf 42° C erwärmt, erneut 2 min auf Eis gestellt und schließlich mit 0.9 ml vorgewärmten SOC-Medium vermischt und 60 min bei 37° C geschüttelt. Je nach eingesetzter DNA-Menge werden 50 µl bis 1000 µl Aliquots auf LB-Agarplatten mit Zusatz von Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

**SOC-Medium:**            20 % (w/v) Bacto-Trypton  
                              5 % (w/v) Hefeextrakt  
                              0.5 % (w/v) NaCl  
                              10 ml 250 mM KCl  
                              ad 1000 ml H<sub>2</sub>O (bidest.)  
                              zu 1 ml autoklaviertem Medium werden vor Gebrauch  
                              5 µl einer sterilen 2 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung und 20 µl einer  
                              sterilen 1 M Glucoselösung zugegeben.

### 3.3.3. Transformation nach Pope *et al.*

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurde das zeitsparende Protokoll von (Pope und Kent, 1996) verwendet. Dazu werden 1 µg Plasmid-DNA vorsichtig zu 100 µl einer Suspension kompetenter *E. coli* gegeben, und der Ansatz für 5 – 10 min auf Eis inkubiert. 50 µl der Suspension werden schließlich auf vorgewärmten (37° C) LB-Agarplatten mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

## 3.4. Transfektion von DNA und Analyse der Genexpression mittels transienter Reporter

### 3.4.1. Transfektion mittels Calciumphosphat

Adhärente Zellen wurden durch eine Calciumphosphat vermittelte Methode transfiziert. Calciumphosphat und DNA bilden in geeigneten Verhältnissen Copräzipitate, welche von den Zellen besser aufgenommen werden als nackte DNA.

Zwischen 70 und 90 % konfluente Zellen werden am Vortag der Transfektion 1:4 verdünnt. Als Faustregel gilt: eine 15 cm Ø Schale mit 70 – 90 % konfluenten Zellen (ca.  $1.0 - 1.5 \times 10^7$  Zellen) wird auf 20, 6 cm Ø Schalen, verteilt. Für die Transfektion einer 6 cm Ø Schale (ca. 40 % Konfluenz) wurde 1 µg Reporter-Plasmid und zwischen 50 und 100 ng Expressionsplasmid verwendet. Die DNA wird mit 250 µl einer 250 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung vermischt. 250 µl des Puffers A wird in ein 15 ml Falconröhrchen vorgelegt. Unter Vortex wird die DNA/CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugetropft, 20 min bei RT inkubiert und anschließend 5 ml DMEM-Medium/10% FCS zugegeben. Das Medium der am Vortag verdünnten Schale wird nun abgezogen und das vorbereitete Medium/DNA Gemisch auf die Platte gegeben. Alternativ kann die präzipitierte DNA auch direkt auf die Zellen, die mit frischem Medium versorgt wurden, getropft werden. Nach 12 h Inkubation bei 37° C wird das Medium abgezogen und 7 ml frisches DMEM-Medium/10% FCS zugegeben. Anschließend werden die Zellen für weitere 34 h bei 37° C inkubiert.

**Puffer A:** 280 mM NaCl  
50 mM Hepes  
1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
Der Puffer wird mit 5N NaOH auf pH 7.05 eingestellt,  
aliquotiert und bei -20°C eingefroren

### 3.4.2. Elektroporation

Unter den zahlreichen beschriebenen Methoden zur Transfektion menschlicher Tumorzelllinien hat sich die Elektroporation, besonders für empfindliche Zellen wie Jurkat Zellen, als sehr wirkungsvoll herausgestellt. Auch HeLa Zellen werden mit dieser Methode effektiv transfiziert.

Am Vortag der Elektroporation werden die Zellen mit neuem Medium versorgt und auf eine Dichte von  $3.5 \times 10^5$  Zellen/ml gebracht. Am Tag der Transfektion wird die Zelldichte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt, und damit das logarithmische Wachstum überprüft. Nur bei optimalem Wachstum (Verdopplungszeit ca. 20h) ist eine Elektroporation erfolgreich. Die Zellen werden zunächst für 5 min bei 1000 rpm und RT abzentrifugiert, einmal in 1x PBS-Puffer resuspendiert und wieder unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Dann werden die Jurkat Zellen zu einer Dichte von  $3.5 \times 10^7$  Zellen/ml (HeLa Zellen  $1.5 \times 10^7$  Zellen/ml) in RPMI 1640-Medium (ohne Serum) aufgenommen. Die zu transfizierende Plasmid-DNA sollte eine Konzentration von ca. 1 mg/ml haben, um nur kleine Volumen an DNA-Lösung verwenden zu müssen. Die Standardmenge des transfizierten Reporter-Plasmids betrug 10 µg. Sollte ein Protein überexprimiert werden, wurde zwischen 0.1 und 10 µg Expressionsplasmid cotransfiziert. Die Gesamtmenge an transfizierter DNA wurde zwischen verschiedenen Ansätzen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid ohne

Insert ausgeglichen. Jedem Ansatz wurde 1  $\mu\text{g}$  des Expressionsplasmids pRc/CMV- $\beta$ -Galactosidase zugegeben, um die Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Ansätzen abgleichen zu können. Die DNA-Lösung wird in der sterilen Elektroporationsküvette (4 mm) vorgelegt, anschließend 0.4 ml der  $3.5 \times 10^7$  Zellen/ml enthaltenden Jurkat Zell-Suspension (bzw. 0.4 ml der  $1.5 \times 10^7$  Zellen/ml enthaltenden HeLa Zell-Suspension) zugegeben und mit der DNA-Lösung vermischt. Es werden also  $1.4 \times 10^7$  Jurkat Zellen (bzw.  $6 \times 10^6$  HeLa Zellen) pro Ansatz transfiziert.

Nach 15 min Inkubation bei RT wird die Küvette in die Elektroporationsapparatur eingesteckt und ein Puls appliziert. Für Jurkat J6 Zellen erwiesen sich 960  $\mu\text{F}$  und 250 V (Zeitkonstante  $30 \pm 3$ ) als diejenigen Parameter bei denen die größte Reporterogenaktivität gemessen wurde. HeLa Zellen wurden unter gleichen Bedingungen elektroporiert. Nach der Elektroporation werden die Zellen für 15 min bei RT in der Küvette belassen, anschließend in 10 ml 10% FCS enthaltendes RPMI 1640-Medium gegeben und für 48 h im Zellinkubator inkubiert.

### 3.4.3. Auswertung der Transfektion

44-48 h nach der Transfektion werden die Transfektionen ausgewertet. Die Zellen werden dafür nach Absaugen des Mediums durch Zugabe von 1x PBS/0.5 mM EDTA und 15 min Inkubation von der Platte abgelöst. Die Zellen werden für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert, einmal mit 1x PBS-Puffer gewaschen und wieder abzentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wird in 150  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer aufgenommen, einmal kurz im Vortex resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das Lysat im Eppendorfgefäß für 2 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. 40  $\mu\text{l}$  dieses cytoplasmatischen Proteinextraktes werden in ein Lumineszenzmessröhrchen gegeben und dieses in die Halterung des Lumineszenzmessgerätes eingesteckt. Nach automatischer Einspritzung von 100  $\mu\text{l}$  Luciferase-Assay Reagenz wird für 10 sec das bei der enzymatischen Umsetzung des Substrats emittierte Licht gemessen. Die Anzahl der gemessenen relativen Lichteinheiten ist dabei ein Maß für die Menge des in dem Proteinextrakt enthaltenem Enzyms Luciferase. Das in dieser Arbeit verwendete Reportergen kodiert für das in dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* vorkommende Enzym Luciferase, welches als primäres Translationsprodukt bereits das aktive Enzym repräsentiert.

Die durch Luciferase katalysierte Lumineszenzreaktion ist auf die Oxidation einer heteropolyzyklischen organischen Säure, und zwar des Käfer-Luciferins, zurückzuführen. In einer von ATP und Magnesium abhängigen Reaktion wird zunächst eine Acyl-AMP Zwischenstufe des Luciferins gebildet, die in Gegenwart von Sauerstoff zu Oxyluciferin oxydiert wird. Das angeregte Oxyluciferin fällt nachfolgend in den Grundzustand zurück, wobei ein Photon emittiert wird.

---

<b>Lysis-Puffer:</b>	25 mM Tris-phosphat, pH 7.8 2 mM DTT 2 mM 1,2-diaminocyclohexan-N,N',N'-tetraessigsäure 10 % (v/v) Glycerin 1 % (v/v) Triton X-100
<b>Luciferase-Assay Reagenz:</b>	20 mM Tricin 1.07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.67 mM $\text{MgSO}_4$ 0.1 mM EDTA 33.3 mM DTT 270 $\mu\text{M}$ Coenzym A 470 $\mu\text{M}$ Luciferin 530 $\mu\text{M}$ ATP

Die Messung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität der einzelnen Transfektionsansätze erfolgt nach einem Standardprotokoll (Sambrook *et al.*, 1989). 20  $\mu\text{l}$  des cytoplasmatischen Extraktes eines Transfektionsansatzes werden mit 200  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Galactosidase-Assay Reagenz vermischt und bei RT inkubiert, bis eine leichte Gelbfärbung zu sehen ist. Anschließend wird die Extinktion bei 420 nm gegenüber dem Leerwert bestimmt. Die Luciferase Aktivität eines Ansatzes wurde durch die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität dividiert. Damit werden unterschiedliche Transfektionseffizienzen der verschiedenen Ansätze abgeglichen. In Fällen, in denen die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität durch Cotransfektion eines Expressionsplasmids stark beeinflusst wurde, fand der Abgleich mit Hilfe der jeweiligen Proteinkonzentrationen der cytoplasmatischen Extrakte statt.

<b><math>\beta</math>-Galactosidase-Assay Reagenz:</b>	1.1 mM $\text{MgCl}_2$ 50 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 1 mg/ml ONPG 82 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 18 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
--	--

### 3.5. Etablierung transgener Säugerzelllinien

Eine transgene HeLa Zelllinie, die stabil ein Flag-PAQ-Fusionsprotein exprimiert, wurde mit Hilfe eines EBV-basierenden Vektors generiert. Eukaryontische Expressionsplasmide, die sich vom *Epstein-Barr*-Virus ableiten, integrieren nicht in das Genom der "Wirtszelle", sondern replizieren autonom-episomal, und werden bei der Zellteilung an beide Tochterzellen weitergegeben. Dieses System hat den Vorteil, daß in relativ kurzer Zeit eine polyklonale transgene Säugerzelllinie hergestellt werden kann.

Da das Plasmid nicht in das Genom integriert, treten auch keine „*gene silencing*“ Effekte durch eventuell benachbartes Heterochromatin bzw. Silencer auf (Abschn. 1.2.2.).

HeLa Zellen wurden wie beschrieben (Abschn. 3.4.2.) mit 10 µg pGM7 (pREP9-Vektor der das Protein Flag-PAQ exprimiert; G418<sup>R</sup>) elektroporiert, und für 2 Tage (10 ml RPMI-Medium/10 % FCS, ohne Antibiotikum) im Brutschrank inkubiert. Ein Kontrollansatz mit TE-Puffer wird ebenso behandelt. Am dritten Tag wird das Medium gewechselt, und 10 ml frisches RPMI-Medium/10 % FCS mit einer Endkonzentration des Antibiotikums G418 von 1 mg/ml zugegeben. Diese Prozedur wird nun über einen Zeitraum von ca. 2 Wochen wiederholt. Wenn alle Zellen aus dem Kontrollansatz (die ja keine G418-Resistenz aufweisen) abgestorben sind, wird die Antibiotikaendkonzentration im Medium auf 0.5 mg/ml reduziert, und die (polyklonale) Zelllinie auf 200 ml Kulturvolumen expandiert. Schließlich werden die Zellen in 1 ml Aliquots, wie beschrieben (Abschn. 3.2.2.) kryokonserviert. Nach Expansion der Kultur auf 1 l Medium werden die Zellen geerntet und auf Expression des Fusionsproteins nach Herstellung eines Kernextraktes (Abschn. 3.13.1.) im Western Blot (Abschn. 3.14.1.) analysiert.

## **3.6. Rekombinante DNA-Techniken und enzymatische Behandlung von DNA**

### **3.6.1. DNA-Restriktion**

Im allgemeinen werden 0.5 – 1.0 µg einer Plasmidpräparation in einem Volumen von 10 µl hydrolysiert. Die Ansätze enthalten den für das jeweilige Enzym optimalen Restriktionspuffer (entsprechend Herstellerangaben) und 2 – 10 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease. Die Reaktionen werden für 1 h bis 3 h bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur inkubiert. Soll eine Spaltung mit zwei verschiedenen Enzymen durchgeführt werden, kann ein Doppelverdau in einem Spaltungsansatz durchgeführt werden, sofern beide Restriktionsenzyme unter gleichen Pufferbedingungen aktiv sind. Ist dies nicht der Fall, wird die Nukleinsäure zunächst mit einem Enzym geschnitten, der Ansatz gereinigt (Abschn. 3.6.8.), und anschließend mit dem zweiten Enzym hydrolysiert.

### **3.6.2. Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA mittels „*Random-Hexamer-Priming*“ (Feinberg-Vogelstein-Technik)**

Diese Methode (Feinberg und Vogelstein, 1984) dient der Herstellung radioaktiv markierter DNA-Moleküle hoher spezifischer Aktivität.

Zufallshexanukleotide werden dazu an die Zielsequenz angelagert und der jeweils komplementäre Strang in Gegenwart radioaktiv markierter dNTPs durch das Kleenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* aufgefüllt.

Die zu markierende DNA wird als scharfe Bande aus einem Agarosegel ausgeschnitten und aus dem Gel gereinigt (Abschn. 3.6.10.). Anschließend werden 14 µl der gereinigten DNA (ca. 200 ng), 10 µl der Hexanukleotidmischung (100 mM) und 5 µl H<sub>2</sub>O (bidest.) zusammengegeben. Die Lösung wird für 5 min im Heizblock bei 95° C inkubiert und sogleich auf Eis abgekühlt. Dieser Schritt dient der Anlagerung der Hexanukleotide. Auf Eis werden nun 5 µl 10x Kleenow-Polymerase-Puffer, 4.5 µl H<sub>2</sub>O (bidest.) 0.5 µl GT-Nukleotidmix, 5 µl α-<sup>32</sup>P-dATP (3000 Ci/mmol), 5 µl α-<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol) und 1 µl Kleenow-Enzym (2 U) hinzugefügt. Der Ansatz wird für 15 min bei RT und 5 min bei 37° C inkubiert. Schließlich werden die nicht-inkorporierten Nukleotide sowie Protein durch Aufreinigung über MicroSpin G-25-Säulen beseitigt (Abschn. 3.7.3.).

### 3.6.3. „Annealing“ von Oligodesoxyribonukleotiden

Jeweils 100 pmol zueinander komplementärer Oligodesoxyribonukleotide werden in 40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 M NaCl in einem Volumen von 100 µl für 5 min bei 95° C inkubiert. Das Reaktionsgefäß wird in ein Wasserbad mit der Schmelztemperatur des entsprechenden Doppelstranges überführt und dort für weitere 10 min inkubiert. Schließlich erfolgt Abkühlung auf RT, indem der Thermostat des Wasserbades abgeschaltet wird.

### 3.6.4. Phosphorylierung von Oligodesoxyribonukleotiden und radioaktive Markierung am 5'-Ende

Oligodesoxyribonukleotide tragen synthesebedingt kein Phosphatrest an ihrem 5'-Ende. Einzel- oder doppelsträngige DNA wird mit T4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende der DNA markiert oder für die Ligation in dephosphorylierte Vektoren vorbereitet.

Für die Endmarkierung werden 5 - 10 pmol dephosphorylierter DNA mit 10 U T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl) in Gegenwart von 60 µCi (20 pmol) γ-<sup>32</sup>P-ATP (3000 Ci/mmol) in dem vom Hersteller mitgelieferten Kinase-Puffer 1 h bei 37° C in einem Volumen von 20 µl inkubiert. Das Enzym wird sukzessive in zwei Aliquots à 0.5 µl zugegeben, da es bei 37° C eine geringe Halbwertszeit besitzt. Anschließend wird die DNA vom restlichen ATP über Sephadex G-50 abgetrennt (Abschn. 3.7.3.). Wird DNA mit unmarkiertem ATP phosphoryliert, liegt die ATP-Konzentration bei 10 µM und es werden 0.5 U T4-Polynukleotidkinase pro pmol DNA-Fragment eingesetzt.

Die Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte bei 70° C für 10 min.

---

<b>10x Polynukleotidkinase-Puffer:</b>	500 mM Tris-HCl, pH 7.6 (bei 25° C)
	100 mM MgCl <sub>2</sub>
	50 mM DTT
	1 mM Spermidin
	1 mM EDTA, pH 8.0

### 3.6.5. Dephosphorylierung von geschnittener Vektor-DNA

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm entfernt in einem linearen, doppelsträngigen DNA-Molekül endständige 5'-Phosphatgruppen. Eine Entfernung von Phosphatresten wird durchgeführt, wenn bei Klonierungen die Religation eines Vektors durch die anschließende DNA-Ligase-Reaktion verhindert werden soll.

Es werden in einem Reaktionsansatz 0.2 U Enzym (1 U/μl) pro pmol DNA mit kohäsiven 5'-überhängenden Enden eingesetzt. Die Reaktion wird für 1 h bei 37° C im Reaktionspuffer durchgeführt. Das Enzym wird sukzessive in zwei Aliquots zupipettiert. Zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wird dann EDTA (pH 8.0) in einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben und 10 min auf 75° C erhitzt. Die DNA wird anschließend gereinigt (Abschn. 3.6.8.).

<b>10x Phosphatasepuffer:</b>	100 mM Tris-HCl, pH 7.5 bei 37° C
	100 mM MgCl <sub>2</sub>

### 3.6.6. Abbau bzw. Auffüllen überstehender Enden mit Kleenow-Fragment

Das Kleenow-Fragment ist die große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, der die 5'→3' Exonukleaseaktivität fehlt. In Gegenwart von Desoxyribonukleotiden füllt das Kleenow-Fragment 5'-überhängende DNA-Enden auf. Dazu werden in einem Volumen von 50 μl 0.1 bis 1 μg DNA, 5 μl 10x Kleenow-Polymerase Puffer, 100 μM dNTPs und 5 U Kleenow-Polymerase für 20 min bei RT inkubiert. Das Enzym wird anschließend für 20 min bei 75° C inaktiviert. Für die radioaktive Endmarkierung von Oligodesoxyribonukleotiden enthält die Reaktion: 10 pmol DNA, 2 μl 10 x Kleenow-Polymerase Puffer, 5 U Kleenow-Polymerase, 1 mM dNTPs, und 5 μl α-<sup>32</sup>P-dNTP (3000 Ci/mmol) in einem Gesamtvolumen von 20 μl. Die Reaktionen werden für 30 min bei RT inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgt über eine Sephadex G50-Säule (Abschn. 3.7.3.). Die radioaktiv markierten Oligodesoxyribonukleotide können bis zu 6 Wochen bei -20° C gelagert werden. Der Einbau des terminalen Nukleotids verläuft sehr ineffektiv (5 - 10%). Bei radioaktiven Markierungen sollten Nukleotide daher an der innersten Position, zumindest aber an der zweitäußersten Position eingebaut werden.

---

<b>10x Kleenow-Polymerase Puffer:</b>	500 mM Tris-HCl, pH 8.0 bei 25° C
	50 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM DTT

### 3.6.7. Ligation

Zunächst werden Aliquots der zu ligierenden DNA-Fragmente nebeneinander auf einem Agarosegel aufgetrennt, um die Mengenverhältnisse abschätzen zu können. Für die Ligation wird ein molares Verhältnis Fragment:Vektor von 3:1 bis 5:1 gewählt, wobei die Gesamtmenge an DNA zwischen 50 ng und 400 ng liegt. Vektor-DNA wird im allgemeinen vor der Ligationsreaktion an ihren Enden dephosphoryliert (Abschn. 3.6.5.), um eine Religation des Plasmides zu verhindern. Gilt es lediglich, einzelne DNA-Fragmente zu zirkularisieren, so wird in einem 50 µl Ansatz ligiert, während man bei dem Einsetzen von Fragmenten in Vektoren in einem Reaktionsvolumen von 20 µl arbeitet. Die Reaktion erfolgt 3 - 16 h bei 16° C, gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei 37° C.

<b>10 x Ligasepuffer:</b>	400 mM Tris-HCl, pH 7.8 bei 25° C
	100 mM MgCl <sub>2</sub>
	100 mM DTT
	5 mM ATP

#### 3.6.7.1. Ligation von überstehenden Enden

**Reaktionsansatz:**

10x Ligasepuffer:	2 µl
Vektor + Insert	x µl
T4-DNA-Ligase	2 U
H <sub>2</sub> O (bidest.)	ad 20 µl

#### 3.6.7.2. Ligation von glatten Enden

**Reaktionsansatz:**

10x Ligasepuffer:	2 µl
50 % (v/v) PEG 4000	2 µl
100 mM ATP	1 µl
Vektor + Insert	x µl
T4-DNA-Ligase	4 U
H <sub>2</sub> O (bidest.)	ad 20 µl

### 3.6.8. Reinigung von DNA nach enzymatischer Behandlung

Eine Abtrennung von niedermolekularen Verbindungen und Enzymen erfolgte entweder durch Chloroform-Extraktion (Abschn. 3.7.2.) oder mittels des GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (APB) nach Herstellerangaben.

### 3.6.9. Die Polymerasekettenreaktion („*polymerase chain reaction*“, PCR)

#### 3.6.9.1. Amplifizierung von DNA und PCR-Klonierung

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA, cDNA und bestimmter Bereiche aus genomischer DNA über die Polymerasekettenreaktion mit überstehenden Enden – die sogenannte „*Linker*“-PCR (Saiki *et al.*, 1988) - wurde die Taq-, die Pfu- oder die Vent-DNA-Polymerase verwendet. Die Primer sind dabei so gewählt, daß sie an ihrem 5'-Ende „*Linker*“ mit gewünschten Restriktionsendonuklease-Schnittstellen besitzen. Die „*Linker*“-Sequenzen hybridisieren dabei anfangs nicht mit der Matrize, sondern dienen dem Einführen von Restriktionsschnittstellen. Die Pfu- und die Vent-DNA-Polymerase besitzt eine 3'→5' „*Proofreading*“-Exonukleaseaktivität, die im Vergleich zur Taq-DNA-Polymerase zu einer zehnfach höheren Genauigkeit der DNA-Synthese führt. Die Polymerisationsgeschwindigkeit von Taq (ca. 1000 Nukleotide/min) ist allerdings höher als für die „*Proofreading*“-Polymerasen (500 Nukleotide/min). Ein weiterer Unterschied zur Taq-DNA-Polymerase, die grundsätzlich ein Desoxyadenosinribonukleotid an das 3'-Ende der PCR-Produkte „anhängt“, besteht darin, daß die Reaktionsprodukte generell glatte Enden besitzen. Bei „*Proofreading*“-DNA-Polymerasen ist es wichtig das Polymerisationszeitintervall nicht zu lange zu wählen, da aufgrund der 3'→5'-Exonukleaseaktivität sonst Primer und Amplicons abgebaut werden. Als Faustregel gilt, daß die Polymerisationszeit bei 72° C ca. 10 % über der berechneten Zeit veranschlagt werden sollte. Darüber hinaus ist es kritisch immer einen großen Überschuß an dNTPs in der PCR-Reaktion bereitzustellen (200 – 400 µM). Für Plasmid-DNA wurde Vent-DNA-Polymerase eingesetzt. Sollte daß Amplicon über TA-Klonierung in einen TA-Vektor (Ido und Hayami, 1997) eingesetzt werden, wurde dieses nochmals in einem Polymerisationsschritt mit Taq-DNA-Polymerase im Thermocycler unter erneuter Zugabe von dNTPs inkubiert. Zur Generierung von PCR-Produkten aus cDNA bzw. genomischer DNA hat es sich bewährt 1:7, 1:9 bzw. 1:11 Mischungen aus Pfu- und Taq-DNA-Polymerase auszutesten.

Der Reaktionsansatz enthält jeweils 20 pmol Primer, 100 ng genomische DNA oder 50 ng Plasmid-DNA, 250 µM jedes dNTPs, 5 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10x PCR-Puffers (bei Taq- Pfu-DNA-Polymerase-Mischungen wird der 10x Taq-Puffer verwendet) und die vom Hersteller empfohlene Menge an thermostabiler DNA-Polymerase in einem

Gesamtvolumen von 50 µl. Der Ansatz wird auf Eis zusammenpipettiert und die Reaktion durch Zugabe des Enzyms bei 94° C in der PCR-Maschine gestartet ("Hot start PCR"). Dadurch werden unspezifische Paarungen der Primer in der ersten Amplifizierungsrunde vermieden. Die Hybridisierungstemperatur wird folgendermaßen bestimmt: für jedes G oder C im hybridisierenden Bereich der PCR-Primer ergibt sich eine Erhöhung der Temperatur (von 0° C ausgehend) um 4° C, für jedes A oder T eine Erhöhung um 2° C. Eine genauere Abschätzung der Hybridisierungstemperatur liefert das Computerprogramm OLIGO 4.0S (Molecular Biology Insights Inc., <http://oligo.net/>). Primer sollten so ausgewählt werden, daß der GC-Gehalt möglichst bei 50 % liegt, die Primer nicht selbst miteinander hybridisieren können, bzw. keine intramolekularen Haarnadelschlaufen ausgebildet werden, und daß das 3'-Nukleotid ein Purin ist. Ideale Hybridisierungstemperaturen bewegen sich zwischen 50° und 60° C.

Im folgenden ist ein Beispiel für ein Temperaturprogramm zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase bis zu 1 kb angegeben.

Zyklennummer	1	2-5	6-25	26
Denaturierung	94° C 3 – 5 min	94° C 30 sec	94° C 30 sec	94° C 30 sec
Hybridisierung		56° C 30 sec	62° C 30 sec	62° C 30 sec
Elongation		72° C 60 sec	72° C 60 sec	72° C 5 min

Es wird dabei eine anfängliche Hybridisierungstemperatur der Primer von 56° C vorausgesetzt. Durch zusätzliche DNA-Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende des Primers wird nach den ersten Amplifikationsrunden die Hybridisierungstemperatur auf 62° C erhöht. In der letzten Runde werden in dem verlängerten Elongationsschritt eventuell nicht fertig synthetisierte Produkte aufgefüllt.

### 3.6.9.2. PCR-Mutagenese

Die PCR-Mutagenese von Plasmid-DNA wurde in Anlehnung an das Verfahren von Landt *et al.* (Landt *et al.*, 1990) durchgeführt. Es wurde dabei Vent-DNA-Polymerase verwendet. Die Primer wurden so gewählt, daß sie eine oder zwei Restriktionsschnittstellen besitzen, die im Zielvektor nur einmal vorkommen, damit nach Restriktion der Amplicons eine Subklonierung möglich ist. Der sogenannte Mutageneseprimer war so konstruiert, daß die zur Matrize nicht komplementären Basen (1 bis 3 Nukleotide) möglichst exakt in der Mitte der Primer-Sequenz lokalisiert sind, um trotz der Basenfehlpaarung eine optimale Hybridisierung des Primers zu gewährleisten.

### 3.6.9.3. PCR-Test auf Insertion des Fragmentes („PCR-Screening“)

Zur Identifizierung von Bakterienklonen, die nach der Transformation von gereinigten Ligationsansätzen, den Vektor mit dem gewünschten Insert beherbergen, wird eine PCR-basierende Variante des „Kolonie-Screenings“ angewendet. Das Prinzip ist die Unterscheidung von religiertem Vektor und Vektor mit Insert anhand eines Größenvergleichs (Agarosegel, Abschn. 3.9.1.) der entsprechenden PCR-Produkte. Diese werden mit Hilfe von Primern generiert, welche die Klonierungsregion des Vektors flankieren. Alternativ kann auch eine Primerkombination verwendet werden, bei der ein Primer mit einem DNA-Abschnitt des Inserts hybridisiert, der andere Primer hingegen mit der Vektor-DNA. Es werden folgende Komponenten gemischt und auf 25 Ansätze à 50 µl aufgeteilt:

25 µl dNTPs (10 mM), 200 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 12.5 µl BSA (20 mg/ml), 125 µl 10xTaq-Polymerase-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 0.08% NP-40), je 25 µl der beiden Primer (20 pmol/µl), 25 µl Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl) und 812.5 µl sterilem H<sub>2</sub>O (bidest.).

Einzelne Kolonien von den Selektionsplatten werden mit einem sterilen Zahnstocher mit Hilfe einer sterilen Pinzette aufgenommen, in einem PCR-Reaktionsgefäß mit den vorgemischten Komponenten ausgerollt, und in sterile Plastikreagenzgefäße mit Verschuß überführt, die mit 5 ml LB-Medium und Antibiotikum in der erforderlichen Endkonzentration befüllt sind. Aus den Übernachtskulturen kann durch eine Minipräparation von DNA (Abschn. 3.7.5.) direkt Plasmid-DNA gewonnen werden. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle (wenn einer der verwendeten Primer mit dem Insert hybridisiert) dient eine PCR-Reaktion, die 100 ng der zirkulären Vektor-DNA enthält.

Die PCR-Ansätze werden mit 12.5 µl Auftragspuffer (3x) versetzt und jeweils 10 µl-Aliquots durch TBE-Agarosegelelektrophorese analysiert.

### 3.6.9.4. Radioaktive Markierung von PCR-Produkten

Die PCR-Reaktionen werden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Ein typischer Ansatz enthält jeweils 20 pmol der beiden entsprechenden Primer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 % (v/v) DMSO, 50 ng Matritzen-DNA, 25 µM dNTPs, 0.4 µM (60 µCi) α-<sup>32</sup>P-dATP (3000 Ci/mmol), 0.4 µM (60 µCi) α-<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol), Taq-DNA-Polymerase-Puffer, 2.4 U Taq-DNA-Polymerase, 0.4 U Pfu-DNA-Polymerase und H<sub>2</sub>O (bidest.).

Die Amplifikation erfolgt in 20 Polymerisationsintervallen.

### 3.6.10. Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

- **„Freeze-thaw“ Methode:** Die gewünschte DNA-Bande wird unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm detektiert und ausgeschnitten. Nach dem Transfer in eine Ultrafree-Filtereinheit wird die Probe auf Trockeneis eingefroren und bei RT aufgetaut. Viermaliges Wiederholen dieser Prozedur vervollständigt die Zerstörung der Gelmatrix. Das Gelstückchen wird in halbgefrorenem Zustand zentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 2000 rpm, 15 min, 4° C). Das Eluat wird mit Chloroform extrahiert, die DNA wird mit Ethanol gefällt und in 10 -50 µl TE aufgenommen.

- **Elektroelution:** Das Agarosegel wird in seiner Gießform in die Elektrophoreseapparatur gelegt, wobei darauf geachtet wird, daß der TAE-Puffer das Gel gerade nicht mehr bedeckt. Vor der gewünschten Bande wird mit dem Skalpell ein rechteckiger Trog ausgeschnitten, der mit einer vorbehandelten Dialysemembran (Spectropor, Ausschlußvolumen 9 kDa) ausgekleidet wird. Dieser Trog wird mit ca. 0.3 – 0.4 ml 1 x TAE-Puffer gefüllt. Die Elektrophorese wird fortgesetzt, bis die Bande in den Trog eingewandert ist, was unter UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm kontrolliert werden kann. Schließlich polt man für 30 s um, überführt die DNA-haltige Pufferlösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß, extrahiert und fällt sie wie oben beschrieben.

- **Gelelution mittels des GFX DNA and Gel Band Purification Kit (APB):**

Das ausgeschnittene Agarosegelstück wird nach Herstellerangaben prozessiert. Das DNA-Fragment befindet sich schließlich in 30 – 100 µl H<sub>2</sub>O (bidest.).

## 3.7. Reinigung von DNA und RNA

### 3.7.1. Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäurepräparation

Die Konzentration der DNA-Lösung wird über ihre Absorption bei 260 nm ermittelt. Dabei entspricht 1 OD<sub>260</sub> einer Konzentration von 50 µg ds-DNA/ml. Als Kriterium für die Reinheit einer DNA-Präparation wird das Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> herangezogen. Für reine DNA schwankt dieser Wert je nach GC-Gehalt der Probe zwischen 1.8 und 2.0. Niedrigere Quotienten zeigen Proteinverunreinigungen an, höhere lassen auf die Anwesenheit von RNA schließen. Bei RNA-Lösungen entspricht 1 OD<sub>260</sub> einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

### 3.7.2. Chloropane-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Die Chloropane-Extraktion ist eine Routinemethode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Lösungen von Nukleinsäuren und Proteinen. Wenn nicht anders beschrieben, wird die Nukleinsäure-Lösung mit einem Volumenanteil Chloropane versetzt, auf dem Vortex vermischt, und für 5 min bei RT zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14000 rpm, RT). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol [24:1(v/v)] gemischt und erneut für 5 min zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14000 rpm, RT). Der wäßrige Überstand wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Restliches Chloropane wird durch anschließende Ethanol-fällung der DNA entfernt. Bei der Zugabe von Alkohol kommt es in Gegenwart relativ hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen zur Aggregation der Nukleinsäure-Moleküle und zur nachfolgenden Präzipitation. Niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze bleiben dabei in Lösung. Die Nukleinsäuren werden aus der Lösung durch Zugabe von 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 4.8) und 2.5 Volumenanteilen eiskaltem Ethanol (abs.) gefällt. Sollten Oligonukleotide gefällt werden, wurde bei gleichem Vorgehen 1/100 Volumenanteil 1 M  $MgCl_2$  zugegeben. Der Ansatz wird vermischt und 2 h bei  $-20^{\circ}C$  inkubiert. Nach einer dreißigminütigen Zentrifugation (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 rpm,  $4^{\circ}C$ ) wird das Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals für 5 min zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Schließlich wird die DNA in einem geeigneten Volumen TE gelöst.

Die Isopropanolfällung einer DNA-Lösung erfolgt durch Zugabe von 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 5.0) und 0.8 Volumenanteilen eiskaltem Isopropanol (abs.). Inkubation, Zentrifugation und Waschen des DNA Präzipitats erfolgt analog zur Ethanol-Fällung.

DNA kann auch direkt aus Lösungen mit niedriger Ionenstärke durch Zugabe des neunfachen Volumens an n-Butanol bei RT (10 min) gefällt werden. Nach Sedimentation des Präzipitats (14000 rpm, 15 min, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) wird diese im Vakuumkonzentrator getrocknet.

**Chloropane:** Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol [25:24:1 (v/v)], gesättigt mit TE-Puffer

### 3.7.3. Reinigung von DNA über Gelfiltration

- **Abtrennung von Oligonukleotiden durch Sephadex G-100 Säulen:** Um ein aus einem Plasmid ausgeschnittenes Oligonukleotid von ersterem zu trennen, wurde eine Sephadex G-100 Säule gefahren. Dazu wurde das Säulenmaterial mit TE äquilibriert, nach ca. 20 min der Puffer abgegossen und die Prozedur drei mal wiederholt.

Schließlich wurde das Material in eine Chromatographie Säule (BioRad) gegossen, bis ein Matrix-Volumen von 500 µl gepackt war. Die Säule wurde mit TE äquilibriert, anschließend das Gemisch aus geschnittenem Plasmid und Oligonukleotid in einem Volumen von 50 µl auf die Säule geladen. Nachdem diese 50 µl in das Säulenmaterial eingelaufen waren, wurde 1 ml TE-Puffer auf die Säule gegeben. Die ersten 200 µl des Durchlaufs wurden verworfen, dann 8 Fraktionen zu jeweils 50 µl gesammelt. Je Fraktion wurden 5 µl auf ein 0.7 %iges Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt. Damit konnte die korrekte Länge des geschnittenen Plasmids und dessen Konzentration abgeschätzt werden. Die Oligonukleotide verbleiben bei diesem Verfahren im Säulenmaterial.

- **Reinigung über eine Sephadex G-50 Säule („Nick column“):** Die DNA wird in einem Volumen bis 0.1 ml auf eine 1 ml Sephadex G50-Säule aufgetragen, welche vorher mit 3x 1 ml H<sub>2</sub>O (bidest.), sowie 3x 1 ml TE äquilibriert wurde. Die Säule wird mit TE eluiert und der Durchlauf fraktioniert gesammelt. Die erste Fraktion von 0.35 ml wird verworfen, in der zweiten Fraktion von 0.4 ml eluiert die DNA. Hierbei werden Salze, Nukleotide und grobe Verunreinigungen abgetrennt. Bevorzugt wurde die Methode zur Abtrennung der Nukleotide von <sup>32</sup>P-markierten Oligonukleotiden eingesetzt.

- **Reinigung über eine Sephadex G-25 Säule („Micro-spin column“):** Diese Methode hat sich bei der Reinigung langer DNA-Fragmente (100 – 200 bp) bewährt, die man z. B. im EMSA (Abschn. 3.15.) einsetzt. Dazu wird das Volumen eines radioaktiven DNA-Markierungsansatzes (Abschn. 3.6.2., 3.6.4., 3.6.5. u. 3.6.9.4.) mit TE auf 50 µl eingestellt. Die mit TE äquilibrierte Gelfiltrationssäule wird auf dem Vortex gut durchmischt und anschließend nach Abbrechen des unteren Verschlusses mit leicht geöffnetem Deckel auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt. Zur Entfernung von überschüssigem TE wird die Säule zentrifugiert (3500 rpm, 1 min, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge), auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und mit dem Markierungsansatz beladen. Nach einer erneuten Zentrifugation (3500 rpm, 2 min, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) befindet sich das gereinigte DNA-Fragment unverdünnt im Eluat, wohingegen niedermolekulare Verbindungen (Salze, Nukleotide etc.) in der Säulenmatrix verbleiben.

### 3.7.4. Reinigung von DNA über DE52-Säulen

DNA kann in beliebigen Volumina in 0.2x STE-Puffer auf mit 0.2x STE äquilibrierte Säulen aufgetragen, ebenfalls mit 0.2x STE gewaschen und mit 0.5x STE eluiert werden. Hierbei werden Salze, Nukleotide und die meisten Proteine abgetrennt. Dazu werden 0.5 ml Säulenmaterial in eine mit silikonisierter Glaswatte verschlossene Plastikspritze (1 ml, ca. 5 x 80 mm) gegeben, welche wiederum in ein 15 ml-Falconröhrchen gesetzt wird.

Die Säule wird mit 0.2x STE äquiliert, mit der DNA beladen, zehnmal mit je 0.5 ml 0.2x STE gewaschen, und schließlich dreimal mit 0.25 ml 0.5x STE eluiert. Alle Schritte werden in einer Heraeus Multifuge 3 L-R (400 – 500 rpm, 1 – 2 min) bei RT durchgeführt, wobei zu Beginn die Zentrifugationszeit so bestimmt wird, daß die Säule nicht trockenläuft. Mit dieser Methode werden Sonden für das Durchmustern von Genbanken bzw. für die Northern-Blot-Analyse präpariert. Diese Sonden sind von vorzüglicher Qualität, insbesondere wenn man sie kurz vor ihrer Verwendung nochmals steril filtriert.

**0.2x STE:** 0.2 M NaCl in TE

**0.5x STE:** 0.5 M NaCl in TE

### 3.7.5. Minipräparation von DNA aus *E. coli* (Del Sal *et al.*, 1988)

3.0 ml einer ÜN-Suspensionskultur werden abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14000 rpm, 30 s, RT). Der Überstand wird möglichst quantitativ abgenommen und verworfen. Das Sediment wird in 300 µl STET-Puffer auf dem Vortex resuspendiert. Darauf folgt die Zugabe von 12 µl einer Lysozym- und 0.5 µl einer RNase A-Lösung, sowie eine fünfminütige Inkubation bei RT. Zum Zellaufschluß werden die Proben in einem Heizblock 45 s auf 95° C erhitzt und anschließend 10 min bei RT zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14000 rpm). Die Bakterienreste mit der chromosomalen DNA sind nach der Zentrifugation zu einem gallertartigen Sediment verdichtet, und werden nach Überführen des Überstandes in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß verworfen. Zum plasmidhaltigen Überstand werden dann 12 µl CTAB-Lösung pipettiert. Das entstehende Präzipitat wird nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT abzentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 rpm, 10 min, 4° C) und, nachdem der Überstand restlos entfernt worden ist, wieder in 300 µl 1.2 M NaCl gelöst. Die Nukleinsäuren werden anschließend durch Zugabe von 300 µl Isopropanol gefällt, nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT abzentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 rpm, 10 min, 4° C), in 900 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und dann erneut zentrifugiert. Das Präzipitat wird 5 min im Vakuumkonzentrator getrocknet und schließlich in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zwischen 5 µl und 7 µl dieser Präparation reichen in der Regel für eine analytische Restriktionshydrolyse aus.

**STET-Puffer:** 8 % (w/v) Saccharose  
0.1 % (v/v) Triton-X-100  
50 mM EDTA  
50 mM Tris-HCl, pH 8,0

**Lysozym-Lösung:** 50 mg/ml Lysozym  
in 50 mM Tris-HCl,  
pH 7.3

**CTAB-Lösung:** 5% (w/v) Hexadecyltriammoniumbromid  
in H<sub>2</sub>O (bidest.);  
zum Lösen auf 40° C im Wasserbad  
erwärmen

**RNase A-Lösung:** 10 mg/ml  
in 10 mM Tris-HCl,  
pH 7.5  
15 min kochen

### 3.7.6. Plasmid-DNA-Präparation über Anionentauschersäulen

Plasmid-DNA-Präparationen in größerem Maßstab wurden mit dem Nucleobond AX Kit (Macherey & Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.7.7. Reinigung synthetischer Oligodesoxyribonukleotide

Da die automatische Oligodesoxyribonukleotid-Synthese nicht mit 100 %iger Ausbeute verläuft, sind in jeder Rohpräparation noch Oligodesoxyribonukleotide vorhanden, die kürzer als das erwünschte sind. Diese müssen erst über eine Gelelektrophorese abgetrennt werden. Dazu wird die lyophilisierte Oligodesoxyribonukleotidpräparation in 40 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit einem Volumenanteil Formamid-Auftragspuffer versetzt. Es schließt sich eine gelelektrophoretische Auftrennung in einem 1.5 mm dicken, 11-15 %igem (je nach der Länge der Oligodesoxyribonukleotide) denaturierenden Polyacrylamidgel (Abschn. 3.9.3.) an. Nach der Elektrophorese wird das Gel auf eine im UV fluoreszierende Kieselgel-Aluminiumfolie (Kieselgel 60W F<sub>254</sub>S, Merck) gelegt, und die der DNA entsprechende Bande kann durch UV-Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sichtbar gemacht und ausgeschnitten werden. Die zerkleinerte Gelmatrix wird mit 500 µl TE über Nacht bei 37° C geschüttelt. Durch eine Zentrifugation in einer Millipore Ultrafree Filtereinheit (Eppendorf-Tischzentrifuge, 2000 rpm, 10 min, RT) werden Polyacrylamidbruchstücke von der wässrigen Lösung abgetrennt. Durch Zugabe von 1/100 Volumenanteil 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 4.8) und 2.5 Volumenanteilen eiskalten absoluten Ethanol werden die Oligodesoxyribonukleotide gefällt. Nach dreißigminütiger Kühlung bei -20° C wird die DNA abzentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 rpm, 10 min, 4° C) und nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol und Trocknen im Vakuumkonzentrator in 50 µl H<sub>2</sub>O (bidest.) aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung wird ein Aliquot dieser Lösung 1:200 verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm gemessen.

**Formamid-Auftragslösung:**     0.1% (w/v) BPB  
                                      0.1% (w/v) XC  
                                      0.5 mM EDTA; pH 8.0  
                                      98% (v/v) Formamid

### 3.7.8. Isolierung von RNA aus Säugerzellen

Die RNA-Präparation erfolgt in Anlehnung an das Protokoll von Chomczynski & Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryontischen Suspensionszellen werden  $1.5 - 2.0 \times 10^8$  Zellen, verteilt auf zwei Falconpolypropylenröhrchen, sedimentiert (Heraeus Multifuge 3 L-R, 1000 rpm, 5 min, RT). Die Zellen werden in 1x PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Jedes der beiden Zellpellets wird auf Eis in 1.5 ml eiskalter Lösung D resuspendiert, im Vortex durchmischt, und 10 min auf Eis inkubiert (Zellaufschluß). Die Suspensionen werden auf vier QIAshredder-Homogenisatoren verteilt, diese in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße plaziert und dann für 2 min zentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 rpm, 4° C). Die vier erhaltenen homogenisierten Lysate werden mit je 75 µl 2 M Natriumacetat (pH 4.0) gemischt und 750 µl saures Phenol werden zugegeben. Die Proben werden sogleich für 10 min im Kühlraum geschüttelt. Nach Zugabe von jeweils 150 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wird die Suspension auf dem Vortex gut durchmischt, und schließlich 15 min auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 30 min, 4° C, 12000 rpm). Die obere Phase enthält die RNA und wird vorsichtig abgenommen und in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Hier ist es wichtig darauf zu achten, daß keine Kontamination durch Proteine und DNA, die sich in der Interphase befinden, erfolgt. Die RNA wird durch Zugabe von einem Volumen eiskaltem Isopropanol und einer zwanzigminütigen Inkubation auf Eis gefällt, und durch Zentrifugation (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 30 min, 4° C, 14000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, das Präzipitat in 150 µl Lösung D resuspendiert, die Proben vereinigt und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2.5 Volumina absolutem Ethanol, kann die RNA so für längere Zeit stabil bei -20° C gelagert werden.

Zur weiteren Prozessierung wird die gefällte RNA sedimentiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 30 min, 4° C, 14000 rpm), einmal in 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut für 5 min zentrifugiert und im Vakuumkonzentrator lyophilisiert. Die getrocknete RNA kann schließlich in 50 – 100 µl TE gelöst werden. Eine Analyse erfolgt durch denaturierende Agarosegelelektrophorese (Abschn. 3.9.1.2.).

<b>Lösung A:</b>	44 ml 7.22 M Guanidinium Thiocyanat	<b>Lösung D:</b>	10 ml Lösung A
	2.6 ml 0.75 M Natriumcitrat, pH 7.0		72 µl β-Mercaptoethanol
	4.0 ml 10% (w/v) N-Laurylsarcosin		vor Gebrauch frisch zugeben

### 3.7.9. Poly(A)-Selektion

Über die reversible Bindung des Poly(A)-Schwanzes an immobilisierten oligo(dT)-Gruppen kann eukaryontische mRNA selektioniert werden. Die Interaktion ist bei RT und bei hoher Ionenstärke stabil, wird jedoch unter Niedrigsalzbedingungen und erhöhter Temperatur wieder gelöst.

Die Reinigung von mRNA wurde mit Hilfe des Oligotex Direct mRNA mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

## 3.8. DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzen wurden nach dem „Cycle Sequencing“-Protokoll (Slatko, 1994) von der Firma Medigenomix (Martinsried) ermittelt.

## 3.9. Gelelektrophorese

### 3.9.1. Agarosegelelektrophorese

#### 3.9.1.1. Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Agarosegelelektrophorese wird in horizontalen Gelapparaturen durchgeführt. Je nach der Größe der zu trennenden Nukleinsäure-Fragmente schwankt die Agarosekonzentration zwischen 0.7 % und 2 % (w/v). Als Gel- und Laufpuffer werden standardmäßig 1x TBE verwendet, daß sich durch eine hohe Pufferkapazität auszeichnet. Dient die Agarosegelelektrophorese allerdings zur Auftrennung eines DNA-Fragmentes, daß später aus dem Gel ausgeschnitten werden soll, hat es sich bewährt TAE-Gele mit TAE als Laufpuffer zu verwenden.

Die aufzutrennenden Proben werden in 1x Auftragspuffer aufgetragen. Um die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar zu machen, wird der Gellösung unmittelbar vor dem Gießen Ethidiumbromid (0.5 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Feldstärke von 5 – 8 V/cm. Höhere Feldstärken führen zu einer verminderten Auflösung des Gels.

**3x Auftragspuffer:**      30 % (v/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O  
                                 0.45 % (w/v) BPB  
                                 0.45 % (w/v) XC  
                                 30 mM EDTA, pH 8.0

#### 3.9.1.2. Denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese von RNA

Die Gelelektrophorese wird in horizontalen Gelapparaturen durchgeführt. Zur Inaktivierung von RNasen werden der Gelschlitten, der Gelkamm und die Gelkammer für 1 h mit 1 M NaOH bei RT inkubiert. Da einzelsträngige RNA in der Lage ist Sekundärstrukturen auszubilden (Abschn. 1.1.), wird Formaldehyd in die Gelmatrix als denaturierendes Reagenz einpolymerisiert. Dies stellt sicher, daß die Auftrennung der RNA-Moleküle gemäß ihrem Molekulargewicht erfolgt. Zur Herstellung des Gels werden 2.4 g Agarose mit 144 ml H<sub>2</sub>O (bidest.) erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Anschließend wird auf ca. 60° C

abgekühlt. Daraufhin werden 20 ml 10x MOPS-Puffer und 36 ml 37%iges Formaldehyd zugegeben, vorsichtig durchmischt und die Lösung in einen geeigneten Gelschlitten eingebracht. Das Aushärten des Gels erfolgt bei RT für ca 30 min.

Es werden nun 20 µg lyophilisierte RNA in 4.5 µl H<sub>2</sub>O (bidest.) gelöst, und 1 µl 10x MOPS-Puffer, 3.5 µl Formaldehyd sowie 10 µl Formamid zupipettiert, gemischt und 15 min auf dem Heizblock bei 65° C inkubiert. Anschließend werden 2 µl RNA-Auftragspuffer zugegeben und die Probe in eine Geltasche pipettiert.

Als Laufpuffer zur Elektrophorese dient 1x MOPS-Puffer. Der Laufpuffer wird zur Regeneration während der Elektrophorese mittels einer Peristaltikpumpe umgewälzt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Feldstärke von 5 V/cm und wird gestoppt, wenn das Bromphenolblau des Auftragspuffers das untere Ende des Gels erreicht.

<b>10x MOPS-Puffer:</b>	0.4 M MOPS, pH 7.0	<b>RNA-Auftragspuffer:</b>	50 % (v/v) Glycerin
	0.1 M Natriumacetat		1 mM EDTA, pH 8.0
	0.01 M EDTA, pH 8.0		0.25 % (w/v) Bromphenolblau
			0.25 % (w/v) Xylenxyanol

### 3.9.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt unter denaturierenden Bedingungen (0.1% (w/v) SDS) über eine eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).

#### 3.9.2.1. Herstellung der Gele

##### • Minigelapparatur:

Zum Gießen der Gele und für den Gellauf werden Mini-Gelapparaturen, Abstandhalter und Kämmen der Firma Hoefer verwendet. Zwei gut gereinigte Glasplatten mit den Ausmaßen von 10 cm x 11 cm werden mit zwei Abstandhaltern (0.75 bzw. 1.0 mm) in einer Gießapparatur vertikal fixiert. Um die Apparatur abzudichten, muß ein ca. 0.5 cm hoher Sockel Trenngel zwischen den beiden Glasplatten gegossen werden. Man läßt diesen 5 min auspolymerisieren und füllt das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 4.5 cm zwischen beiden Glasplatten auf. Nun wird rasch, um eine glatte Gelfront zu erhalten, mit wenig destilliertem Wasser vorsichtig überschichtet. Die Polymerisation des Trenngels ist nach ca. 30 min beendet. Nach Abgießen des Wassers wird das Sammelgel 2 cm hoch über das Trenngel gegossen und sofort der Kamm eingesetzt. Nach ungefähr 15 min ist die Polymerisation des Sammelgels beendet. Der Kamm wird vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Gelelektrophoreseapparatur mit 1x TGS als Laufpuffer eingesetzt. Die Proteinlösungen werden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem Volumenanteil 2x SDS-Auftragspuffer gemischt, 1 min bei 95° C erhitzt und

unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf-Tischzentrifuge, 1 min, 14000 rpm, RT).

**Trenngellösung [15% (85:1)]:**

1.46 ml H<sub>2</sub>O (bidest.)  
 5.0 ml 30 % (w/v) Acrylamid  
 0.88 ml 2 % (w/v) Bisacrylamid  
 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8  
 0.1 ml 10 % (w/v) SDS  
 33 µl 30 % (w/v) APS  
 9 µl TEMED

**Sammelgellösung (für 2 Gele):**

6.2 ml H<sub>2</sub>O (bidest.)  
 1.70 ml 30 % (w/v) Acrylamid  
 0.7 ml 2 % (w/v) Bisacrylamid  
 1.3 ml 1 M Tris, pH 6.8  
 0.1 ml 10 % (w/v) SDS  
 50 ml 30 % (w/v) APS  
 25 µl TEMED

**8x SDS-Auftragspuffer:**

400 mM Tris-HCl, pH 6.8  
 8 % (w/v) SDS  
 40 % (w/v) Glycerin  
 0.5 % (w/v) Bromphenolblau  
 120 mM β-Mercaptoethanol oder 40 mM DTT

**• „Großes“ SDS-Polyacrylamid-Gel:**

Zum Gießen großer Polyacrylamidgele und für den Gellauf werden Gelapparaturen von APC und Abstandhalter und Kämmen der Firma Hoefer verwendet. Die beiden gut gereinigten Glasplatten 16 x 18 cm werden mit zwei Abstandhaltern (1 mm) in einer Gießapparatur vertikal fixiert und das Trenngel wird zwischen den beiden Glasplatten bis zu einer Höhe von ca. 15 cm gegossen. Man überschichtet rasch mit destilliertem Wasser und läßt das Gel für ca. 180 min auspolymerisieren. Dann gießt man das Wasser ab, setzt den Kamm ein und füllt das Sammelgel bis zum Erreichen des Glasrandes auf. Nach 15 min ist die Polymerisation beendet und das Gel wird in die Gelelektrophoreseapparatur mit 1x TGS als Laufpuffer eingesetzt. Die Proteinlösungen werden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem achteel Volumenanteil 8x SDS-Auftragspuffer gemischt, 1 min bei 95° C erhitzt und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf-Tischzentrifuge, 1 min 14000 rpm, RT).

	<b>Trenngel 10% (170:1)</b>	<b>Trenngel 12% (170:1)</b>	<b>Trenngel 15% (170:1)</b>
H <sub>2</sub> O	11.3 ml	9.2 ml	5.97 ml
30 % (w/v) Acrylamid	9.9 ml	11.9 ml	14.91 ml
2 % (w/v) Bisacrylamid	0.9 ml	1.1 ml	1.32 ml
Tris-HCl (pH 8.8)	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml
10 % (w/v) SDS	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml
30 % (w/v) APS	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	18 µl	18 µl	18 µl

**Sammelgellösung:** s.o.

**8 x SDS-Auftragspuffer:** s.o.

### 3.9.2.2. Elektrophorese

- **Minigelapparatur:** Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei konstant 20 mA für 1 bis 2 h unter Wasserkühlung, bis das Bromphenolblau des Auftragspuffers den unteren Glasplattenrand erreicht hat. Anschließend wird das Gel mit der gewünschten Methode gefärbt (Abschn. 3.9.2.3. – 3.9.2.5.).
- **„Großes“ SDS-Polyacrylamid-Gel:** Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei konstant 10-30 mA unter Wasserkühlung für 6 bis 12 h, bis das Bromphenolblau des Auftragspuffers den unteren Glasplattenrand erreicht hat. Anschließend wird das Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Abschn. 3.14.1.) oder durch Silberfärbung entwickelt (Abschnitt 3.9.2.5.).

### 3.9.2.3. Anfärbung der Proteine durch Coomassie-Brillantblau-Färbung

Um Proteine nach erfolgter Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu detektieren, werden sie im Gel mit Coomassie Brilliantblau angefärbt. Das Gel wird zunächst 60 min in Färbelösung und anschließend in Entfärberlösung unter mehrfachem Wechseln des Entfärbers geschwenkt, bis die Proteine als blaue Banden vor dem klaren Hintergrund sichtbar sind. Zum Trocknen wird das Gel luftblasenfrei zwischen zwei in Wasser getränkte, durchsichtige Cellophanfolien in einen Rahmen gespannt („*Gel Drying Kit*“, Promega) und über Nacht vertikal aufgestellt. Die untere Nachweisgrenze dieser Färbung liegt bei ca. 200 ng Protein.

**Entfärbelösung:** 40 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure

**Färbelösung:** 0.2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250 in  
45 % (v/v) Methanol  
9.2 % (v/v) Essigsäure

### 3.9.2.4. Kolloidale Coomassie-Färbung der Proteine nach Neuhoff *et al.*

Für die Anfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen, deren Banden für die Massenspektrometrie verwendet werden sollen, hat sich die Methode von Neuhoff & Ehrhardt (Neuhoff *et al.*, 1988) bewährt. Die Sensitivität liegt bei ca. 50 – 100 ng Protein, und ist daher höher als bei der klassischen Coomassie-Färbung. Die geringe Zahl an Reaktionsschritten vermindert zudem den Eintrag von kontaminierenden Proteinen (Keratine etc.). Alle Schritte der SDS-PAGE werden mit sauberen Materialien (in 10 % SDS, 0.5 M NaOH gewaschen) und mit besonderer Sorgfalt vorgenommen.

Das Gel wird in einem sauberen geschlossenen Plastikgefäß über Nacht in Färbelösung inkubiert. Am nächsten Tag wird die Färbelösung abgenommen, das Gel kurz in H<sub>2</sub>O (bidest.) gewaschen, woraufhin unmittelbar die gefärbten Proteinbanden auf klarem Hintergrund sichtbar werden. Die gewünschte Bande wird mit einem Einmalskalpell ausgeschnitten und in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

**Färbelösung:** zuerst werden 80 g Ammoniumsulfat in 800 ml 2 % (w/v) Phosphorsäure (2 g 85 % Phosphorsäure in 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.) gelöst;  
dann werden 1 g Coomassie Brillant Blau G-250 in 20 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, wovon 16 ml in die 10 % (w/v) Ammoniumsulfatlösung in 2 % (w/v) Phosphorsäure gegeben werden;  
kurz vor Gebrauch 200 ml Methanol zugeben und kräftig durchmischen;

### 3.9.2.5. Silberfärbung

Mit einer Silberfärbung („Silver Stain Kit: *plusone*“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech) lassen sich Proteine noch im Nanogrammbereich nachweisen. Alle Arbeiten werden in sehr sauberen Plastikgefäßen exakt nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.9.3. Harnstoff-TBE-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Anfertigung eines ultradünnen Harnstoff-TBE-Polyacrylamidgels werden zwei Glasplatten gründlich mit Spülmittel gereinigt, mit destilliertem Wasser abgespült und mit Ethanol trocken gerieben. Die Ohrenplatte (20 cm x 50 cm) wird mit 15 ml 5 %igem (v/v) Dichlordimethylsilan (in Chloroform gelöst) eingerieben und nach kurzem Trocknen mit Ethanol poliert. Beide Platten werden dann - durch Abstandhalter (0,5 mm) getrennt - waagrecht plaziert. Nach Einsetzen des Kammes werden 100 ml der entsprechenden Gellösung mit 170 µl 30 %igem APS und 100 µl TEMED gemischt und die Lösung sofort mit Hilfe einer Plastikspritze mit Gummistempel zwischen die Platten gegossen. Dabei ist es von Vorteil, wenn die Glasplatten am oberen Ende leicht erhöht liegen. Schließlich wird der Gelkamm („Haifischkamm“) eingesetzt. Das Gel polymerisiert über einen Zeitraum von mindestens 1.5 h aus.

Die Elektrophorese erfolgt in einer vertikalen Apparatur bei 1500 V (20 mA). Als Laufpuffer wird 1x TBE verwendet. Vor dem Probenauftrag erfolgt ein Vorlauf über mindestens 30 min bei 1500 V. Anschließend werden die Geltaschen mehrere Male mit 1x TBE gespült, um den aus dem Gel diffundierten Harnstoff zu entfernen. Die Proben werden mit abgeflachten Pipettenspitzen aufgetragen. Für eine gleichmäßige Erwärmung des Gels während des Laufs sorgt eine vor eine Glasplatte geklammerte Aluminiumplatte.

Nach der Elektrophorese wird die Ohrenplatte vorsichtig abgenommen und die Haftplatte mit dem Gel für 30 min in einer Lösung aus 10 % (v/v) Essigsäure und 20 % (v/v) Methanol eingelegt, um die DNA-Fragmente in der Gelmatrix zu fixieren. Das Gel wird mit deionisiertem Wasser gespült, auf Whatman 3MM Papier überführt, und 1 h bei 80° C im Vakuum getrocknet. Das Gel wird mit Verstärkerfolie bei –80° C autoradiographiert.

**Gellösung:** 6 %- 8 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1)  
8 M Harnstoff  
in 1x TBE  
Die Gellösung wird frisch zubereitet, filtriert und entgast

### 3.10. Hybridisierung filtergebundener RNA: Northern Blot

Die als „*Northern Blot*“ bezeichnete Prozedur dient dem Transfer der RNA eines RNA-Agarosegels auf eine Nitrocellulosemembran.

Das denaturierende Formaldehyd-Agarosegel (Abschn. 3.9.1.2.) wird nach erfolgter Elektrophorese für 20 min in 0.05 N NaOH geschwenkt. Die dadurch bewirkte partielle Hydrolyse der RNA erleichtert den Transfer. Dann wird das Gel kurz in H<sub>2</sub>O (bidest.) gewaschen und anschließend für 30 min in 20x SSC äquilibriert. Nun wird der Blot nach folgendem Schema aufgebaut (Kapillartransfer):

Das Gel wird mit der Unterseite nach oben auf zwei Whatman-Filterpapiere auf einem „Docht“ aus Whatman-Filterpapier plaziert, dessen Enden aus einem geeigneten Behälter (der 1 h mit 1M NaOH bei RT inkubiert wurde) 20x SSC aufsaugen. Direkt auf das Gel wird luftblasenfrei die in 20x SSC äquilibrierte Nitrocellulosemembran plaziert, wobei Kurzschlußkapillarflüsse durch Aufbringen von Parafilm verhindert werden. Auf die Membran werden zwei weitere Lagen Whatman-Filterpapier (in 20x SSC äquilibriert) gelegt. Dem schließt sich nochmals eine Schicht von 5 trockenen Whatman-Filterpapieren geeigneter Dimensionen an. Darauf bringt man eine ca. 5 – 8 cm dicke Schicht aus saugfähigem Zellstoff auf, die mit einer Glasscheibe und einem ca. 500 g schweren Gewicht komprimiert wird. Der Puffer steigt durch Kapillarkraft auf und wandert durch das Gel hindurch bis in die Zellstofflagen, wobei die RNA-Moleküle auf die Membran transferiert und immobilisiert werden. Der Transfer erfolgt über Nacht im Abzug. Danach wird die Membran zum Fixieren für 15 min in 5 % (v/v) Essigsäure geschwenkt. Daran schließt sich eine Anfärbung der RNA durch Methylenblau für 5 min an. Die Entfärbung der Membran erfolgt durch Schwenken in H<sub>2</sub>O (bidest.). Bei der Analyse von Gesamt-RNA-Präparationen können durch die Lage und das Erscheinungsbild der sichtbar werdenden Untereinheiten der ribosomalen RNA, Rückschlüsse auf den Zustand der RNA gezogen werden. Schließlich wird die Membran zwischen zwei Whatman-Filterpapieren getrocknet.

Die Membran wird zur Hybridisierung in 6x SSPE äquilibriert und in Hybridisierungsröhrchen eingebracht, so daß die RNA-Seite nach innen weist. Dann wird 5 ml Prähybridisierungslösung eingebracht und im Rotationsofen für 3 h bei 42° C prähybridisiert. Die radioaktive Sonde wird nun in 5 ml Prähybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 42° C im Rotationsofen hybridisiert. Doppelsträngige DNA-Proben werden vorher für 10 min bei 95° C inkubiert und im Eisbad abgeschreckt. Der erste Waschschrift erfolgt durch Zugabe von 10 ml 2x SSC/0.1 % SDS für 5 min bei RT. Dem schließt sich ein Waschschrift mit 0.2x SSC/0.1 % SDS für 5 min bei RT an. Ist der Hintergrund nach diesen Waschschriften noch zu hoch, kann mit höherer Stringenz weitergewaschen werden. Dazu werden 10 ml 0.2X SSC/0.1 % SDS auf 42° C vorgewärmt, und für 15 min bei 42° C mit der Membran im Rotationsofen inkubiert. Dieser Schritt wird nochmals wiederholt. Schließlich wird der Blot in Plastikfolie eingeschweißt und bei -80° C mit einer Intensivierungsfolie autoradiographiert.

<b>Prähybridisierungslösung:</b>	6x SSPE 5x Denhardt's Lösung 100 µg/ml ultraschallbehandelte Lachssperma-DNA 50 % (v/v) Formamid, deionisiert 0.5 % (w/v) SDS
<b>50x Denhardt's Lösung:</b>	1 % (w/v) Ficoll 400 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 1 % (w/v) BSA (Fraktion V, Sigma)
<b>Deionisierung von Formamid:</b>	8 ml einer AG 501-X8 Säule (BioRad) werden in einem 50 ml Falconröhrchen mit 37 ml Formamid überschichtet und für 16 h bei RT auf einem Roller-Mixer gemischt.

### 3.11. Reverse Transkription

Zur Isolation der intronfreien (Abschn. 1.1.) DNA-Sequenz wird aus präparierter mRNA bzw. Gesamt-RNA mittels Reverser Transkriptasen, welche RNA-abhängige DNA-Polymerasen darstellen, sogenannte cDNA („*complementary DNA*“) hergestellt. Da reife mRNAs am 3'-Ende üblicherweise einen Poly(A)-Schwanz besitzen, können Oligo(dT)-Primer als Startstellen für die cDNA-Synthese durch Reverse Transkriptasen fungieren. Kommerziell erhältlich sind zwei verschiedene Enzyme, und zwar die Reverse Transkriptase des Vogel-Myeloblastosis-Virus (AMV) und diejenige des Moloney-Mäuseleukämievirus (MMLV).

• **Reverse Transkription von poly(A)<sup>+</sup>-RNA:** Vor der reversen Transkription wird die RNA zusammen mit dem Oligo(dT)-Primer 5 min bei 65° C inkubiert, dann auf Eis abgeschreckt, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen und das Anlagern des Primers zu ermöglichen. Der Reaktionsansatz enthält 400 ng poly(A)<sup>+</sup>-RNA, 2.5 µg Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer, 1 mM dNTPs, 17.5 U RNasin, 5 µg BSA, H<sub>2</sub>O (bidest.) und 60 U Reverse Transkriptase in einem Endvolumen von 50 µl.

• **Reverse Transkription von Gesamt-RNA:** 30 µg Gesamt-RNA und 20 pmol Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer werden in einem Gesamtvolumen von 30 µl aufgenommen und 5 min bei 65° C inkubiert. Der Heizblock wird ausgestellt und mit dem Reaktionsansatz langsam auf RT abgekühlt, wodurch das Anlagern der Primer an die Poly(A)-Schwänze der mRNA ermöglicht wird. Dann wird eine geeignete Menge des vom Hersteller bereitgestellten Reaktionspuffers, 2 mM dNTPs, 20 U RNasin, 60 U Reverse Transkriptase und H<sub>2</sub>O (bidest.) zu einem Endvolumen von 50 µl zugegeben.

Beide Reaktionen werden 60 min bei 42° C (AMV) bzw. 37° C (MMLV) inkubiert und anschließend das Enzym durch 5 min Inkubation bei 95° C inaktiviert. Das Produkt der Erststrangsynthese kann bei -20° C gelagert werden, und dient als Matrize für PCR-Reaktionen (Abschn. 3.6.9.1.).

## 3.12. Isolierung und Identifizierung von cDNA-Klonen mittels Durchmustern einer Genbank

### 3.12.1. Vermehrung und Reinigung von Lambda-Phagen

Es wurde eine humane colorektale Adenokarzinom-Genbank verwendet, die mit dem Bakteriophagen λDR2 konstruiert wurde (Clontech), einem Derivat von λgt11, das zusätzlich DNA-Sequenzen aus dem Epstein-Barr-Virus enthält (aus dem Vektor pDR2), die eine spätere Vermehrung als episomales Plasmid in permissiven Zelllinien ermöglichen. Der Bakteriophage kann theoretisch cDNA bis zu einer Länge von 7 kb aufnehmen.

Die Phagenvermehrung und ihre Isolierung aus Plattenkultur, die Titerbestimmung, wie auch die Reinigung der Phagen-DNA wurde nach Angaben des Herstellers (Clontech, Protokoll #PT1011-1) durchgeführt.

**10x λ-Puffer:** 50 mM Tris-HCl, pH 7.5  
100 mM MgSO<sub>4</sub>  
2 M NaCl

**1x λ-Verdünnungspuffer (SM-Lösung):** 10 ml 10x λ-Puffer  
0.5 ml 2 % Gelatine

### 3.12.2. Durchmustern der Genbank

- **Ausplattieren der Genbank:** Es werden 15 cm Ø LB-Platten (10 mM MgSO<sub>4</sub>) am besten zwei Tage vor dem Beginn des Experiments gegossen und im Laminarfluß einer Sterilwerkbank getrocknet. Die Platten werden dann für mindestens 4 h bei 37° C vorgewärmt. Eine geeignete Menge Phagen verdünnt in 0.1 ml SM-Lösung wird nun mit 0.6 ml einer ÜN Kultur (2 – 4 x 10<sup>10</sup> Bakterien/ml) von *E. coli* K802 (in LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> + 0.2 % Maltose) für 15 – 20 min bei 37° C inkubiert (Phageninfektion). Der Phagentiter wird dabei so gewählt, daß ca. 30000 pfu auf eine 15 cm Ø Schale ausplattiert werden. Nun werden sogleich 8 ml einer auf 58° C vorgewärmten Top-Agarose zugegeben, durchmischt und rasch in die Mitte der vorgewärmten Platten gegossen. Ein einmaliges Schwenken der Schale verteilt den Top-Agar. Nun ist es wichtig die Schalen auf eine ebene Unterlage zu stellen, damit der Top-Agar gleichmäßig fest wird. Danach wird bei 37° C über Nacht inkubiert, bis deutliche Plaques im Bakterienrasen sichtbar werden.

- **Herstellung von Filterabzügen:** Von den einzelnen Platten wurden drei Filterabzüge generiert. Die Nitrocelluloserundfilter (Ø 13 cm) werden zunächst 5 min in 0.5 M NaCl gebadet und auf Whatman 3MM Papier angetrocknet, gerade so, daß ihre Oberfläche nicht mehr glänzt, die Filter aber noch feucht sind. Die Filter werden nun vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette in der Mitte der Platte aufgesetzt und durch ein vorsichtiges Abrollen auf die Platten aufgebracht. Mit der Pinzette wird der Filter insbesondere am Rand durch vorsichtigen Druck glattgestrichen. Werden drei Filterabzüge gemacht, so verbleibt der erste Filter 1 min, der zweite Filter 2 min und der dritte Filter 3 min auf der Platte. Die Filter werden gekennzeichnet und ihre Orientierung durch asymmetrische Markierung mit einem Labormarkerstift, sowie drei feine Nadelstiche durch die Membran hindurch (bis zum Plattenrücken) festgehalten. Anschließend werden die Filter mit einer Pinzette vorsichtig abgenommen und mit der belegten Seite nach unten zunächst 2 min in Denaturierungslösung, dann 5 min in Neutralisierungslösung und schließlich 2 min in 6x SSC in runden Glaswannen gebadet. Die jeweiligen Lösungen können für ca. 15 Filter verwendet werden. Schließlich werden die Rundfilter, zwischen Whatman 3MM Papier eingelegt und bei 80° C für 2 h gebacken.

- **Hybridisierung der Filterabzüge:** Die Hybridisierung in dieser Arbeit wurde mit einer 298 bp Sonde durchgeführt, welche komplementär zum 5'-Ende der PAQ cDNA ist, und mit Hilfe der Primer 5\*-pep1\_dkfz und 3\*-pep1\_dkfz (Abschn. 2.7.) durch PCR aus HeLa cDNA (erster Strang) amplifiziert und radioaktiv markiert (Abschn. 3.6.9.4.), sowie über DE52-Chromatographie (Abschn. 3.7.4.) gereinigt wurde. Die getrockneten Filter werden in H<sub>2</sub>O (bidest.) befeuchtet und danach zweimal für 30 min in 6x SSC/0.1 % (w/v) SDS bei RT gewaschen, um anheftende Bakterienreste zu beseitigen. Es ist wichtig darauf zu achten, daß die Filter ab jetzt nicht mehr komplett austrocknen, weil sie sonst nicht zweimal verwendet

werden können. Die gereinigten Rundfilter werden nun in Prähybridisierungspuffer bei 42° C für 4 h inkubiert. Es werden dabei nicht mehr als 15 Filter pro Glasschale eingesetzt. Am Abend wird die Sonde für 15 min bei 95° C aufgekocht und im Wasserbad abgeschreckt. Der 6x SSC-Puffer für die Hybridisierungslösung wird 10 min aufgekocht um Nukleasekontaminationen zu inaktivieren. Nun werden mindestens 10<sup>7</sup> cpm der Sonde in 100 ml Hybridisierungspuffer gegeben, und dieser unter Vermeidung von Luftblasenbildung in die Glasschalen eingebracht, und mit den Rundfiltern über Nacht bei 42° C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgen zunächst zwei Waschschrte à 10 min mit 6x SSC/0.1 % (w/v) SDS bei RT. Anschließend werden die Rundfilter für zweimal 15 min bei RT mit 2x SSC/0.1 % (w/v) SDS gewaschen. Dem schließt sich das Waschen bei 42° C für 15 min mit 2x SSC/0.1 % (w/v) SDS an. Zum Schluß wird zweimal mit 0.2x SSC/0.1 % (w/v) SDS bei 65° C für jeweils 10 min gewaschen. Jetzt werden die Filter kurz auf Whatman 3MM Papier angetrocknet, aber noch feucht mit der DNA-Seite nach oben auf ein mit Polyethylen beschichtetes Papier gegeben, auf der sich die Filter selbst ansaugen. Schließlich werden die Filter mit Haushaltsfolie luftdicht abgedeckt und ein bis drei Tage unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -80° C exponiert.

• **Vereinzeln der positiven Phagen:** Nach Autoradiographie werden die positiven Signale den entsprechenden Plaques auf den Platten zugeordnet. Doppelt-positive Phagen werden mittels einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze im Bereich von 3 – 5 mm Durchmesser aus der Platte ausgestochen und in 1 ml SM-Lösung über Nacht bei 4° C sanft geschüttelt. Die eluierten Phagen können nach erneuter Bestimmung des Titers erneut wie beschrieben ausplattiert werden (zweite Runde). Hier genügt es ca. 1000 Phagen pro Platte auszuplattieren.

**Top-Agarose:** 0.5 % (w/v) Agarose  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

**Denaturierungslösung:** 0.4 M NaOH  
1.5 M NaCl

**Prähybridisierungslsg:** 6x SSC  
5x Denhardt's Lsg.  
0.1 % (w/v) SDS  
50 % (v/v) Formamid  
100 µg/ml DNA

**Neutralisierungslösung:** 0.5 M Tris-HCl, pH 5.5  
1.5 M NaCl

**Hybridisierungspuffer:** 6x SSC  
5x Denhardt's Lsg.  
0.1 % (w/v) SDS  
50 % (v/v) Formamid  
100 µg/ml DNA

### 3.12.3. Umwandlung der lysogenen Phagen in Plasmide durch Cre-Rekombinase

$\lambda$ DR2 besitzt zwei vom Phagen P1-stammende *loxP*-Rekombinationssequenzen, die eine Zirkularisierung der Phagen DNA zu einem Plasmid, nach Infektion in einen Restriktionsendonuklease-negativen *E. coli*-Stamm, der Cre-Rekombinase exprimiert (in diesem Fall *E. coli* AM1), erlaubt.

Eine 1 ml ÜN Kultur (Inkubation bei 31° C !) von *E. coli* AM1 in LB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin wird sedimentiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14000 rpm, 1 min, RT), der Überstand verworfen und die Bakterien in 1 ml sterilem 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert. Die Suspension wird sogleich mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> 1:10 verdünnt, und 4 µl der verdünnten Suspension mit 30 µl Phagensuspension (in  $\lambda$ -Verdünnungspuffer) positiver Plaques aus dem Genbank-„Screen“ für 30 min bei 30° C (ohne Schütteln) inkubiert. Danach werden 80 µl 2x YT-Medium zugegeben und für 1 h bei 32° C im Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl 10 mM IPTG-Lösung wird für eine weitere Stunde bei 32° C inkubiert. Daran schließt sich eine Zugabe von Carbenicillin (Endkonzentration 50 µg/ml) und Natriumcitrat (Endkonzentration 20 mM) an, und es wird für 2 h bei 32° C im Schüttler inkubiert. Nun werden 4 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 10 mM Natriumcitrat im Wasserbad auf 45° C vorgewärmt. Die Bakterienkultur wird zum vorgewärmten Medium gegeben und über Nacht bei 37° C im Schüttelinkubator vermehrt. Am nächsten Tag wird aus 3 ml dieser ÜN Kultur durch Minipräparation (Abschn. 3.7.5.) die Plasmid-DNA gewonnen, mit den restlichen 1 ml Kultur wird eine 300 ml LB (100 µg/ml Ampicillin) Kultur beimpft, aus der große Mengen Plasmid-DNA (Abschn. 3.7.6.) gewonnen werden.

## 3.13. Proteinchemische Techniken

### 3.13.1. Herstellung von Zellkernextrakten

#### 3.13.1.1. Kernextrakte aus HeLa-Zellen

Die Präparation und die Extraktion von HeLa-Zellkernen wird in Anlehnung an das Protokoll von Dignam und Mitarbeitern durchgeführt (Dignam *et al.*, 1983). Alle Schritte werden wenn möglich auf Eis und im Kühlraum durchgeführt. Es werden HeLa-Zellen mit einer Dichte von  $5.5 \times 10^5$ /ml aufgearbeitet. Die Zellen werden abzentrifugiert (Beckman J-6B, 10 min, 3000 rpm, 4° C) und das Sediment mit wenig Überstand auf 50 ml Falcon Polypropylenröhrchen aufgeteilt.

Durch erneute Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3L-R, 2500 rpm, 4° C) wird der restliche Überstand quantitativ entfernt. Die Pellets werden mit je 45 ml 1x PBS gewaschen und zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 2500 rpm, 4° C). Das Volumen des Sedimentes (PCV, „packed cell volume“) wird bestimmt, sollte jedoch unter 5 ml pro Röhrchen liegen. Ist es größer, werden die Zellen auf mehrere Röhrchen verteilt.

Ab dem folgenden Schritt werden alle Arbeiten bei 4° C im Kühlraum durchgeführt. Nach Abdekantieren des überstehenden Puffers werden die Röhrchen mit HB-Puffer aufgefüllt, die Zellen vorsichtig resuspendiert und zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 2500 rpm, 5 min, 4° C). Der Puffer HB liefert hypotone Bedingungen, was zum Anschwellen der Zellen führt. Das Volumen des Sediments (SCV, „swollen cell volume“) wird bestimmt und der Überstand vorsichtig abdekantiert. Das SCV sollte bei Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zweifach höher sein, als das PCV. Niedrigere Werte lassen darauf schließen, daß die Zellen nicht richtig gewachsen sind. Die Sedimente werden im insgesamt vierfachen SCV an HB-Puffer suspendiert und für weiter 10 min auf Eis schwellen gelassen. Der Fortgang des Anschwellens wird im Lichtmikroskop überprüft, wobei ein davor entnommenes Aliquot als Referenz dient. Anschließend wird die Suspension in einen vorgekühlten Glashomogenisator (Typ B) mit dicht sitzendem Pistill überführt. Die Zellsuspension wird durch 15 harte Stöße mit dem Pistill B homogenisiert. Bei diesem Vorgang platzt die äußere Zellmembran, die Zellkerne jedoch bleiben intakt, was im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert wird. Es wird zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 3900 rpm, 15 min, 4° C) und der Überstand (Cytosol) vorsichtig abgenommen. Es hat sich bei der Herstellung von transkriptionsaktiven Zellkernextrakten bewährt, das Cytosol nicht quantitativ zu entfernen, sondern ca. 3 mm Überstand stehenzulassen.

Die Zellkerne werden mit einem halben Volumenanteil des Pellets (NPV) an kaltem Niedrigsalzpuffer in den Homogenisator (Typ B) überführt und die Suspension wird sechsmal mit dem Pistill B sanft homogenisiert (an dieser Stelle können die Zellkerne in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert werden). Die Suspension wird in einem Glasbecher vorgelegt, und auf Eis wird unter Rühren innerhalb von 30 min langsam ein halbes NPV Hochsalzpuffer zugetropft (Endkonzentration KCl ca. 400 mM). Nach weiteren 30 min Rühren wird der Kernextrakt abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 14000 rpm, 30 min, 4° C). Das Sediment der extrahierten Kerne wird getrennt weiterverarbeitet. Der klare Zellkernextrakt wird in Dialyseschläuche überführt und gegen BC0 (Tris-HCl, pH 6.8 bei RT) dialysiert, bis die Leitfähigkeit von BC100 erreicht ist (ca. 50 min). Es schließt sich ein letzter Zentrifugationsschritt an (Sorvall, SS34, 17500 rpm, 20 min, 4° C), bevor der Zellkernextrakt aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren wird.

Das verbliebene Kernsediment besitzt durch seinen hohen Gehalt an chromosomaler DNA eine gummiartige Konsistenz. Es wird in den Homogenisator übertragen und mit 1/4 (des ursprünglichen) NP-Volumens TGME-Puffer versetzt, durch 20 Stöße mit dem Pistill A homogenisiert, und in flüssigem Stickstoff weggefroren.

---

<b>HB-Puffer:</b>	10 mM Tris-HCl (pH 6.8 bei RT) 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl
<b>Niedrigsalzpuffer:</b>	20 mM Tris-HCl (pH 6.8 bei RT) 25 % (v/v) Glycerin 20 mM KCl 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 0.2 mM EDTA
<b>Hochsalzpuffer:</b>	20 mM Tris-HCl (pH 6.8 bei RT) 25 % (v/v) Glycerin 1600 mM KCl 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 0.2 mM EDTA
<b>TGME-Puffer:</b>	50 mM Tris-HCl (pH 7.3 bei RT) 25 % (v/v) Glycerin 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0.2 mM EDTA

Der HB- der Niedrigsalz- und der Hochsalzpuffer werden mit Tris pH 6.8 bei RT eingestellt (entspricht pH 7.3 bei 4° C). Der TGME-Puffer wird mit Tris pH 7.3 bei RT eingestellt (entspricht pH 7.9 bei 4° C). Den Puffern wird vor Gebrauch 5 mM DTT, 1 mM PMSF (Stammlösung 200 mM in DMSO) und 0.1 mM Benzamidin (Stammlösung 0.1 M in DMSO) zugesetzt.

### 3.13.1.2. Kernextrakte aus Jurkat-Zellen (NAM-Protokoll)

Die Jurkat-Zellen, aus denen die Kernextrakte hergestellt werden sollen, werden bei einer Dichte von  $3 \times 10^5/\text{ml}$  –  $6 \times 10^5/\text{ml}$  kultiviert. Die Zellen werden abzentrifugiert (Beckman J-6B, 10 min, 3000 rpm, 4° C), und die Pellets mit wenig Überstand in ein 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Durch erneute Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3L-R, 1000 rpm, 5 min, 4° C) wird der restliche Überstand quantitativ entfernt. Das Pellet wird mit 45 ml 1x PBS gewaschen und zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 2000 rpm, 10 min, 4° C). Das Volumen des Sedimentes (PCV, „packed cell volume“) wird bestimmt.

Ab dem folgenden Schritt werden alle Arbeiten bei 4° C im Kühlraum durchgeführt. Nach dem Abnehmen des überstehenden Puffers wird das Pellet in 4 PCV Niedrigsalzpuffer aufgenommen und zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 2000 rpm, 10 min, 4° C). Anschließend werden die Zellen in 2 PCV Niedrigsalzpuffer aufgenommen und solange inkubiert, bis sie in dem hypotonischen Puffer angeschwollen sind. Dieser Vorgang wird durch regelmäßige Kontrolle im Lichtmikroskop überprüft und nimmt normalerweise etwa 15-30 min in Anspruch. Anschließend wird die Suspension in einen vorgekühlten Glashomogenisator (Typ B) mit lose sitzendem Pistill überführt.

Die Zellsuspension wird durch harte Stöße mit dem Pistill B solange bearbeitet, bis die Cytoplasmamembran platzt (Phasenkontrastmikroskop). Die Kerne müssen bei dieser Prozedur jedoch intakt bleiben. Die Trennung von Cytoplasma und Zellkernen erfolgt durch Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3L-R, 3000 rpm, 15 min, 4° C). Der Überstand (Cytoplasma) wird vorsichtig abgenommen. Die Zellkerne werden in einem halben Volumenanteil des Pellets (NPV) an kaltem Niedrigsalzpuffer im Homogenisator (10 leichte Stöße, Pistill B) resuspendiert. Zu dieser Suspension wird innerhalb von 30 min langsam unter vorsichtigem Mischen 1.5 NPV Hochsalzpuffer zugetropft (Endkonzentration 210 mM). Nach weiteren 60 min Inkubation auf dem Drehrad wird der Extrakt abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 18000 rpm, 30 min, 4° C). Der klare Zellkernextrakt wird in Dialyseschläuche überführt und gegen BC0 (pH 7.3 RT) dialysiert, bis die Leitfähigkeit von BC100 erreicht ist (ca. 50 min). Es schließt sich ein letzter Zentrifugationsschritt an (Sorvall, SS34, 18000 rpm, 20 min, 4° C), bevor der Zellkernextrakt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80° C aufbewahrt wird.

Das Zellkernpellet wird wie beschrieben (Abschn. 3.13.3.1.) prozessiert.

**Niedrigsalzpuffer:** 10 mM Tris-HCl (pH 7.3 bei RT)  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM KCl  
0.2 mM EDTA

**Hochsalzpuffer:** 20 mM Tris-HCl (pH 7.3 bei RT)  
25 % (v/v) Glycerin  
420 mM NaCl  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.2 mM EDTA

Die Puffer besitzen einen pH von 7.9 bei 4° C. Zu allen verwendeten Puffern frisch zugeben:  
1 mM PMSF, 5 mM DTT, 0.1 mM Benzamidin.

### 3.13.1.3. Kernextrakte aus adhärent wachsenden Zellen

Adhärente Zellen (F9, SW13, 293T) werden zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit 10 ml 1x PBS/0.5 mM EDTA von einer 15 cm Ø Schale abgelöst. Routinemäßig wurden dreißig 15 cm Ø Schalen in einem Experiment prozessiert, welche ca. 1 ml Kernextrakt ergeben. Die Zellen werden sofort in 50 ml Falconröhrchen auf Eis überführt, und für 5 min zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 1500 rpm, 4° C). Der Überstand wird dekantiert und die Zellen durch Zugabe von 45 ml eiskaltem 1x PBS (pro Falconröhrchen) resuspendiert. Es wird erneut für 5 min bei 4° C zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 1500 rpm). Der Überstand wird dekantiert und die Zellen werden mit Hilfe von eiskaltem 1x PBS in einem 15 ml Falconröhrchen vereinigt, und durch Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3L-R, 5 min,

1500 rpm, 4° C) sedimentiert. Die folgenden Schritte finden im Kühlraum statt. Der Überstand wird abgenommen und das PCV („packed cell volume“) bestimmt. Die Zellen werden nun im fünffachen des PCV HB-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 10 min, 4° C, 1500 rpm). Es erfolgt die Bestimmung des SCV („swollen cell volume“). Nach Dekantieren des Überstandes wird das Sediment in 5 PCV HB-Puffer resuspendiert und 10 – 15 min auf Eis inkubiert. Das Anschwellen des Zellvolumens wird kontrolliert (Phasenkontrastmikroskopie). Die Zellen werden nun durch 25 Stöße mit Pistill A im Homogenisator aufgebrochen. Es wird zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 3900 rpm, 15 min, 4° C) und der Überstand (Cytosol) vorsichtig abgenommen.

Die Zellkerne werden mit einem Volumenanteil des Pellets (NPV) an kaltem Niedrigsalzpuffer in den Homogenisator (Typ B) überführt und die Suspension wird sechsmal mit dem Pistill B sanft homogenisiert. Die Suspension wird in einem Glasbecher vorgelegt, und auf Eis wird unter Rühren innerhalb von 30 min langsam ein halbes NPV Hochsalzpuffer zugetropft (Endkonzentration KCl 240 - 340 mM, je nach Zelllinie; siehe unten). Nach weiteren 30 min Rühren wird der Kernextrakt abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 14000 rpm, 30 min, 4° C). Das Sediment der extrahierten Kerne wird getrennt weiterverarbeitet. Der klare Zellkernextrakt wird in Dialyseschläuche überführt und gegen BC0 (Tris-HCl, pH 6.8 bei RT) dialysiert, bis die Leitfähigkeit von BC100 erreicht ist (ca. 30 bis 45 min). Es schließt sich ein letzter Zentrifugationsschritt an (Sorvall, SS34, 17500 rpm, 20 min, 4° C), bevor der Zellkernextrakt aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren wird.

Das verbliebene Kernsediment besitzt durch seinen hohen Gehalt an chromosomaler DNA eine gummiartige Konsistenz. Es wird in den Homogenisator übertragen und mit 1/4 (des ursprünglichen) NP-Volumens TGME-Puffer versetzt, durch 20 Stöße mit dem Pistill A homogenisiert, und in flüssigem Stickstoff weggefroren.

**HB-Puffer:** 10 mM Tris-HCl (pH 6.8 bei RT)  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM KCl

**Niedrigsalzpuffer:** 20 mM Tris-HCl (pH 6.8 bei RT)  
25 % (v/v) Glycerin  
20 mM KCl  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.2 mM EDTA  
0.1 mM EGTA

**Hochsalzpuffer:** 20 mM Tris-HCl (pH 6.8 bei RT)  
25 % (v/v) Glycerin  
1600 mM KCl für SW13 und F9 Zellen, 1200 mM KCl für 293T Zellen  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.2 mM EDTA  
0.1 mM EGTA

**TGME-Puffer:** 50 mM Tris-HCl (pH 7.3 bei RT)  
25 % (v/v) Glycerin  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.2 mM EDTA

Die Puffer besitzen einen pH von 7.3 bei 4° C. Zu allen verwendeten Puffern frisch zugeben:  
1 mM PMSF, 5 mM DTT, 0.1 mM Benzamidin.

### 3.13.2. Herstellung von Gesamtzellextrakten

Die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet (Heraeus Multifuge 3L-R, 2000 rpm, 4° C, 5 min), zweimal mit 1x PBS gewaschen und in eiskaltem Lysis-Puffer für 15 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird in flüssigem Stickstoff eingefroren, sogleich im Wasserbad bei 37° C aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. Mit Hilfe einer Plastikspritze (Kanüle 21G) wird durch 15-maliges Aufziehen der Suspension die Kernmembran komplett zerstört. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 rpm, 10 min, 4° C) sedimentiert. Der Überstand (Zellextrakt) wird aliquotiert in flüssigem Stickstoff weggefroren.

**Lysis-Puffer:** 50 mM Tris-HCl, pH 7.5  
500 mM NaCl  
1 % (v/v) Igepal CA630  
1.0 % (w/v) Natriumdeoxycholat  
0.1 % (w/v) SDS  
2 mM EDTA  
frisch zugeben: 1 mM PMSF, 0.1 mM Benzamidin, 5 mM DTT

### 3.13.3. Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

#### 3.13.3.1. Expression

50 ml TBG-M9 Medium (mit dem jeweiligen Antibiotikum) werden mit einer Kolonie des entsprechenden rekombinanten *E. coli*-Stammes angeimpft und über Nacht bei 37° C geschüttelt. Am nächsten Tag wird die Kultur bei 37° C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 – 0.8 angezogen. Bei der Expression schwerlöslicher Proteine hat es sich bewährt, die gesamte Expression bei RT durchzuführen. Die Expression des Proteins wird durch Zugabe von 0.5 – 2 mM IPTG induziert. Arbeitet man mit pET-Expressionsvektoren wird Zinkchlorid in einer Endkonzentration von 1 µM zugegeben. Bei Plasmiden, die β-Lactamase als Resistenzmarker exprimieren, wird zusätzlich nochmals frisches Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) zugegeben.

Nach weiteren 4 h Wachstum werden die Zellen im GSA-Rotor abzentrifugiert (15 min, 3500 rpm, 4° C) und anschließend das Naßgewicht des Bakteriensediments bestimmt. Die Zellen können vor ihrer Weiterverarbeitung an dieser Stelle bei -20° C gelagert werden.

Der Verlauf der Induktion wird durch stündliche Probenentnahme dokumentiert. Dazu werden jeweils 1 OD600 Zellsuspension entnommen, in der Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert (30 s, 14000 rpm, RT), und in 40 µl 2x Harnstoff-Auftragspuffer aufgenommen. Die entnommenen Proben erhitzt man 2 min bei 95° C und mischt kräftig auf dem Vortex. Schließlich werden die Proben kurz auf Trockeneis eingefroren. Diese Prozedur wird dreimal wiederholt, wobei die chromosomale DNA soweit fragmentiert wird, daß die Proben ihre hohe Viskosität verlieren. Auf einem SDS-Proteingel (Abschnitt 3.9.2.) werden jeweils 15 µl Aliquots analysiert.

<b>2x Harnstoff-Auftragspuffer:</b>	150 mM Tris-HCl, pH 6.8
	8 M Harnstoff
	4 % (w/v) SDS
	0.5 % (w/v) Bromphenolblau
	20 mM β-Mercaptoethanol

### 3.13.3.2. Native Aufarbeitung

Für die native Reinigung des überexprimierten Proteins suspendiert man die Bakterien in 4 ml Lysis-Puffer pro Gramm Naßzellgewicht, dem folgende Proteaseinhibitoren frisch zugesetzt worden sind: Leupeptin (in 50 mM Hepes-KOH, pH 7.6) ad 2 µg/ml, Aprotinin (in 50 mM Hepes-KOH, pH 7.6) ad 2 µg/ml, Pepstatin A (in DMSO) ad 1 µg/ml, Benzamidin (in DMSO) ad 0.1 mM, EDTA ad 1 mM (0.2 mM bei anschließender Chromatographie über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulen) und PMSF (in DMSO) ad 1 mM. Als Reduktionsmittel werden in der Regel 20 mM β-Mercaptoethanol (5 mM bei anschließender Chromatographie über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulen) verwendet. Dieser und alle folgenden Arbeitsschritte werden im Kühlraum auf Eis durchgeführt.

Die Zellen werden mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier W 250, spitze Form r = 0.25 cm). Dabei ist es hilfreich eine Spatelspitze Lysozym zuzusetzen. Die Bakteriensuspension wird in einem 50 ml Falconröhrchen eisgekühlt dreimal 5 min bei einer Pulsdauer von 30 % und einer Pulsstärke von 3 Einheiten auf der Geräteskala beschallt, wobei zwei Pausen von jeweils 5 min eingelegt werden. Das leicht bewegliche Lysat wird 30 min in einem SS34-Rotor zentrifugiert (30 min, 18000 rpm, 4° C). Je ein Aliquot vom Überstand und Sediment wird für eine SDS-PAGE abgezweigt. Der pH-Wert des Lysats wird mit pH-Papier überprüft, und gegebenenfalls auf pH 7.9 (4° C) nachgestellt.

Soll das Bakterienlysat auf vorgepackte Säulen geladen werden, wird das Lysat 1.5 h bei 4° C und 100000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Optional schließt sich hier eine Ammoniumsulfatfällung an, die sich bei der Aufreinigung rekombinanter Transkriptionsfaktoren bewährt hat (Hoffmann und Roeder, 1991; Pognonec *et al.*, 1991). Zum Überstand wird langsam ein Volumenanteil (20 ml) eiskaltes 20 mM Tris-HCl, pH 7.3 unter Rühren zugegeben. Man tropft über einen Zeitraum von 30 min einen Volumenanteil (20 ml) gesättigte Ammoniumsulfatlösung (pH 7.5) unter ständigem Rühren zu (Endkonzentration 33 %). Danach wird die Lösung für 1 h weitergerührt. Das Präzipitat der Fällung wird in einem SS34-Rotor abzentrifugiert (30 min, 18000 rpm, 4° C), der verbleibende Überstand wird bei 4° C aufgehoben. Je ein Aliquot vom Überstand und Sediment wird für die Analyse mittels SDS-PAGE entnommen, wobei der Überstand wegen seines hohen Salzgehalts vor der Analyse gegen BC100 dialysiert werden muß.

**Lysis-Puffer:** 10 % (v/v) Glycerin  
500 mM NaCl  
20 mM Tris-HCl, pH 7.3 bei RT  
oder pH 7.5 bei RT für anschließende Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie  
0.1 % (v/v) Igepal CA630  
Zugabe von Reduktionsmittel und Proteaseinhibitoren: siehe Text

### 3.13.3.3. Denaturierende Aufarbeitung

Man nimmt die Zellen in 5 ml Puffer A pro g Bakteriensediment auf, mischt, und inkubiert 30 min bei RT unter sanftem Schwenken, bis die vollständige Lyse der Zellen eingetreten ist. Unlösliche Membran- und Lipidanteile werden abzentrifugiert (SS34, 18000 rpm, 15 min), der Überstand wird bei 4° C gelagert. Für die denaturierende Aufarbeitung hat es sich bewährt, bei 37° C eine so starke Überexpression des rekombinanten Proteins herbeizuführen, daß es größtenteils in den Bakterien als Einschlußkörpern vorliegt. Diese lassen sich durch wiederholte Ultraschallbehandlung (siehe unten) aufreinigen, da hierbei nur zelluläre Proteine in Lösung gehen, nicht aber die Einschlußkörper. Meist wird nach dreimaliger Ultraschallbehandlung ein weißes Sediment erhalten, das in 20 ml Lysis-Puffer D gelöst wird.

**Lysis-Puffer D:** 6 M Guanidiniumhydrochlorid  
0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0.01 M Tris  
pH mit NaOH auf 8.0 einstellen  
durch Faltenfilter filtrieren  
Zugabe von Reduktionsmittel bzw. Proteaseinhibitoren

### 3.13.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

#### 3.13.4.1. Bradford-Bestimmung

Die Proteinkonzentration von Proteingemischen kann nach der Methode von Bradford bestimmt werden. Zunächst wird eine Eichkurve mit BSA erstellt. Der Nachweis beruht auf der Beobachtung von Bradford, wonach das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliantblau nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Für die Eichkurve werden 1 - 20 µg BSA mit 1 ml 1:5 mit Wasser verdünnter und filtrierter Farblösung (Coomassie Brilliantblau, Phosphorsäure, Methanol) gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation wird die Extinktion bei 595 nm gegenüber dem Leerwert bestimmt. Mit den Proteinproben wird analog verfahren und die Proteinkonzentration aus der Eichkurve abgelesen. Erfahrungsgemäß ergibt sich aus einer Proteinkonzentration von 5 µg/ml eine  $A_{595}$  von 0.2.

#### 3.13.4.2. Photometrische Bestimmung nach Ehresmann

Aus den UV-spektroskopisch bestimmten Extinktionen bei den Wellenlängen 228.5 und 234.5 nm kann mit Hilfe folgender Gleichung die Proteinkonzentration errechnet werden:

$$\text{Konzentration}/[\text{mg/ml}] = (A_{228.5} - A_{234.5})/3.14$$

#### 3.13.4.3. Photometrische Bestimmung nach Gill und von Hippel

Der molare Extinktionskoeffizient von Proteinen kann aus der Aminosäuresequenz bestimmt werden (Gill und von Hippel, 1989) Der Berechnung liegt folgende Gleichung zu Grunde:

$$\epsilon_M \approx a \cdot \epsilon_{M,\text{Tyr}} + b \cdot \epsilon_{M,\text{Trp}} + c \cdot \epsilon_{M,\text{Cys}}$$

$\epsilon_M$  := molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm,  $\epsilon_{M,\text{Tyr}}$ ,  $\epsilon_{M,\text{Trp}}$ ,  $\epsilon_{M,\text{Cys}}$  := molare Extinktionskoeffizienten des entsprechenden Aminosäurerestes (Tyrosin, Tryptophan, Cystein) bei 280 nm. Die Variablen a, b und c geben die Anzahl der jeweiligen Aminosäurereste im Protein an. Für eine reine Proteinpräparation läßt sich (bei bekannter Aminosäuresequenz) mit dem Lambert-Beerschen Gesetz die Proteinkonzentration bestimmen.

$$c = A_{280}/\epsilon_{280} \cdot d$$

c:= Konzentration [M,],  $A_{280}$ := Absorption bei 280 nm, d:= Schichtdicke der Küvette in [cm]

### 3.13.5. Säulenchromatographie

Für die Chromatographie werden Säulen entweder mit Säulenmaterial beschickt oder es werden bereits fertig gepackte Säulen verwendet, die an das FPLC-, ÄKTA- oder SMART-System (APB) angekoppelt werden. Selbstgepackte Säulen werden zumeist über eine P1-Pumpe (APB) betrieben. Die einzelnen Chromatographieschritte werden, wenn möglich photometrisch ( $A_{280}$ ,  $A_{215}$ ) verfolgt, und die Säuleneluate fraktioniert gesammelt. Da die Dimensionierung einer Säule von der spezifischen Bindungskapazität sowie der Proteinbeladung abhängt, werden die verwendeten Volumina an Puffer und die Flußraten auf das Säulenvolumen (engl. „*column volume*“, CV) bezogen. Chromatographieschritte am SMART-System werden stets mit modifizierten Standardpufferrezepten durchgeführt, die nur 10 % (v/v) Glycerin enthalten, was die Viskosität des Laufmittels herabsetzt. Alle Puffer werden vor ihrer Verwendung im Vakuum entgast und durch Filtration über Celluloseacetatfilter (0.45  $\mu\text{m}$  Millipore) von makroskopischen Partikeln befreit.

#### 3.13.5.1. Phosphocellulosechromatographie

Das Kationenaustauschermaterial Phosphocellulose wird in einem Fraktionierungsschema nach Roeder und Kollegen (Matsui *et al.*, 1980) als erstes eingesetzt, um die generellen Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren in einem HeLa-Kernextrakt chromatographisch aufzutrennen. Phosphocellulose weist darüber hinaus eine hohe Proteinbindungskapazität auf (10 – 20 mg/ml) und eignet sich daher auch gut zum Konzentrieren von Lösungen mit niedrigem Proteingehalt.

- **Vorbereiten des Säulenmaterials:** Das Phosphocellulosematerial (P11, Whatman) wird in Wasser gequollen und mehrmals mit Wasser gewaschen. Dabei läßt man das Säulenmaterial durch Gravitation absetzen. Es werden 25 Volumina (bezogen auf das gequollene Material) 0.5 N NaOH zugegeben und nach 5 min über eine Fritte im Membranpumpenvakuum abgesaugt. Das Material wird im Wasser gewaschen, bis der Durchlauf einen pH-Wert von 11 erreicht hat. Nun wird die Phosphocellulose mit 25 Volumenanteilen 0.5 N HCl für 5 min inkubiert, welche dann ebenfalls abgesaugt wird. Man wäscht so lange mit Wasser, bis ein pH-Wert von 3 erreicht ist. Das Material wird über Nacht in 1 M Tris-HCl, pH 7.0 äquilibriert, bis der pH-Wert konstant bei pH 7.0 bleibt. Das Säulenmaterial kann so bei 4° C für mehrere Wochen aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung sollte in Phosphatpuffer erfolgen.

- **Chromatographie:** Eine Leersäule („*Econo column*“, BioRad) wird mit dem in BC100 äquilibrierten Phosphocellulosematerial unter Gravitationsfluß beschickt, so daß sich ein

kontinuierliches homogenes Säulenbett bildet. Auch die Säulendimension ist (wie generell bei der Ionenaustauscherchromatographie) entscheidend für den Erfolg. Gute Ergebnisse erzielen Säulen mit einem großen relativen Verhältnis von Säulendurchmesser zu Säulenlänge. Die Menge des Säulenmaterials richtet sich nach der zu ladenden Proteinmenge, wobei unter den gewählten Bedingungen (100 mM KCl, Extraktvolumen:Säulenvolumen ungefähr 1:1) ca. 50 % des Gesamtproteins eines Kernextraktes an die Säule binden. Der Kernextrakt wird mit einer konstanten Flußrate von 1 CV/h geladen. Die Säule wird mit 10 CV BC100 bei einer Flußrate von 5 CV/h gewaschen. Nachfolgende Elutionsschritte werden bei 3 CV/h realisiert, Waschschriffe generell bei 5 CV/h. Die drei Stufenelutionen werden mit BC300, BC500 und BC850 durchgeführt. Das 0.3 M KCl-Eluat enthält ca. 35 %, das 0.5 M KCl-Eluat ca. 10 % und das 0.85 M KCl-Eluat ca. 4 % des Gesamtproteins.

### 3.13.5.2. DEAE-Cellulose-Chromatographie an DE52

Das schwache Anionentauschermaterial DEAE-Cellulose DE52 (Whatman) eignet sich gut um Transkriptionsfaktoren aufzutrennen. Die Proteinbindungskapazität ist mit 4 – 10 mg/ml durchschnittlich.

- **Vorbereiten des Säulenmaterials:** 100 g DE52-Material werden mehrmals in Wasser gewaschen. Dabei läßt man das Säulenmaterial durch Gravitation absetzen. Anschließend wird das Säulenmaterial über Nacht in 500 ml Puffer (0.5 M Tris-HCl, pH 7.3; 0.5 M Ammoniumsulfat, pH 7.9) äquilibriert. Es kann bei 4° C und 0.02 % Azid über mehrere Wochen gelagert werden. Nach Abziehen des Puffers über eine Fritte im Pumpenvakuum, wird das Material mehrfach mit BC-Puffer der gewünschten Ionenstärke gewaschen.
- **Chromatographie:** Eine Leersäule („*Econo column*“, BioRad) wird mit äquilibriertem Säulenmaterial unter Gravitationsfluß beschickt. Die Menge des Säulenmaterials richtet sich nach der zu ladenden Proteinmenge. Für eine optimale Auftrennung sollte man aber eine Bindungskapazität von 4 – 5 mg/ml annehmen. Die Säule wird mit einer konstanten Flußrate von 1 – 2 CV/h beladen, mit 10 CV Äquilibrierungspuffer bei einer Flußrate von 5 CV/h gewaschen und mit einem Gradienten von 5 bis 10 CV bei einer Flußrate von 3 CV/h eluiert.

### 3.13.5.3. Kationenaustauscherchromatographie

Als starke Kationentauscher wurden vorgefertigte Säulen (mit Sulfonsäuregruppen als funktionelle Gruppen) verwendet, die aufgrund der homogenen Zusammensetzung ihrer Partikel, eine hohe Auflösung gewährleisten (Mono S, APB).

Ausmaß und Stärke der Bindung eines Proteins an den Ionentauscher hängt von pH und Ionenstärke des Puffers, dem isoelektrischen Punkt des Proteins und der Dichte der Ladungen auf der Säulenmatrix ab. Die besten Reinigungsfaktoren erhält man, wenn man die Säulen an der Kapazitätsgrenze für das zu reinigende Protein fährt.

#### **3.13.5.4. Anionenaustauscherchromatographie**

Als starke Anionentauscher wurden vorgefertigte Mono Q-Säulen (APB) eingesetzt, die quartäre Amine als funktionelle Austauscherguppen enthalten. Es gilt sonst das gleiche, was über die Kationenaustauscherchromatographie gesagt wurde.

#### **3.13.5.5. Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration)**

Die Gelfiltration ist neben der Proteinreinigung auch dazu geeignet, native Größen von Proteinen oder Proteinkomplexen abzuschätzen, allerdings nur unter der Voraussetzung, daß diese eine überwiegend globuläre Struktur aufweisen. Es wurden die Säulen Superose 6 und Superose 12 für das SMART-System, sowie Superdex 75 für die FPLC eingesetzt.

#### **3.13.5.6. Nickel-NTA-Affinitätschromatographie**

Als Säulenmaterial wird mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beladene immobilisierte Nitrilotetraessigsäure (NTA) verwendet. NTA besetzt vier der sechs Ligandenbindungsstellen in der Koordinationssphäre des  $\text{Ni}^{2+}$ -Ions. An die verbleibenden zwei Koordinationsstellen binden mit hoher Affinität rekombinante Proteine, die als Fusionsproteine mit einem Hexahistidinrest exprimiert werden. Die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose wird in eine Econo-Säule von BioRad gepackt und nacheinander mit  $\text{H}_2\text{O}$  (bidest.) und Lysis-Puffer gewaschen. Als Pumpe wird das Modell P1 (Pharmacia) verwendet. Das klare Bakterienlysat wird vor dem Laden der Säule mit Imidazol, pH 7.9 (ad 5 mM) angereichert, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Das Lysat wird mit 2 CV/h auf die Säule geladen. Anschließend wird mit 20 CV Nickel-Waschpuffer I (5 mM Imidazol) und mit 20 CV Nickel-Waschpuffer II (15 - 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution erfolgt mit Nickel-Elutionspuffer. Es werden Fraktionen von 1/2 CV gesammelt, photometrisch auf ihre Proteinkonzentration überprüft und die Proteine in der SDS-PAGE analysiert. Die Eluate mit der höchsten Proteinkonzentration (in der Regel 3) werden vereinigt und entweder gegen einen gewünschten Puffer dialysiert, oder verdünnt, um die Ionenstärke zu reduzieren.

---

<b>Nickel-Waschpuffer I:</b>	20 mM Tris-HCl (pH 7.5, bei RT) 500 mM NaCl 5 mM Imidazol 20 % (v/v) Glycerin 0.1 % (v/v) Igepal CA630 0.2 mM EDTA
<b>Nickel-Waschpuffer II:</b>	wie Nickel-Waschpuffer I aber 15 – 30 mM Imidazol da die Affinität des Hexahistidinrestes zur Matrix von der jeweiligen Proteinstruktur abhängt, muß die optimale Imidazolkonzentration für jedes Protein experimentell getestet werden
<b>Nickel-Elutionspuffer:</b>	20 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei RT) 500 mM NaCl 200 mM Imidazol 20 % (v/v) Glycerin 0.1 % (v/v) Igepal CA630
<b>Bei Puffern frisch zugeben:</b>	1 mM PMSF 0.1 mM Benzamidin 5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A ad 1 $\mu$ g/ml

### 3.13.5.7. Glutathion-Sephrose-Chromatographie

Die Chromatographie findet diskontinuierlich im *Batch*-Modus statt. Die Proteinlösung, die das jeweilige Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein enthält, wird in einem Falconröhrchen mit Glutathion-Sephrose 4B (Proteinbindungskapazität 5 – 10 mg/ml), die im entsprechenden Puffer äquilibriert wurde, vermischt. Der Ansatz wird für 4 h bei 4° C auf einem Drehrad inkubiert, anschließend abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R, 1200 rpm, 5 min, 4° C). Das sedimentierte Säulenmaterial, an welches spezifisch das GST-Fusionsprotein gebunden hat, wird 3x mit je 50 CV BC500/1% (v/v) Igepal CA630 gewaschen (jeweils 10 min, Drehrad). Das Säulenmaterial wird bei allen Waschschrritten für 3 min, 1200 rpm, bei 4° C abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R). Das Verfahren wird mit BC1000/0.1% (v/v) Igepal CA630 und BC2000/0.1% (v/v) Igepal CA630 wiederholt. Allerdings dauern die Waschschrritte 30 min. Schließlich wird die beladene Glutathion-Sephrose in 4x CV BC2000 aufgenommen und kann so einige Wochen bei 4° C aufbewahrt werden.

Sollt das GST-Fusionsprotein anschließend von der Matrix eluiert werden, wird folgendermaßen verfahren: Das Säulenmaterial wird abzentrifugiert, der überstehende Puffer verworfen und die Matrix in BC100 äquilibriert. Die Elution wird mit 5x 1 CV BC100/10 mM Glutathion durchgeführt (15 min, 4° C, Drehrad).

Die Eluate werden jeweils nach Zentrifugation abgenommen und anschließend photometrisch sowie mittels SDS-PAGE analysiert. Eluate mit der Hauptmenge an GST-Fusionsprotein (in der Regel 2) werden vereinigt, gegebenenfalls dialysiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Allen Puffern wird frisch 1 mM PMSF, 0.1 mM Benzamidin, 1 mM DTT sowie Aprotinin und Leupeptin ad 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zugegeben.

Glutathion oxidiert leicht und muß daher frisch eingewogen werden. Es empfiehlt sich eine 100 mM Stammlösung in 200 mM Tris-HCl, pH 7.3 anzusetzen (pH-Kontrolle! mit NaOH auf pH 7.3 einstellen).

### 3.13.5.8. Heparin-Sepharose-Chromatographie

Mit einer Heparin-Sepharosematrix lassen sich viele rekombinante DNA-bindende Proteine mit einem im basischen liegenden isoelektrischen Punkt gut von *E. coli*- Proteinen abtrennen. Deshalb schließt sich der Nickelsäule oft eine Heparinsäule an, wenn hohe Reinheitsgrade einer Proteinpräparation gefordert sind. Mit einer Proteinbindungskapazität von 10 mg/ml eignet sich dieser Kationenaustauscher mit den Eigenschaften eines DNA-Analogons auch gut zum Konzentrieren einer Proteinlösung. Ausgewählte Elutionsfraktionen, z.B. einer Nickel-NTA-Säule, werden vereinigt und weiter aufgereinigt. Heparin-Sepharose CL-6B (APB) wird in eine Econo-Säule (BioRad) gepackt, mit  $\text{H}_2\text{O}$  (bidest.) gewaschen und in einem entsprechenden Puffer äquilibriert. Die Säule wird mit 2 CV/h beladen. Nach dem Waschen mit 20 CV Heparin-Waschpuffer werden die gebundenen Proteine mit Heparin-Elutionspuffer eluiert (Fraktionsgröße 1/2 CV). Die Eluate werden anschließend sowohl photometrisch als auch durch SDS-PAGE kontrolliert. Die Proteinlösungen werden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

<b>Heparin-Waschpuffer:</b>	20 mM Tris-HCl (pH 7.3 bei RT) 1 mM EDTA 200 mM KCl 20 % (v/v) Glycerin
<b>Heparin-Elutionspuffer:</b>	20 mM HEPES (pH 7.3 bei RT) 1 mM EDTA 500 mM KCl 20 % (v/v) Glycerin
<b>Bei Puffern frisch zugeben:</b>	5 mM DTT 0.2 mM PMSF 0.1 mM Benzamidin Aprotinin, Pepstatin A und Leupeptin ad 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

### 3.13.6. Affinitätschromatographie an immobilisierten GST-Fusionsproteinen

#### 3.13.6.1. Herstellung der Säulen

Die Herstellung der Säulen erfolgt im Prinzip wie unter 3.13.5.7. beschrieben. Die Säulen werden mit der entsprechenden Menge an GST-Fusionsprotein beladen, so daß sich eine finale Konzentration von 1 – 3 mg/ml Säulenmaterial ergibt. Es werden Affinitätssäulen bestehend aus den GST-Fusionen mit den folgenden Aktivierungsdomänen (siehe Abschn. 1.2.5.2.) verwendet: GST-VP16, GST-VP16:H1, GST-VP16:H1(F442P Mutante), GST-VP16:H2, GST-VP16:H2 (F473A, F475A, F479A Mutante). Die „Mutanten“-Säulen dienen dabei als Spezifitätskontrolle, um Proteine auszuschließen, die aufgrund von Ionenauschereffekten an die Affinitätsfunktion binden. Um GST-bindende Proteine zu entfernen, wird GST-Glutathion-Sepharose (2 mg/ml) als „Vorsäule“ verwendet. Die Säulen werden vor ihrem Einsatz in HEGN100-Puffer (Abschn. 2.5.1.) äquilibriert.

Der Einsatz von GST-Fusionsproteinen hat sich bewährt, da so eine gerichtete Bindung der Affinitätsgruppe an die Säulenmatrix stattfindet. Zudem dimerisiert GST, was zu einer relativen räumlichen Nähe zweier Affinitätsgruppen führt.

#### 3.13.6.2. Durchführung

Alle Schritte werden auf Eis bzw. im Kühlraum im *Batch*-Modus durchgeführt, sofern nicht anders spezifiziert. Um eine unspezifische Bindung von Proteinen an die Oberfläche der Reaktionsgefäße zu verhindern, werden silikonisierte Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet. Die Säulen wurden mit HeLa-Kernextrakt (pH 6.8 bei RT, 7 – 10 mg/ml Gesamtprotein; Abschn. 3.13.1.1.) oder Phosphocellulose P11-Fraktionen (pH 7.3 bei RT; Abschn. 3.13.5.1.) beladen, welche folgende Pufferbedingungen aufwiesen: 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 20 % (v/v) Glycerin, 0.2 mM EDTA, 1 mM PMSF und 5 mM DTT). Zu Beginn der Affinitätschromatographie wurden die Proben auf 20 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 0.1 % (v/v) Igepal CA630, 0.1 mM Benzamidin, 0.2 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin und 1 µg/ml Leupeptin eingestellt, und für 5 min bei 4° C zentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 rpm) um unlösliche Bestandteile zu sedimentieren.

Die jeweiligen Proben werden in einem Volumen von 20 CV GST-Glutathionsepharose für 2 h bei 4° C auf dem Drehrad inkubiert. Zur Sedimentation des Säulenmaterials wird bei allen Schritten zentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 2000 g, 2 min, 4° C). Überstände werden mit einer 1 ml Pipette abgenommen, wobei ein Verlust von Säulenmaterial unbedingt zu vermeiden ist. Im nächsten Schritt werden die Proben entweder direkt auf eine der GST-VP16 Affinitätssäulen aufgetragen (3 – 4 h, 4° C, Drehrad), oder zuerst mit den entsprechenden „Mutanten“-Säulen für 1 – 2 h bei 4° C (Drehrad) inkubiert.

Die besten Reinigungsergebnisse erzielt man, wenn man ein Verhältnis von Probenvolumen zu CV von 25 – 50:1 wählt. Der Durchfluß einer „Mutanten“-Säule wird im nächsten Schritt auf die entsprechende GST-VP16 Säule aufgetragen (3 – 4 h, 4° C, Drehrad). Alle Säulen werden dann mit 3x 40 CV HEGN100-Puffer gewaschen, und in einem ersten Elutionsschritt mit 2x 1.25 CV HEGN500-Puffer eluiert (Inkubationszeit je 15 min). Die beiden Eluate werden vereinigt und auf Eis gestellt. Nun werden die Säulen mit 2x 40 CV HEGN500 gewaschen und schließlich mit HEGN100 äquilibriert. Die GST-Fusionsprotein-Säulen werden abschließend mit 2x 1.25 CV HEGN100/0.2 % (w/v) N-Laurylsarcosin eluiert (Inkubationszeit je 15 min). Sollen die Polypeptide nativ eluiert werden, wird HEGN100/10 mM Glutathion als Elutionspuffer verwendet. Die Eluate werden in der Regel vereinigt und auf Eis gestellt. Die einzelnen Elutionsschritte werden in der SDS-PAGE und im Western Blot analysiert und nach Wegfrieren in flüssigem Stickstoff bei –80° C gelagert.

Allen Puffern wird 0.2 mM PMSF, 0.1 mM Benzamidin, 1 mM DTT, sowie Aprotinin und Leupeptin ad 1 µg/ml zugesetzt.

### 3.13.7. Immunaffinitätschromatographie

Die Immunaffinitätschromatographie ist eine Technik, bei der Antikörper auf einer Matrix als funktionelle Affinitätsgruppe immobilisiert werden. Bei Inkubation mit einem Proteingemisch finden spezifische Interaktionen nur mit denjenigen Proteinen statt, deren Epitope die Antigenbindungsstelle des Antikörpers erkennt. Dies ermöglicht die gezielte Isolierung einzelner Proteine aus einem Gemisch. Interagieren jedoch andere Proteine in der Lösung stark genug mit dem vom Antikörper gebundenen Protein, was meist abhängig von den Pufferbedingungen (z.B. Ionenstärke) ist, so werden diese ebenfalls isoliert. Man spricht dann von Co-Imm unreinigung. Diese Technik kann auch dazu benutzt werden, Proteinkomplexe zu isolieren und Wechselwirkungen zwischen Proteinen nachzuweisen, sofern die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung nicht mit den anderen Protein-Protein-Interaktionen interferiert.

#### 3.13.7.1. Herstellung der Säulen

Als Matrix wird Protein G Sepharose oder Protein A Sepharose verwendet, auf deren Oberfläche bakterielle Proteine gebunden sind, die spezifisch die konstante Region von Immunglobulinen binden. Protein G und Protein A wurden ursprünglich aus *Streptococcus aureus* isoliert. Diese Interaktion ermöglicht eine Kopplung aller gängigen IgG-Immunglobuline an das Säulenmaterial. Allerdings unterscheiden sich Protein G und Protein A in ihrer Präferenz für Immunglobuline verschiedener Spezies. Eine Übersicht findet sich in Tab. 8. Diese Form der Immobilisierung des Antikörpers hat den Vorteil, daß sie gerichtet ist, und die Antigenbindungsstelle eine freie Zugänglichkeit aufweist.

Antikörperquelle	Interaktion mit Protein A	Interaktion mit Protein G
<b>Monoklonale Antikörper</b>		
Maus IgG1		+
Maus IgG2a, IgG2b, IgG3	+	
Ratte		+
<b>Polyklonale Antikörper</b>		
Kaninchen	+	
Ziege		+

**Tab. 8:** Bindung verschiedener Immunglobuline an Protein A oder Protein G.

Für alle Arbeiten mit nativen Proteinen werden silikonisierte Reaktionsgefäße verwendet. Protein G oder Protein A Sepharose wird in aufeinanderfolgenden Schritten mit H<sub>2</sub>O (bidest.) und 1x PBS äquilibriert. Die Bindungsreaktion findet in Bindungspuffer bei RT ÜN statt. Es können Antikörper in unterschiedlicher Dichte auf der Säule immobilisiert werden, indem man das Verhältnis Säulenvolumen (ml) : absolute Antikörpermenge (mg) variiert. Dabei wird bis zu einer Dichte von 2 mg/ml davon ausgegangen, daß alle Antikörper quantitativ von Protein A bzw. Protein G gebunden werden. Standardmäßig kommen Affinitätssäulen mit 2 mg Antikörper pro ml Gelbett zum Einsatz. Bei Hybridomaüberständen (Immunglobulinkonzentration ca. 50 µg/ml) wird dieser daher in einem Verhältnis von vier CV eingesetzt. Nach der Inkubation und in allen folgenden Schritten wird durch Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3L-R, 900 rpm, 2 min, 4° C) der Überstand abgetrennt. Das Säulenmaterial wird zunächst dreimal mit 10 CV 1x PBS gewaschen. Dem schließt sich ein Waschschrift mit 3x 10 CV 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)/500 mM NaCl an, gefolgt von einem Waschschrift mit 3x 10 CV 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). Schließlich wird die Säule in 1x PBS äquilibriert. Um das Material gegen mikrobielles Wachstum zu schützen kann man 0.01 % (w/v) NaN<sub>3</sub> zusetzen. Aufbewahrt wird das Säulenmaterial als 1:4-Suspension in 1x PBS bei 4° C.

Sollen die gebundenen Proteine mit denaturierenden Chemikalien eluiert werden, so kann es hilfreich sein, die Antikörpermoleküle kovalent an die Säule zu koppeln, da das Eluat ansonsten oft Antikörperketten enthält, die bei der Silberfärbung stören oder im Western Blot Kreuzreaktionen verursachen können. Für die kovalente Kopplung äquilibriert man die an Protein A oder Protein G Sepharose gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 10 CV 0.2 M Natriumboratpuffer (pH 9.0). Die Säule wird daraufhin in 10 CV Kopplungspuffer aufgenommen und für 30 min bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Der verwendete Quervernetzer (Dimethylpimelimidat) bindet kovalent an freie Aminogruppen des Antikörpers und der Protein A/G-Säule. Die Konzentration ist so gewählt, daß intramolekulare bzw. multiple Quervernetzungsreaktionen minimiert werden. Anschließend wird das Material mit 10 CV 0.2 M Natriumboratpuffer gefolgt von 10 CV 0.2 M Ethanolamin (pH 8.0) gewaschen und danach für zwei Stunden bei RT in 10 CV 0.2 M Ethanolamin (pH 8.0) inkubiert (Drehrad).

Durch fünfmaliges Waschen mit 10 CV 1x PBS wird das Material für die Lagerung äquilibriert, die in 1x PBS mit 0.01 %  $\text{NaN}_3$  bei 4° C erfolgt. Zur Kontrolle der kovalenten Kopplung entnimmt man vor und nach der Quervernetzung 10  $\mu\text{l}$  Säule und analysiert diese durch Elution mit 1x SDS-Puffer und SDS-PAGE.

**Bindungspuffer:** 25 mM Hepes-KOH, pH 7.6  
1 % (v/v) Glycerin  
0.05 % (v/v) Igepal CA630  
150 mM KCl

**Kopplungspuffer:** 0.2 M Natriumborat, pH 9.0  
25 mM Dimethylpimelimidat  
frisch einwiegen

Hybridomaüberstände werden auf diesen Puffer eingestellt.

### 3.13.7.2. Durchführung

Alle Arbeitsschritte werden bei 4° C im Batch-Modus durchgeführt. Das Affinitätssäulenbett wird in silikonisierte Reaktionsgefäße vorgelegt und durch dreimaliges Waschen in 50 CV IP-Puffer, gefolgt von 50 CV IP-Waschpuffer und wiederum 50 CV IP-Puffer äquilibriert. Das Säulenmaterial wird zwischen den Schritten zentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 2000 g, 2 min, 4° C) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Auch bei der Immunaффinitätsreinigung ist es wichtig Spezifitätskontrollen einzubauen. Dabei werden Protein A bzw. Protein G Sepharose und ein immobilisierter Kontrollantikörper (Protein A/G Sepharose) als „Vorsäulen“ verwendet. Bei polyklonalen Antikörpern verwendet man entweder Präimmenserum oder einen Antikörper aus der gleichen Spezies. Bei monoklonalen Antikörpern verwendet man Kontrollantikörper, aus der gleichen Spezies mit dem gleichen IgG-Isotyp. Im Idealfall erkennt der Kontrollantikörper kein Protein in der zu reinigenden Proteinmischung.

Die Probe wird für jeweils 1 h mit Protein A bzw. Protein G Sepharose und dann mit dem immobilisierten Kontrollantikörper vorinkubiert. Die Säulenmenge orientiert sich dabei an der Dimension der nachfolgenden Immunaффinitätssäule. Nun wird die Probe auf die Affinitätssäule aufgetragen. Dabei haben sich folgende Bedingungen bewährt: 10  $\mu\text{l}$  der Antikörpersäule (2 mg/ml) werden mit 200  $\mu\text{g}$  Kernextraktprotein in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  beladen. Phosphocellulose-Fractionen werden in einem Verhältnis von 50 – 75 CV, noch weiter gereinigte Fractionen (z.B DE52 Eluate) in einem Verhältnis von 100 CV eingesetzt. Die Inkubation erfolgt für mindestens 3 h bei 4° C auf dem Drehrad. Die Säule wird dreimal mit 50 CV IP-Puffer, dreimal mit 50 CV IP-Waschpuffer und einmal mit 50 CV IP-Puffer gewaschen. Anschließend kann das Säulenmaterial direkt in einem *in-vitro*-Testsystem (z.B. *in-vitro*-Transkription) analysiert, oder durch pH-Sprung mit 2 CV Citratpuffer eluiert werden. Der pH-Wert des Eluats wird sogleich durch Zugabe von 1/10 Volumen 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) neutralisiert. Alternativ kann eine Elution mit 1 CV 2x SDS-Auftragspuffer unter nicht reduzierenden Bedingungen (5 min, 30° C) erfolgen.

Dem Eluat wird dann vor der SDS-PAGE  $\beta$ -Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 20 mM zugesetzt. Für kleine Elutionsvolumina bzw. hohe Proteinkonzentrationen hat sich die Elution in Millipore Ultrafree MC-Reaktionsgefäßen bewährt.

<b>IP-Puffer:</b>	20 mM Tris-HCl, pH 7.3	<b>IP-Waschpuffer:</b>	20 mM Tris-HCl, pH 7.3
	20 % (v/v) Glycerin		20 % (v/v) Glycerin
	150 mM KCl		300 – 1000 mM KCl
	0.1 % (v/v) Igepal CA630		0.1 % (v/v) Igepal CA630
	0.2 mM EDTA		0.2 mM EDTA
	0.25 mM DTT		0.25 mM DTT

Den Puffern wird 0.2 mM PMSF, 0.1 mM Benzamidin und Aprotinin, Leupeptin sowie Pepstatin A ad 1  $\mu$ g/ml zugesetzt.

**Citratpuffer:** 0.1 M Natriumcitrat, pH 2.7 (Stammlösung)  
zum Gebrauch 1:3 in H<sub>2</sub>O (bidest.) verdünnen

### 3.13.8. Reinigung von Transkriptionsfaktoren

- **TFIIB:** Die Reinigung von rekombinantem TFIIB (N-terminaler Hexahistidin-Tag) erfolgt durch Chromatographie an Nickel-NTA-Agarose (Abschn. 3.13.5.6.) und Heparin-Sepharose (Abschn. 3.13.5.8.). Das an Nickel-NTA-Agarose gebundene Protein wird bei einer Imidazolkonzentration von 15 mM gewaschen und bei einer Imidazolkonzentration von 200 mM eluiert. Das Protein wird bei einer Ionenstärke von 0.1 M KCl auf Heparin-Sepharose geladen, mit einem Puffer, der 0.2 M KCl enthält gewaschen, und bei einer Ionenstärke von 0.4 M KCl eluiert.
- **TFIIE $\alpha$ :** Vor dem Laden auf eine Nickel-NTA-Agarose Säule wird das Protein mit 33 % Ammoniumsulfat gefällt. Nach der Bindung an die Metallchelatsäule wird bei einer Imidazolkonzentration von 30 mM gewaschen, und bei einer Imidazolkonzentration von 200 mM eluiert. Optional kann ein weiterer Reinigungsschritt auf Heparin-Sepharose (wie bei TFIIB beschrieben) erfolgen.
- **TFIIE $\beta$ :** Optional kann das Protein vor der Metallchelatsäule mit 33 % Ammoniumsulfat gefällt werden. Nach der Bindung an Nickel-NTA-Agarose wird bei einer Imidazolkonzentration von 30 mM gewaschen, und bei einer Imidazolkonzentration von 200 mM eluiert. Die weitere Reinigung entspricht der von TFIIB.
- **TBP:** Die Reinigung erfolgt im Prinzip wie für TFIIB beschrieben. Allerdings erfolgt der Waschschrift auf der Nickel-NTA-Agarose bei 10 mM Imidazol und es wird bei einer Imidazolkonzentration von 100 mM eluiert.
- **TFIIF:** Die Expression und Reinigung erfolgt wie beschrieben (Stelzer *et al.*, 1994). Das Protein wird durch Coinfektion von SF9-Zellen mit zwei Baculoviren, die Rap74 bzw. Rap30 exprimieren, produziert.

- **TFIIA:** Es wird ein Fusionsprotein aus TFIIA $\alpha$  und TFIIA $\beta$  in *E. coli* exprimiert, sowie TFIIA $\gamma$ . Die Aufarbeitung erfolgt denaturierend in Lysis-Puffer D (Abschn. 3.13.3.3.). Die Lysate werden auf Nickel-NTA-Agarose im Batch-Modus geladen, die Säule mit 3x 50 ml Lysis-Puffer D gewaschen (jeweils 10 min, RT, Drehrad), und mit 3x 50 ml Puffer E äquilibriert. Alle Zentrifugationsschritte werden bei 2000 rpm, 3 min (Heraeus Multifuge 3L-R) durchgeführt. In acht aufeinanderfolgenden Schritten wird die Harnstoffkonzentration durch Zugabe von einem Volumenanteil Puffer F in jedem Schritt halbiert. Sobald der Puffer weniger als 2 M Harnstoff enthält wird auf Eis bzw. im Kühlraum weitergearbeitet. Die Metallchelatsäule wird schließlich in Puffer F (mit Proteaseinhibitoren) äquilibriert. Dem schließt sich das Waschen mit Puffer F/15 mM Imidazol an. Die Elution des Proteins erfolgt in Puffer F/200 mM Imidazol.
- **Reinigung von Gal94-Sp1:** Die Reinigung erfolgt wie beschrieben (Halle *et al.*, 1995)
- **Reinigung von Gal147-VP16 und Gal147-VP16 Derivaten:** Die Reinigung erfolgt wie beschrieben (Ikeda *et al.*, 2002).
- **Reinigung von Gal147-AH:** Da das Protein keinen Reinigungs-Tag aufweist erfolgt die Reinigung über 3 Stufen. Das Bakterienlysat wird mit einem Volumen eiskaltem H<sub>2</sub>O (bidest.) versetzt und fein zerstäubtes (Mörser) festes Ammoniumsulfat unter Rühren mit einem feinen Spatel bis zu einer Endkonzentration von 41 % (ca. 1.68 M) zugegeben. Man läßt die Lösung ÜN im Kühlraum weiterrühren. Das gefällte Protein wird in wenig eiskaltem BC1000 gewaschen und in eiskaltem BC200 gelöst. Nach der Dialyse (gegen BC200) erfolgt Chromatographie an Heparin-Sepharose. Das Protein wird bei einer Ionenstärke von 0.2 M KCl geladen und bei einer Ionenstärke von 0.6 M KCl eluiert. Die vereinigten Eluate werden fünffach in einer Millipore Ultrafree MC Zentrifugeneinheit (10 kDa Ausschlußgrenze) konzentriert und auf eine Superdex 75 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in BC200 entwickelt wird. Das Protein eluiert in einem Bereich von 10 bis 40 kDa. Das Protein wird – wie alle Gal-Fusionsproteine – in Gal-Puffer aufgenommen.
- **Reinigung von TFIID, USA und USA(100):** Die Reinigung erfolgt wie beschrieben (Kretzschmar *et al.*, 1994b; Meisterernst *et al.*, 1991).

<b>Puffer E:</b>	8 M Harnstoff 0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.01 M Tris 0.1 M NaCl mit NaOH auf pH 8.0 einstellen	<b>Puffer F:</b>	20 mM Tris-HCl, pH 7.5 (RT) 500 mM NaCl 20 % (v/v) Glycerin 0.2 mM EDTA 5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
<b>Gal-Puffer:</b>	20 mM Tris-HCl, pH 7.3 (RT) 20 % (v/v) Glycerin 0.1 M KCl 0.5 mg/ml acetyliertes BSA 5 mM DTT 100 $\mu$ M ZnCl <sub>2</sub> 1 mM PMSF		

## 3.14. Immunchemische Arbeitstechniken

### 3.14.1. Nachweis filtergebundener Proteine: Western-Blot

Der Immunblot dient der Identifizierung eines spezifischen Antigens mittels eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers, der gegen das Antigen gerichtet ist. Ein zweiter Antikörper bindet nachfolgend an eine konservierte Domäne des ersten Antikörpers, der seinerseits das spezifische Antigen erkennt. Da in der Regel mehrere Sekundärantikörper an die konstante Region des Primärantikörpers binden, erfolgt auf dieser Stufe eine Amplifizierung der Empfindlichkeit. An den zweiten Antikörper ist kovalent ein Enzym gekoppelt, das durch den Umsatz seiner Substrate die Detektion des „Sandwichkomplexes“ erlaubt. Als Nachweisreaktionen werden entweder die Bildung eines schwerlöslichen Farbstoffes (katalysiert durch Alkalische Phosphatase-Konjugate) oder aber die Entstehung photolabiler Komplexe verwendet, die über ihre Chemilumineszenz (katalysiert durch Meerrettichperoxidase-Konjugate) detektiert werden.

Zunächst werden die Proteinfractionen über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird das Gel unter Transferpuffer (am Vortag zubereitet und bei 6° C gelagert, was zur teilweisen Entgasung führt) mit einer Nitrocellulosemembran bedeckt, welche an allen vier Seiten des Gels 0.5 cm über dieses hinausragt. Zwischen zwei Doppellagen in Transferpuffer angefeuchtetem 3 MM Papier (Whatman) werden die Proteine in einer SemiDry Elektroblobtapparat (BioRad) auf die Nitrocellulosemembran - bei 16 x 18 cm Gelen für 45 – 60 min, bei Gelen der Dimension 10 x 11 cm für 30 min - bei 15 V und 500 mA transferiert. Dann wird die Membran kurz in H<sub>2</sub>O (bidest.) geschwenkt und in 1x TBS äquilibriert. Die Nitrocellulosemembran sollte dabei und bei allen nachfolgenden Schritten ausschließlich mit einer Pinzette angefaßt werden. Der erfolgreiche Transfer wird durch Anfärben des Blots mit 1x Ponceau S-Lösung (filtriert) überprüft, wobei die Banden des Protein-Molekulargewichtsstandards mit Bleistift angezeichnet werden. Der Blot wird durch Waschen in 1x TBS wieder entfärbt. Die Behandlung mit Ponceau S fixiert gleichzeitig die Proteine auf der Membran.

Die Membran mit den gebundenen Proteinen wird zunächst für 90 min in 1x TBS mit 6 % (w/v) Magermilchpulver bei RT (alternativ 4° C über Nacht) geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Matrix abzusättigen. Für die sich anschließende Inkubation mit dem ersten Antikörper (90 min) werden Verdünnungen von 1:500 bis 1:3000 in TBS-T mit 1 % (w/v) Milchpulver verwendet. Die Membran wird dreimal je 5 min mit TBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper wird 1:3000 bis 1:5000 verdünnt, in TBS-T mit 1 % (w/v) Milchpulver, eingesetzt. Nach Inkubation für 30 min wird die Membran dreimal mit TBS-T und anschließend dreimal mit 1x TBS für jeweils 15 min gewaschen.

• **Nachweis der Proteine über Chemoluminiszenz:**

Peroxidasegekoppelte Antikörper werden über eine photochemische Reaktion nachgewiesen. Dazu erfolgt ein kurzes Waschen der Nitrocellulosemembran in H<sub>2</sub>O (bidest.), um Reste des Tris-Puffers (pH 7.6) zu entfernen, der bei der anschließenden Detektion bei pH 8.5 stören würde. Danach wird die Membran kurz mit Papier (KIMWIPES) abgetupft, und sogleich feucht unter Lichtausschluß mit den 1:1 gemischten Reagenzlösungen (Enhanced ECL Western blotting detection reagents 1 und 2, NEN) für 1 min inkubiert, wobei 0.125 ml/cm<sup>2</sup> Membran verwendet wurden. Überschüssiges Reagenz läßt man abtropfen. Der Nachweis erfolgt durch Exposition (10 s bis 5 min) der in Frischhaltefolie eingewickelten Membran auf einem Film (X-OMAT, Kodak) in einer Autoradiographiekassette. Das emittierte Licht (428 nm) stammt aus der Oxidation von Luminol zu 3-Aminophthalsäure und molekularem Stickstoff in der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und p-Coumarsäure.

• **Nachweis der Proteine über Ausbildung eines schwerlöslichen Farbstoffes:**

Alkalische Phosphatase-gekoppelte Antikörper werden über die Bildung eines Farbstoffpräzipitats bestehend aus einem Indigoderivat (blau) und Diformazan (purpur) nachgewiesen. Das Indigoderivat bildet sich nach Hydrolyse der Phosphatgruppe am 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyolphosphat (BCIP) durch Oxidation mit molekularem Sauerstoff. Bei dieser Reaktion entstehen zwei Protonen, die mit Nitroblautetrazolium (NBT) zum Diformazan reagieren.

<b>Transfer-Puffer:</b>	192 mM Glycin 25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol optional: 0.03 % (w/v) SDS	<b>1x TBS:</b>	10 mM Tris-HCl, pH 7.6 137 mM NaCl 27 mM KCl
		<b>TBS-T:</b>	0.1 % (v/v) Tween-20 in TBS
<b>AP-Puffer:</b>	100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM Tris-HCl, pH 8.8	<b>10x Ponceau S:</b>	2 % (w/v) Ponceau S 30 % (w/v) Trichloressigsäure 30 % (w/v) Sulfosalicylsäure
<b>BCIP-Lösung:</b>	50 mg/ml BCIP in 100 % DMF, bei -20° C lagern		
<b>NBT-Lösung:</b>	100 mg/ml NBT in 70 % DMF, bei -20° C lagern		

### 3.14.2. Herstellung polyklonaler Antikörper

Die Generierung polyklonaler Antikörper aus Kaninchen wurde von der Firma Eurogentec mittels KLH-gekoppelter Peptide durchgeführt.

### 3.14.3. Herstellung monoklonaler Antikörper

Alle Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. E. Kremmer durchgeführt.

### 3.14.3.1. Immunisierung der Ratten

Die Ratten werden mit GST-Fusionsproteinen oder KLH-gekoppelten Peptiden immunisiert. Zur Grundimmunisierung erhalten die Ratten 500 µl des gelösten Antigens (ca. 200-500 µg Gesamtprotein) mit 500 µl Adjuvans. Nach gründlichem Durchmischen der Suspension werden 500 µl subkutan und 500 µl intraperitoneal appliziert. Nach einem Mindestabstand von sechs Wochen erfolgt eine Auffrischimmunisierung, bei welchem das Antigen wie bei der Grundimmunisierung, jedoch ohne Adjuvans injiziert wird.

### 3.14.3.2. Hybridoma-Fusionszelllinien

Zur Herstellung der Ratten-Hybridome wird die Maus-Myelom-Zelllinie P3X63-Ag8.653 (CRL-1580) verwendet. Sie zeichnet sich aus durch fehlende eigene Immunglobulinproduktion, hohe Fusionsfrequenz, gute Wachstumseigenschaften und Stabilität der resultierenden Hybridomazellen. Die Zelllinie besitzt einen Defekt der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) und daher eine 8-Aza-Guanin-Resistenz. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Trennung fusionierter von nicht-fusionierten Zellen zu Nutze. Die Zellen werden in 8-Aza-Guanin enthaltendem Medium ständig in Kultur gehalten. Drei Tage vor der geplanten Fusion erfolgt eine Umstellung auf Normalmedium und eine Expansion. Am Tag der Fusion werden die Zellen auf jeweils  $50 \times 10^6$  Zellen pro Falconröhrchen eingestellt. Danach erfolgt die Fusion mit den Ratten-Milzzellen.

### 3.14.3.3. Fusion

Die Ratte wird mit Hilfe von CO<sub>2</sub> getötet, die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen, und sogleich in zwei gleich große Stücke geschnitten. Die beiden Hälften werden durch ein Stahlhandsieb in 10 ml Basismedium passiert. Nach dem Absetzen größerer Gewebestücke werden zu  $50 \times 10^6$  Maus-Myelomzellen  $10 \times 10^7$  Milzzellen gegeben. Sie werden auf ein Volumen von 50 ml Basismedium aufgefüllt und bei 600 g für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und zu dem Zellsediment wird 1 ml Polyethylenglycol (PEG-1500) gegeben, welches vorsichtig mit einer Pasteurpipette untergemischt wird. Daran schließt sich ein leichtes Schwenken des Falconröhrchens für eine Minute an. Darauf folgt eine langsame Verdünnung des Polyethylenglycols mit HAT-Medium unter Schwenken. Es werden jeweils eine zwei- und eine fünfprozentige Verdünnung der Zellen eingestellt. Von jeder Verdünnungsstufe werden dann vier 96-Loch-Gewebekulturplatten mit einem Volumen von je 200 µl pro Loch beschickt. Die Platten werden im Brutschrank bei 37° C, 95% Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Nach einer Woche wird ein Mediumwechsel vorgenommen. Der verbliebene nicht ausgesäte Teil der Zellsuspension wird nur für einen Tag im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Zellen sedimentiert (200 g, 5 min), das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Nunc-Kryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff gelagert („Backup“).

### 3.14.3.4. Selektion der Klone und „Primär-Screening“

Nach einer Woche im Brutschrank haben die Hybridome eine ausreichende Größe erreicht, so daß ihr Kulturüberstand getestet werden kann. Durch mikroskopische Kontrolle wird ermittelt, wie viele Klone sich jeweils in einer Kavität befinden. Ausschließlich die Monoklone werden weiter verwendet. Nach einem Mediumwechsel (Zugabe von 200 µl frischem HAT-Medium), werden die Zellen für weiter drei Tage inkubiert. Der dann abgenommene Kulturüberstand wird im ELISA (Abschn. 3.14.5.) auf Reaktion mit dem Antigen getestet. Positive Klone werden weiter expandiert, zusätzlich im Western-Blot (Abschn. 3.14.1.) getestet und kryokonserviert („Primärnapf“).

### 3.14.3.5. Reklonierung

Im „Primär-Screening“ positive Klone werden auf zwei Verdünnungsstufen, und zwar 1 Zelle pro 200 µl HAT-Medium bzw. 10 Zellen pro 200 µl HAT-Medium, gebracht, und in 96-LochPlatten kultiviert bis die Kulturüberstände eine gelbe Farbe angenommen haben. Die Immunglobulinklasse wird sowohl im Primärüberstand, als auch in den 96-Loch-Platten unter Verwendung eines subklassenspezifischen ELISA (Abschn. 3.14.5.) bestimmt. Eine Reaktion mit dem Antigen wird zudem auch im ELISA verifiziert. Wenn vier Subklone und der zugehörige „Primärnapf“ positiv sind, gilt der monoklonale Antikörper als erfolgreich rekloniert.

<b>Basismedium:</b>	RPMI 1640 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 1% (v/v) Glutamin 1% (v/v) non-essential amino acids 1% (v/v) Pyruvat	<b>HAT-Medium:</b>	Basismedium 2% (v/v) 50x HAT-Medium 20% (v/v) FCS
<b>8-Aza-Guanin-Medium:</b>	Basismedium 2% (v/v) 50x 8-Aza-G 5% (v/v) FCS	<b>HT-Medium:</b>	Basismedium 2% (v/v) 50x HT-Medium 10% (v/v) FCS
<b>Einfriermedium:</b>	90% (v/v) FCS 10% (v/v) DMSO		

### 3.14.4. Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzstudien an HeLa-Zellen wurden mittels Standardtechniken (Paraformaldehyd- bzw. Methanol/Aceton-Fixierung) unter Verwendung von Primär- und Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern von E. Piaia bzw. G. Stelzer durchgeführt (siehe Harlow und Lane, 1999).

### 3.14.5. ELISA

#### • Bestimmung der Subklasse:

Eine 96-Loch-ELISA-Platte wird mit einem anti-Ratte-IgG-L-kappa-Antikörper (aus Maus, TIB172) beschichtet. Dieser wird dazu auf 10 µg/ml Carbonatpuffer eingestellt und die ELISA-Platte mit 100 µl pro Loch über Nacht bei 4° C beschichtet. Am folgenden Tag wird diese einmal mit 1x PBS gewaschen und mit Blockierungslösung für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Blockierungslösung wird abgeklopft und je 100 µl des Kulturüberstandes zugegeben. Nach einer Inkubation der Platte für 30 min bei RT wird einmal mit 1x PBS gewaschen und die subklassenspezifischen Antikörper (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG2c, anti-IgM) in einer 1:1000 Verdünnung in Blockierungslösung aufgetragen. Die subklassenspezifischen Antikörper sind biotinyliert und gegen Ratten-Immunglobuline gerichtet. Nach einer Inkubation der Platte für 30 min bei RT wird wiederum einmal mit 1x PBS gewaschen und Avidin-Meerrettichperoxidase, in einer Verdünnung von 1:2000 (in Blockierlösung) in die Kavitäten gegeben. Es folgt eine weitere 30minütige Inkubation der Platten, an die sich fünf Waschschritte mit 1x PBS anschließen. Nachdem die Platte trocken geklopft wurde, werden 100 µl der folgenden frisch bereiteten Lösung pro Loch einpipettiert: 10 mg OPD (Ortho-phenylendiamin) in 10 ml Substratpuffer gelöst plus 3.3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nach 5-10 min kann die Extinktion im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen werden.

#### • Nachweis der Antigenerkennung:

Das Verfahren entspricht im Prinzip dem oben beschriebenen. Die 96-Loch-ELISA-Platte wird aber mit einem Maus anti-GST-Antikörper über Nacht bei 4° C beschichtet. Anschließend (nach Waschen mit 1x PBS) wird das Antigen (GST-Fusionsprotein) in geeigneter Verdünnung in Blockierungslösung aufgebracht. Dann erfolgt die Zugabe des Kulturüberstandes. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines biotinylierten anti-Ratte-IgG-Antikörpers und Avidin-Meerrettichperoxidase.

**Carbonatpuffer:** 0.2 M Natriumhydrogencarbonat  
0.2 M Natriumcarbonat  
Natriumhydrogencarbonatlösung mit  
Natriumcarbonatlösung bis pH 9.5  
titrieren

**Blockierungslösung:** 1% (w/v) Milchpulver  
in 1x PBS

**Substratpuffer:** 0.1 M Tris  
0.1 M Citronensäure  
Tris mit Citronensäure bis pH 5.0  
titrieren

**Entwicklungslösung:** 10 ml Substratpuffer  
5.5 mM OPD  
0.0033% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)

### 3.15. Gelretardationsanalyse (EMSA)

Mit der Gelretardationsanalyse lassen sich DNA-bindende Proteine über die im Vergleich zur freien DNA geringere Mobilität von Protein-DNA-Komplexen in nativen Gelsystemen nachweisen (Fried und Crothers, 1981). Die Proteinlösung wird mit 25-50 fmol eines  $^{32}\text{P}$ -endmarkierten DNA-Fragments 30 min in Puffer N oder alternativ unter Transkriptionsbedingungen (siehe Abschn. 3.16.) bei 28° C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden in dieser Arbeit in 5.0 %igen (49:1) Polyacrylamidgelen analysiert.

- **Herstellung eines nativen Polyacrylamidgels:** 50 ml der Gellösung werden mit 0.4 ml 30 % (w/v) APS-Lösung gemischt. Aus 5 ml dieser Mischung wird durch Zufügen von 20  $\mu\text{l}$  TEMED ein Sockel zwischen die durch 1.5 mm Abstandshalter getrennten Glasplatten (20 cm x 16 cm) gegossen (optional). Nachdem der Sockel polymerisiert ist, wird die restliche Gellösung mit 20  $\mu\text{l}$  TEMED vermischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen des Geltaschenformers polymerisiert das Gel für mindestens 2 h aus.

- **Gellauf:** Bei EMSA-Gelen dient 1x TGE (eventuell mit 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) als Laufpuffer. Vor dem Probenauftrag wird 2 h eine Vorelektrophorese bei 120 V und RT durchgeführt (alternativ 140 V im Kühlraum); danach wird der Laufpuffer ausgewechselt. Die Elektrophorese erfolgt bei Spannungen von 120 V bei RT (alternativ 140 V im Kühlraum) über einen Zeitraum von 3 h bis 15 h bei RT (oder auch 4° C). Als Laufmarker dienen BPB und XC. Doppelsträngige DNA in einer Länge von 60 bp wandert in 5 %-Gelen mit der Lauffront des BPB-Markers. Ein 230 bp DNA-Fragment läuft etwa halb so schnell wie der XC-Marker. Das Gel wird nach der Elektrophorese auf ein Whatman 3 MM-Papier übertragen, mit Frischhaltefolie bedeckt und zwischen zwei Lagen saugfähigem Papier 1 h bei 80° C im Vakuum auf dem Geltrockner getrocknet. Für die quantitative Analyse wird das getrocknete Gel auf einem Direct Imager ausgewertet. Die Autoradiographie der getrockneten Gele erfolgt bei -80° C mit Verstärkerfolie.

**Puffer N:**

- 50 mM NaCl
- 1 mM DTT
- 10% Glycerin
- 10 mM HEPES-KOH, pH 7.9
- 5 mM Tris, pH 7.5
- 15 mM EDTA

**Gellösung:**

- 5 % (w/v) (49:1) Acrylamid/Bisacrylamid in 1x TGE für DNA-Fragmente bis 200 bp
- 4 % (w/v) (19:1) Acrylamid/Bisacrylamid in 1xTGE für DNA-Fragmente größer 200 bp
- optional 5 % (v/v) Glycerin
- optional 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$

---

<b>10x TGE:</b>	250 mM Tris
	1.24 M Glycin
	10 mM EDTA, pH 8.0
	Lösung stets frisch zubereiten

### 3.16. *In-vitro*-Transkription von RNA-Polymerase II-Reportern

Um Faktoren zu untersuchen bzw. zu identifizieren, welche die Transkriptionsrate von RNA-Polymerase II modulieren, wurden entweder Kernextrakte aus Jurkat und HeLa Zellen verwendet, oder es kam ein (partiell) gereinigtes *in-vitro*-Transkriptionssystem zum Einsatz. Als Reporter dienten zumeist virale Modellpromotoren (Adenovirus *Major Late*-Promotor, *HIV*-Promotor) oder synthetische Konstrukte, wie ein Hybrid aus dem *Major Late*- und dem *HIV*-Promotor (Kretzschmar *et al.*, 1994a). In Kernextrakten kam außerdem der TATA-lose *CD4*-Promotor zum Einsatz. Die Reportergene hatten entweder die natürlich vorkommenden Bindungsstellen für Aktivatoren (USF, Sp1, NF- $\kappa$ B) oder besaßen 5 Bindungsstellen für die DNA-Bindungsdomäne des Hefe Gal4-Proteins, stromaufwärts der TATA-Box. Im letzteren Fall wurden Fusionsproteine bestehend aus der Gal4 DNA-Bindungsdomäne und verschiedenen Aktivierungsdomänen (AH, Sp1, VP16 und VP16-Derivate) verwendet.

#### 3.16.1. *In-vitro*-Transkription im Kernextrakt

Kernextrakte stellen „grobe“ *in-vitro*-Transkriptionssysteme dar, da sie alle mit Salz extrahierbaren Kernproteine enthalten, darunter die Generellen Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase II, positive und negative Cofaktoren, Elongationsfaktoren, Aktivatoren und Repressoren, Kinasen und Phosphatasen, Chromatin-modifizierende Aktivitäten, Chromatinremodellierungsfaktoren, sowie jede Menge (unspezifisch) DNA-bindender Proteine (z.B. HMG-Proteine, Histone). Die komplexe Zusammensetzung des Systems macht die Analyse einzelner Transkriptionsfaktoren schwierig, da man entweder Extrakte aus Zelllinien verwenden muß, welche den zu untersuchenden Faktor nicht oder nur in geringsten Mengen exprimieren, oder gezwungen ist die zu analysierende Komponente mittels Affinitätsverfahren aus dem Extrakt zu entfernen. Der große Vorteil der Kernextrakte ist allerdings die Tatsache, daß sie ein *in-vitro*-System darstellen, das den physiologischen Bedingungen in einigen Aspekten sehr nahe kommt. Beispielsweise kommt Kinasen (Cdk9) und Phosphatasen (Fcp1), die auch in Zellen wichtig für die RNA-Polymerase II-Transkription sind, eine wichtige Rolle bei der RNA-Synthese im groben System zu.

### 3.16.1.1. Die G-freie Kasette und „run-off“-Transkription: Hilfsmittel zum Nachweis der Transkripte

Bei der Analyse von RNA-Polymerase II-Transkripten hat sich ein System, das von Sawadogo und Roeder (Sawadogo und Roeder, 1985) entwickelt wurde, als sehr hilfreich erwiesen. Um Transkripte einer definierten Länge zu erzeugen, verwendet man synthetische Konstrukte, die in 3'-Richtung vom Transkriptionsstart über eine Länge von ca. 200 bzw. ca. 400 bp keine G-Basen in ihrem Sinnstrang aufweisen, was zur Folge hat, daß die synthetisierte RNA keine G-Basen besitzt. Verwendet man nun 3'-O-Methylguanositriphosphat (OMG) anstelle von GTP als Substrat in der *in-vitro*-Transkriptionsreaktion, so bricht die RNA-Synthese nach dem Einbau des ersten G-Analogen in die RNA-Kette ab. Die Transkriptlänge kann also über die Wahl der Länge der G-freien Kasette bestimmt werden. Da Kernextrakte, trotz Dialyse, immer eine gewisse Menge an endogenem GTP aufweisen, welches natürlich mit dem OMG für den Einbau in die wachsende RNA kompetetiert, linearisiert man den Vektor, der als Matrize für die RNA-Synthese fungiert, direkt am 3'-Ende der G-freien Kasette. Die RNA-Polymerase II fällt dann an dieser Stelle einfach von ihrer Matrize ab, was man als „run-off“-Transkription bezeichnet. In manchen Fällen benutzt man ausschließlich letztere Methode. Allerdings gibt die Kombination beider Methoden bessere Ergebnisse, weil OMG sowohl unspezifisch initiierte RNA-Polymerase II-Transkripte in ihrer Elongation hemmt, als auch unspezifische RNA-Polymerase III-Produkte, die unter Umständen sehr störend sein können, supprimiert. Alternativ kann man RNA, die mittels OMG und einer G-freien Kasette synthetisiert wurde mit RNase T1 behandeln, welche Phosphodiesterbindungen in RNA spezifisch nach G-Basen hydrolysiert. Das erwünschte Produkt ist dabei resistent gegen die RNase T1, während andere Produkte hydrolysiert werden.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Matrizen:

Plasmid	G-freie Kasette	Länge des Transkriptes	Restriktionsschnittstelle	Aktivator-site
pMLC2AT	+	398 bp	<i>Sma</i> I	USF
pML5xGal	+	398 bp	<i>Sma</i> I	Gal
pHIV-WT	+	398 bp	<i>Sma</i> I	Sp1, NF-κB
pMRG5	+	398 bp	<i>Sma</i> I	Gal
pMLΔ53	+	289 bp	<i>Sma</i> I	—
pGLCD4Gal	—	642 bp	<i>Eco</i> RI	Gal, (AML, Ets, LEF)

Die Plasmide pML5xGal und pMLΔ53 enthalten von der Position –53 bis +9 Sequenzen des Adenovirus Major Late Corepromotors. Das Plasmid pMRG5 besitzt von Positon –65 bis –8 HIV Corepromotorsequenzen, von –7 bis +9 enthält es den Major Late Initiator. Die Matrize pMLC2AT besteht von Position –400 bis +9 aus den Adenovirus Major Late Promotor Sequenzen (inklusive der USF-Bindungsstellen).

Das Plasmid pHIV-WT enthält die HIV Corepromotorsequenz mit proximalen Aktivatorbindungsstellen (-107 bis -8), sowie Major Late Sequenzen (-7 bis +9). Die Matrize pGLCD4Gal besitzt von Position -42 bis +20 die Sequenz des humanen CD4-Gens. Der Promotor hat keine klassische TATA-Box, weist aber ein Initiatorelement von Position -3 bis +5 auf.

In dieser Arbeit wurden standardmäßig 50 bis 100 ng aller Reporter pro Transkriptionsansatz eingesetzt, mit Ausnahme des Plasmids pGLCD4Gal, das in einem Bereich von 20 bis 40 ng verwendet wurde. Ein typischer Ansatz in einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu$ l war folgendermaßen zusammengesetzt:

Hepes-KOH, pH 8.2	25 mM	Kernextrakt	30-50 $\mu$ g
MgCl <sub>2</sub>	4 – 5 mM	RNasin	20 U
DTT	5 mM	BSA (acetyliert)	10 $\mu$ g
PMSF	0.2 mM	ATP	100 $\mu$ M
KCl	40 – 80 mM	UTP	100 $\mu$ M
Glycerin	5 – 14% Glycerin	CTP	5 $\mu$ M
BC0-Puffer	0 – 50%	OMG (bzw. GTP)	20 $\mu$ M (100 $\mu$ M)
Igepal CA630	0 – 0.05%	$\alpha$ - <sup>32</sup> P-CTP	135 $\mu$ M (8 $\mu$ Ci)

Die einzelnen Ansätze erhalten zuerst einen vorgemischten Mix A, welcher für die Transkription essentielle Komponenten enthält. Dem Mix A werden, wenn nötig, rekombinante gereinigte Aktivatorproteine (10 – 40 ng) zugesetzt. Als nächstes werden zu testende Proben hinzugegeben. Anschließend wird in jeden Ansatz die benötigte Menge Kernextrakt pipettiert. Da Proben unterschiedlicher Ionenstärke bzw. unterschiedlicher Viskosität (Glycerin, Detergens etc.) zusammengegeben werden, ist es wichtig die Reaktionsansätze ausreichend mit der Pipette zu durchmischen (dabei Luftblasenbildung vermeiden). Die Ansätze werden für 30 sec bei 12000 rpm zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, RT). Die Reaktion wird durch Zugabe der Nukleotide (Start-Mix) gestartet. Das Volumen einer Reaktion beträgt 20 bis 22  $\mu$ l. Die Transkriptionsreaktion wird nun für 60 min bei 28° C inkubiert. Danach stoppt man durch Zugabe von 0.4 ml Stopp-Puffer, extrahiert einmal mit Chloroform, und fällt mit 0.4 ml eiskaltem Isopropanol für mindestens 2 h bei -20° C, am besten jedoch über Nacht. Einer vierzigminütigen Zentrifugation (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 4° C, 14000 rpm) schließt sich das Waschen des Präzipitats mit 0.8 ml eiskaltem 70 % Ethanol an. Der im Vakuumkonzentrator getrocknete Niederschlag wird in 10  $\mu$ l Formamid-Auftragspuffer aufgenommen und durch fünfzehnminütige Inkubation bei 58° C gelöst. Die Analyse der Transkripte erfolgt auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel mit 1x TBE als Gel- und Laufpuffer.

<b>MixA:</b>	Hepes-KOH (pH 8.2)	ad 25 mM
	BC-Puffer mit variablem KCl-Gehalt	ad 40-80 mM KCl
	MgCl <sub>2</sub>	ad 4 - 5 mM
	DTT	ad 5 mM
	PMSF	ad 0.2 mM
	RNase Block	ad 1 U/μl (0.5 μl)
	BSA (acetyliert)	ad 0.5 μg/μl
	Reporter-Plasmid	1 – 5 ng/μl

Die Angaben beziehen sich auf die Endkonzentration (ad) im fertig gemischten Transkriptionsansatz.

**Start-Mix:** 0.2 μl OMG-Mix bzw. NTP-Mix  
0.8 μl α-<sup>32</sup>P-CTP (3000 Ci/mmol)

**NTP-Mix:** 10 mM ATP  
10 mM UTP  
10 mM GTP  
0.5 mM CTP

**OMG-Mix:** 10 mM ATP  
10 mM UTP  
2 mM OMG  
0.5 mM CTP

**Stopp-Puffer:** 7M Harnstoff  
10 mM Tris-HCl, pH 7.8  
10 mM EDTA/NaOH, pH 8.0  
0.5 % (w/v) SDS  
100 mM LiCl  
0.4 mg/ml RNA aus Hefe\*  
300 mM Natriumacetat

(\* Präparation der RNA: *S. cerevisiae* RNA (Serva) wird ad 20 mg/ml in TE gelöst und 1 h bei 95° C im Wasserbad inkubiert. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3L-R, 3900 rpm, 30 min, RT) abgetrennt. Der Überstand wird zweimal mit Chloroform extrahiert. Schließlich wird die Lösung bei -20° C gelagert.

**Formamid-Auftragspuffer:** 97% Formamid (deionisiert)  
20 mM Tris-HCl pH 7.3  
10 mM EDTA/NaOH pH 8.0  
0.1 % (w/v) BPB  
0.1 % (w/v) XC

**Elektrophorese der Proben auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel:** Die Proben werden auf einem 4.5%igen (Transkripte größer 400 Basen) bzw. 5.0%igen (Transkripte von 200 – 400 Basen) denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel (20 cm x 16 cm Glasplatten, 1.5 mm Abstandhalter) aufgetrennt. Zu 50 ml der Gellösung werden 0.4 ml 30% (w/v) APS-Lösung und 25 μl TEMED gegeben.

Die Gellösung wird zwischen die Glasplatten gegossen, man setzt den Geltaschenformer ein, und läßt das Gel für 10 min polymerisieren. Jetzt kann der Geltaschenformer gezogen werden, und man läßt das Gel nochmals für 20 min auspolymerisieren. Nach 20 min Vorlauf bei konstant 50 mA werden die Proben aufgetragen und für ca. 120 min bei 50 mA im elektrischen Feld aufgetrennt. Das Gel wird abgenommen, 15 min in 10 % (v/v) Essigsäure fixiert, 2x 2 min mit H<sub>2</sub>O (bidest.) gespült, auf 3MM Whatmanpapier übertragen, und 1 h bei 80° C auf dem Geltrockner im Vakuum getrocknet. Die Autoradiographie erfolgt über Nacht mit einer Verstärkerfolie.

**Gellösung:** 4.5 % bzw. 5% (w/v) (19:1) Acrylamid/Bisacrylamid  
1x TBE  
8 M Harnstoff  
durch einen Faltenfilter filtrieren

### 3.16.1.2. „Primer-Extension“-Analyse der Transkripte

Bei dieser Technik erfolgt zunächst eine Transkription wie in Kapitel 3.16.1.1. beschrieben, wobei zirkuläre (superhelikale) Plasmide transkribiert werden und die Transkripte nicht radioaktiv markiert werden, so daß die Endkonzentration aller vier NTPs bei 100 µM liegt. Der Nachweis der synthetisierten RNA erfolgt durch die Hybridisierung eines <sup>32</sup>P-endmarkierten Primers gegen das Transkript gefolgt von dessen reverser Transkription. Die anschließende Auftrennung der radioaktiv markierten reversen Transkriptionsprodukte in einem Sequenzgel ermöglicht die indirekte Analyse der Transkripte. Der in dieser Arbeit verwendete Primer „G-less new“ (Abschn. 2.7.) ist komplementär zu einer Sequenz innerhalb der G-freien Kassette des Reporters pMLC2AT, und es entsteht ein ca. 140 bp langes reverses Transkriptionsprodukt.

**Reinigung und Fällung der RNA:** Nach der Inkubation des Transkriptionsansatzes stoppt man die Reaktion durch Zugabe von 0.4 ml Stopp-Puffer, gibt Proteinase K ad 30 µg/ml zu, inkubiert 15 min bei 40° C, und extrahiert schließlich einmal mit Chloroform sowie einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Zwischen den Extraktionsschritten wird zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14000 rpm, 10 min, RT). Zum Überstand der Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion gibt man 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4.8) sowie 1.0 ml eiskaltes Ethanol, mischt und fällt die RNA bei -20° C über Nacht. Am nächsten Tag wird die RNA sedimentiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 rpm, 40 min, 4° C), mit 0.8 ml eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt.

**Hybridisierung des Primers:** Diese erfolgt im Hybridisierungs-Mix (40 mM Pipes-NaOH, pH 6.7, 1 mM EDTA, 0.2 % (w/v) SDS, 250 mM NaCl, 10 U RNasin, 20 fmol Primer) in welchem die getrocknete RNA gelöst wird (Endvolumen 50 µl).

Da im Transkriptionsansatz 100 ng pMLC2AT-Reporter (3 kb; ca. 50 fmol) eingesetzt worden sind, und man bei einem vierzigfachen Primer-Überschuß arbeitet, ergibt sich die Primer-Menge aufgrund des Erfahrungswertes, daß nur 1 % aller Reporter tatsächlich transkribiert werden. Die Proben werden nun für 5 min bei 65° C im Wasserbad inkubiert und sogleich für weitere 40 min bei 45° C gehalten. Danach erfolgt eine langsame Abkühlung der Proben auf RT (durch Abschalten des Wasserbades). Es werden 250 µl H<sub>2</sub>O (bidest.), 120 µl 4 M Ammoniumacetat (pH 7.0) und 300 µl Isopropanol (RT!) zugegeben. Eine Inkubation für 10 min bei RT schließt sich an. Bei diesem Schritt präzipitiert präferentiell die RNA mit dem hybridisierten Primer, überschüssiger Primer bleibt größtenteils im Überstand. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation sedimentiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14000 rpm, 10 min, RT), mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und im Vakuumkonzentrator getrocknet.

**Reverse Transkription:** Die RNA mit hybridisiertem Primer wird im RT-Mix (1x RT-Puffer von USB, 500 µM dNTPs, 40 ng/µl Actinomycin D, 0.2 U/µl RNasin, 100 ng/µl acetyliertes BSA) gelöst. Nach Zugabe von 1 µl (15 U) AMV Reverser Transkriptase wird für 1 h bei 37° C in einem Volumen von 50 µl inkubiert. Dann wird DNase-freie RNase A ad 0.4 µg/ml zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0.2 ml Stopp-Puffer und Chloropane-Extraktion (0.4 ml), gibt man zum Überstand 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 4.8) und 1 Volumen eiskaltes Isopropanol, und fällt bei -20° C für mindestens 2 h (oder ÜN). Das Präzipitat wird sedimentiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 rpm, 30 min, 4° C), in eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und im Vakuumkonzentrator getrocknet.

**Gelelektrophorese:** Die Analyse der reversen Transkripte erfolgt in denaturierenden Harnstoff-TBE-Polyacrylamidgelen (Abschn. 3.9.3.), die 1 h bei konstant 25 mA vorgelaufen waren. Zum Auftragen auf das Gel werden die Proben wie folgt behandelt. Das getrocknete Präzipitat wird durch Zugabe von 3 µl 0.1 M NaOH und 6 µl Formamid-Auftragspuffer gelöst, 2 min bei 95° C erhitzt und sogleich auf Eis abgeschreckt. Die Elektrophorese erfolgt mit 8 %igen Gelen. Nach dem Gellauf wird das Gel in 10 % (v/v) Essigsäure fixiert, auf 3MM Whatmanpapier übertragen, und 1 h bei 80° C auf dem Geltrockner im Vakuum getrocknet. Die Autoradiographie erfolgt über Nacht mit einer Verstärkerfolie.

**Hybridisierungsmix:**

0.5 M Pipes-NaOH, pH 6.7	4 µl
0.05 M EDTA, pH 8.0	1 µl
10 % (w/v) SDS	1 µl
5 M NaCl	2.5 µl
RNasin (20 U/µl)	0.5 µl
H <sub>2</sub> O (bidest.)	39.5 µl
Primer (13 fmol/µl)	<u>1.5 µl</u>
	50 µl

**RT-Mix:**

5x RT-Puffer (USB)	10 µl
dNTPs (25 mM)	1 µl
Actinomycin D (4 mg/ml)	0.5 µl
BSA (20 mg/ml)	0.25 µl
RNasin (20 U/µl)	0.5 µl
H <sub>2</sub> O (bidest.)	36.75 µl
AMV Rev. Transkr. (15 U/µl)	<u>1 µl</u>
	50 µl

**Stopp-Puffer:** 200 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl, pH 8.0  
1 mM EDTA  
0.1 % (w/v) SDS  
100 µg/ml tRNA

### 3.16.1.3. Immundepletion von Kernextrakten

Immobilisierte Antikörper (2 mg/ml; Protein G oder Protein A Sepharose) werden in IP-Puffer (Abschn. 3.13.7.2.), der BSA (acetyliert) in einer Endkonzentration von 0.2 mg/ml enthält, äquilibriert. Alle Schritte werden auf Eis oder im Kühlraum in silikonisierten Reaktionsgefäßen durchgeführt. In der Regel werden zunächst 1.1 ml Kernextrakt (6 – 10 mg/ml) auf folgende Bedingungen eingestellt: 0.15 M KCl, 0.1 % (v/v) Igepal CA630, 0.2 mM PMSF, 0.1 mM Benzamidin sowie 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A. Daraufhin erfolgt die Inkubation von 0.5 ml des Kernextraktes mit 0.1 ml des immobilisierten Antikörpers für 3 h auf dem Drehrad. Mit weiteren 0.5 ml Kernextrakt und der entsprechenden Kontrollantikörper-Säule (0.1 ml) wird identisch verfahren. Der Rest des Extraktes bleibt so lange auf Eis (Ausgangsprobe). Die beiden Überstände werden durch Zentrifugation (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 2000 g, 2 min, 4° C) von den Immunglobulinsäulen separiert, in Aliquots bei –80° C weggefroren und in der *in-vitro*-Transkription (Abschn. 3.16.1.1.) zusammen mit der Ausgangsprobe analysiert. Beide Antikörpersäulen werden, wenn nicht anders angegeben, in 5x 50 CV IP-Puffer gewaschen, auf BC100 äquilibriert und auch in der *in-vitro*-Transkription getestet.

### 3.16.2. *In-vitro*-Transkription im rekonstituierten System

Rekonstituierte RNA-Polymerase II *in-vitro*-Transkriptionssysteme aus gereinigten Generellen Transkriptionsfaktoren bieten den Vorteil, daß ihre Komponenten definiert sind, und der (potentielle) Effekt von akzessorischen Transkriptionsfaktoren in diesen Systemen einfach durch Zugabe getestet werden kann, was unter anderem auch mechanistische Studien extrem erleichtert. Der Nachteil des gereinigten Systems liegt darin begründet, daß es nur aus dem minimalen Satz an Faktoren besteht, die für die *in-vitro*-Transkription nötig sind, und so viele Kontrollmechanismen des Kernextraktsystems, die man auch *in vivo* vorfindet, nicht mehr vorhanden sind. Beispielsweise ermöglicht es nicht die Transkription von TATA-losen Promotoren. Dies bedeutet daher auch, daß es ein Testsystem für ein begrenztes Repertoire an Faktoren repräsentiert.

Wenn nicht anders beschrieben, enthält das rekonstituierte System folgende generelle Transkriptionsfaktoren:

10 ng rekombinantes E $\alpha$  und E $\beta$ , 35 ng rekombinantes TFIIA( $\alpha\beta\gamma$ ), 20 ng rekombinantes TFIIB, 10 ng rekombinantes TBP bzw. 1.0  $\mu$ l einer nativen TFIID-Fraktion, 1  $\mu$ l rekombinantes TFIIF (Rap74 u. Rap30 in SF9-Zellen coexprimiert) und 1.0 – 1.5  $\mu$ l einer Fraktion die RNA-Polymerase II, TFIIH und TFIIE enthält. Diese Fraktion wurde gegebenenfalls für kontaminierende humane Mediator-Komponenten depletiert. Ein noch saubereres System enthielt 2 – 4  $\mu$ l RNA-Polymerase II aus Kalbsthymus und 0.5 – 1  $\mu$ l rekombinantes TFIIH (alle Untereinheiten in SF9-Zellen zum Teil coexprimiert; Fukuda *et al.*, 2001). Da dieses System komplett frei von GTP ist, besteht keine Notwendigkeit die Matrizen für die Transkriptionsanalyse mit einem Restriktionsenzym zu linearisieren.

Die Transkriptionsreaktionen werden im Prinzip identisch wie unter 3.16.1.1. beschrieben prozessiert. Anstelle des Kernextraktes tritt allerdings ein Faktor-Mix, der die Generellen Transkriptionsfaktoren enthält.

**Faktor-Mix:**

BSA acetyliert (20 mg/ml)	0.2 $\mu$ l
TFIIE $\alpha\beta$ (Nickel-NTA-Agarose- bzw. Heparin-Sepharose-Fraktion)	0.2 $\mu$ l
TFIIF (Superose 12-Fraktion)	1.0 $\mu$ l
TFIIB (Heparin-Sepharose-Fraktion)	0.2 $\mu$ l
P11(0.5)-DE52(0.3)-Fraktion (RNA-Polymerase II, TFIIH, TFIIE) oder	1.0 – 1.5 $\mu$ l
RNA-Polymerase II (Kalbsthymus, DE52-Fraktion) und TFIIH rekombinant	2.0 – 4.0 $\mu$ l 0.5 – 1.0 $\mu$ l
TFIIA $\alpha\beta\gamma$ (Nickel-NTA-Fraktion, corenaturiert)	0.5 $\mu$ l
TFIID (DE52-Fraktion)	1.0 $\mu$ l
bzw. TBP (Heparin-Sepharose-Fraktion)	0.1 $\mu$ l

Faktoren in der beschriebenen Reihenfolge bei RT zusammenpipettieren.

### 3.17. Helikaseaktivitätsuntersuchungen

Zum Auffinden von Helikaseaktivität in Proteinfractionen *in vitro* wurde folgendes Testsystem eingesetzt. Ein radioaktiv markiertes 17 bp Oligodesoxyribonukleotid wird mit zirkulärer Einzelstrang-DNA hybridisiert. Über eine Gelfiltration wird das freie Oligodesoxyribonukleotid abgetrennt. Helikasen sind in der Lage das hybridisierte Oligonukleotid (Substrat) in einer ATP-abhängigen Reaktion von der zirkulären Einzelstrang-

DNA wieder abzutrennen. Substrat und abgetrenntes Oligodesoxyribonukleotid können durch TBE-Polyacralamidgelelektrophorese analysiert werden.

Dazu werden 10 pmol des M13 (Seq.-40) Primers (Abschn. 2.7.) mit 20 pmol  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (3000 Ci/mmol) in einem Volumen von 20  $\mu$ l radioaktiv markiert (Abschn. 3.6.4.). Der Ansatz wird 10 min bei 95° C inkubiert, auf Eis abgeschreckt und kurz zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14000 rpm, 30 sec, RT). Nun werden 7  $\mu$ l (0.73 pmol) M13mp19(+)-Einzelstrang-DNA (0.25  $\mu$ g/ $\mu$ l) und 3  $\mu$ l 10x M13-Hybridisierungspuffer zugegeben. Die Probe wird für 2 min bei 95° C inkubiert und in ein Wasserbad bei 60° C transferiert, wo eine Inkubation für 10 min erfolgt. Nun läßt man durch Abschalten des Wasserbades auf RT abkühlen. Der Ansatz wird auf eine 1.0 ml Sepharose CL-4B (APB) Säule (in 1 ml Plastikspritze mit 20G: 0.9x70 mm Kanüle) aufgetragen, die in 0.2x STE bei Gravitationsfluß entwickelt wird. Die ersten 300  $\mu$ l sammelt man in einem Reaktionsgefäß, dann wird in 25  $\mu$ l Aliquots gesammelt. Fraktionen, die die meiste Radioaktivität enthalten, werden im Polyacrylamidgel analysiert (siehe unten).

Helikasereaktionen werden in einem Endvolumen von 25  $\mu$ l, bei 37° C für 45 min durchgeführt. Die Reaktion findet in 1x Helikasepuffer mit 4 ng/ $\mu$ l BSA (acetyliert), 0.2 mM PMSF und 4 mM ATP statt. Pro Ansatz werden 1 – 2  $\mu$ l Substrat (ca. 6 – 12 fmol) verwendet. Zu analysierende Fraktionen werden in einem Volumen von 1 bis 3  $\mu$ l eingesetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3  $\mu$ l Stopp-Puffer gestoppt, und die Ansätze im 0.5x TBE-Polyacrylamidgel mit 0.5x TBE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt (Vorlauf 1 h konstant 120 V; Auftrennung der Proben 2 h, 120 V konstant). Das Gel wird in 10 % Essigsäure/10 % Methanol fixiert, auf Whatman 3MM Papier bei 80° C im Vakuum getrocknet, und bei –80° C autoradiographiert.

**10x M13-Hybridisierungspuffer:** 400 mM Tris-HCl, pH 7.5 (RT)

100 mM MgCl<sub>2</sub>

2 M NaCl

10 mM DTT

**10x Helikasepuffer:** 200 mM Hepes-KOH, pH 7.8

10 mM DTT

40 mM MgCl<sub>2</sub>

<b>Stopp-Puffer:</b>	75 mM EDTA	<b>Polyacrylamidgel:</b>	20 ml Rotiphorese Gel30 (37.5:1)
	2.25 % (w/v) SDS		5 ml 5x TBE
	37.5 % (v/v) Glycerin		25 ml H <sub>2</sub> O (bidest.)
	0.3 % (w/v) BPB		0.4 ml 30 % APS
	0.3 % (w/v) XC		25 $\mu$ l TEMED

## 3.19. Bioinformatik

Ein Überblick der Vielzahl unterschiedlicher bioinformatischer Werkzeuge im Internet wurde beschrieben (Baxevanis, 2001; Baxevanis, 2002).

### 3.19.1. Homologie-Analysen

#### 3.19.1.1. BLAST

Für Homologieanalysen von Nukleinsäuren und Proteinen auf Sequenzbasis wurde der NCBI BLAST-Server verwendet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

#### 3.19.1.2. PSI-BLAST

Für das Auffinden von schwachen Homologien- bzw. Homologieregionen hat sich das Programm PSI-BLAST bewährt (siehe obige Internet-Adresse). Eine Einführung in die korrekte Benutzung findet sich in der folgenden Publikation (Jones und Swindells, 2002).

#### 3.19.1.3. „Multiple Alignment“

Homologe Polypeptidsequenzen werden unter Verwendung der BLAST-Server identifiziert. Darüber hinaus hat sich ein Algorithmus zum Auffinden von Orthologen bewährt: <http://www.bork.embl-heidelberg.de/Blast2e/>

Das „multiple alignment“ kann am „BCM Search Launcher“

(<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>) ausgeführt werden.

Alternativ kann das Programm ClustalW auf dem Server der AG Bork am EMBL (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/Alignment/alignment.html>) eingesetzt werden.

Für Mitglieder der HGF-Forschungsinstitute ist der Zugang zu dem Komplettpaket W2H-Husar über ein „web interface“ am DKFZ (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/>) nach Registrierung kostenlos. Dort stehen mehrere Programme für das „multiple alignment“ zur Verfügung (ClustalW, PileUp, Malalign). Eine Evaluierung der unterschiedlichen Werkzeuge bzgl. spezifischer Fragestellungen wurde diskutiert (Thompson *et al.*, 1999).

### 3.19.2. Vorhersage der Exon-Intron-Struktur von Genen

Die Genvorhersage wurde mit dem Programm Genscan durchgeführt:

<http://genome.dkfz-heidelberg.de/cgi-bin/GENSCAN/genscan.cgi>  
bzw. <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>

### 3.19.3. Vorhersage von Strukturmotiven

Die Vorhersage von Strukturmotiven wurde entweder am Bioinformatik-Server der Stanford Universität (<http://motif.stanford.edu/emotif/>) oder am SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) mit dem ExPASy-Server (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN?> und <http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>) durchgeführt. Bewährt hat sich auch das Programm „*DomainSweep*“ des Bioinformatikpakets W2H-Husar, welches automatisch die Datenbanken „BLOCKS“, „PFAM“, „PRINTS“, „PROSITE“ und „PRODOM“ durchsucht (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/>).

### 3.19.4. Sekundärstrukturvorhersagen

Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit Hilfe des nachstehenden Servers generiert:

<http://jura.ebi.ac.uk:8888/>

### 3.19.5. Auffinden von Kernlokalisationssequenzen

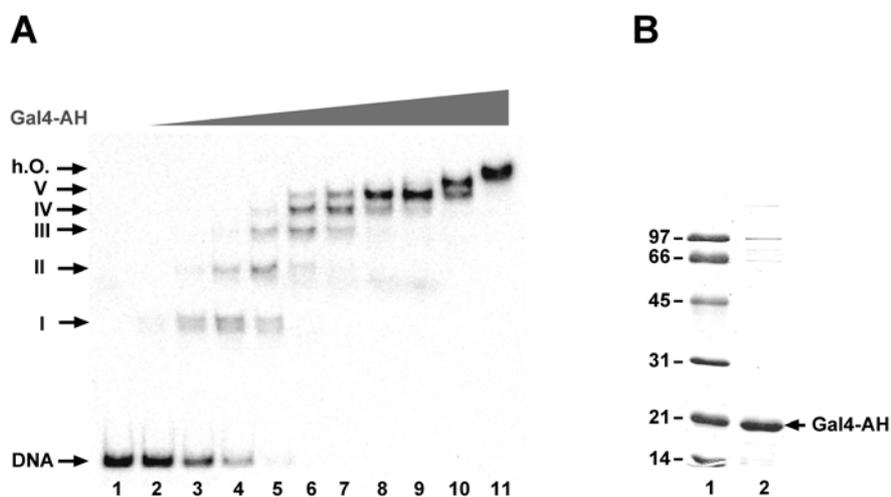
Ein Server, der Kernlokalisationssequenzen in akkurater Weise vorhersagen kann (Cokol *et al.*, 2000), findet sich unter: <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS>.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Strategie zur Reinigung von USA(100) und PC2

#### 4.1.1. Ein Testsystem zur Messung der Cofaktoraktivität

Zum Nachweis von PCs wurde ein rekonstituiertes basales Transkriptionssystem verwendet, das die generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIID und TFIIH, sowie RNA-Polymerase II enthält (Werten *et al.*, 1998). Als Reporter dienen virale Modellpromotoren (pMRG5, pML5xGAL), die fünf Gal4-Bindungsstellen stromaufwärts der TATA-Box und eine G-freie Kasette besitzen, und als zirkuläre Plasmide eingesetzt wurden. Als interne Kontrolle fungierte ein Reporter gen (pML $\Delta$ 53), dem Erkennungsstellen für Aktivatoren fehlen (Abschn. 3.16.1.). Es kamen verschiedene Modellaktivatoren, wie beispielsweise die Fusionsproteine Gal4-AH, Gal4-Sp1 und Gal4-VP16 zum Einsatz. Diese müssen gereinigt und auf ihre Transkriptions- bzw. DNA-Bindungsfunktion getestet werden. Dies soll hier am Beispiel von Gal4-AH demonstriert werden. Gal4-AH ist ein synthetischer Transkriptionsaktivator, der sich vom Hefeprotein Gal4 ableitet. Er ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren aus Säugerzellen aktiv (Übersichtsartikel: Ptashne und Gann, 1990).



**Abb. 9:** Reinigung von Gal4-AH und Analyse seiner DNA-Bindungsfunktion. (A) EMSA mit aufsteigenden Mengen an Gal4-AH (Spur 2 bis 11). Es wurden 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0 und 100,0 ng gereinigtes Gal4-AH und 20 fmol der 150 bp Sonde (mit 5 Gal4-Bindungsstellen) pro Spur eingesetzt. Die Besetzung der einzelnen Gal4-Bindungsstellen ist gezeigt (I bis V). Sind alle Bindungsstellen okkupiert kommt es zur Ausbildung von Komplexen höherer Ordnung (h.O.). Das *EcoRI*-Fragment des Plasmids pMLIN4 (Stelzer *et al.*, 1994) wurde, wie unter Abschn. 3.6.6. beschrieben, radioaktiv markiert, gereinigt, und als Sonde verwendet. (B) Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, das die Superdex 75 Fraktion des gereinigten Proteins Gal4-AH zeigt (Spur 2). Spur 1: Molekulargewichtsstandard in kDa.

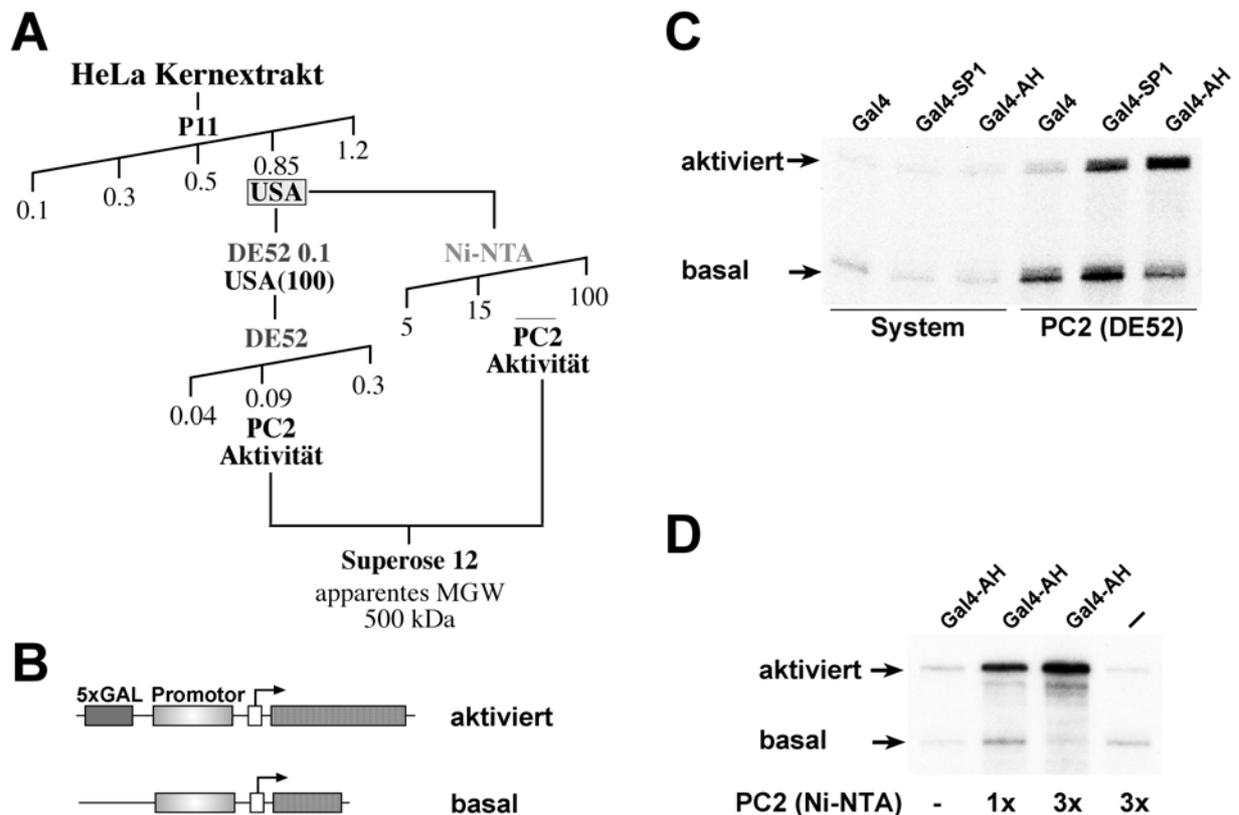
Das Protein besteht aus einer DNA-bindenden Domäne (Aminosäuren 1-94 von Gal4), einer kryptischen (Aminosäuren 95-147 von Gal4) sowie einer synthetischen Aktivierungsdomäne, dem 15 Aminosäuren langen AH-Peptid (Giniger und Ptashne, 1987) mit folgender Aminosäuresequenz: H<sub>2</sub>N-(ELQ)<sub>3</sub>-A-L<sub>2</sub>-Q<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub>H.

Gal4-AH wurde wie in Abschn. 3.13.8. beschrieben über Ammoniumsulfatfällung, Chromatographie an Heparin-Sepharose und anschließender Gelfiltration auf Superdex 75 gereinigt (Abb. 9B). In einem Gelretardationsexperiment (EMSA) wurde die DNA-Bindungsfähigkeit des gereinigten rekombinanten Proteins mit einer radioaktiv markierten 150 bp Sonde, welche fünf Gal4-Bindungsstellen besitzt, untersucht. Mit zunehmender Menge an Gal4-AH kann man bei gleichbleibender Konzentration der Sonde eine sequentiell ansteigende Besetzung der fünf vorhandenen Gal4-Bindungsstellen beobachten (Abb. 9A). Die Funktionalität der Aktivierungsdomäne wurde im rekonstituierten *in-vitro*-Transkriptions-system evaluiert (siehe Abb. 10C und 10D bzw. Daten nicht gezeigt). Eine schematische Darstellung der verwendeten Reporter findet sich in Abbildung 10B.

#### 4.1.2. Reinigungsschema

Schon 1991 führten erste Versuche, stimulierende Komponenten aus der Cofaktorfraktion USA (Abschn. 1.2.7.) zu isolieren, zur Entdeckung der USA(100) Aktivität (Meisterernst *et al.*, 1991), aus der später die PC2 Aktivität gereinigt wurde (Kretzschmar *et al.*, 1994b). Die Abbildung 10A zeigt das Reinigungsschema, das in dieser Arbeit verwendet wurde. Die PC2 Aktivität kann aus USA sowohl durch DE52-Chromatographie (Abb. 10C) als auch durch Chromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Abb. 10D; Halle *et al.*, 1995) dargestellt werden. Eine weitergehende Analyse mittels Größenausschlußchromatographie (Superose 12, SMART-System) bei annähernd physiologischen pH- und Salzbedingungen zeigte, daß die Aktivität bei einem apparenten Molekulargewicht von 500 kDa eluiert (Kretzschmar *et al.*, 1994b). Im Labor konnte zudem gezeigt werden, daß für die PC2 Aktivität weder die TAFs des TFIID-Komplexes noch bereits bekannte PCs ursächlich verantwortlich sind. Darüber hinaus unterschied sich PC2 von anderen Cofaktoren dadurch, daß es auch nach der Bindung von TFIIA und TFIID an den Promotor aktiv war, was auf eine Funktion in einem späteren Schritt der Präinitiationskomplexbildung hinweist (G. Stelzer und M. Meisterernst, unveröffentlicht). Auffällig ist zudem die Stimulation der basalen Transkription durch PC2 Fraktionen (siehe Abb. 10C, vierte Spur von links) – eine Eigenschaft die auf eine mehr generelle Cofaktoraktivität hindeutete, und diese Aktivität besonders interessant erscheinen ließ. Es war deshalb ein primäres Ziel Polypeptide zu identifizieren, die mit der PC2 Aktivität coeluierten. Allerdings führten weitere klassische Chromatographieschritte nach der DEAE-Cellulose (DE52) fast immer zur Inaktivierung von PC2, weshalb sich dieses Unterfangen zunächst schwierig gestaltete. Deshalb wurde, wie im weiteren Verlauf dieser Arbeit

dargestellt, der Versuch unternommen Affinitätssysteme zu entwickeln, welche die Identifizierung von PC2 assoziierten Polypeptiden ermöglichen sollten. Als besonders hilfreich hat sich dabei die Affinitätschromatographie an GST-VP16 (immobilisiert auf Glutathionsepharose), sowie der Einsatz eines motivspezifischen Antikörpers erwiesen, der gegen homopolymere Glutaminabfolgen in Proteinen gerichtet ist. Davon wird in den nächsten Abschnitten die Rede sein.

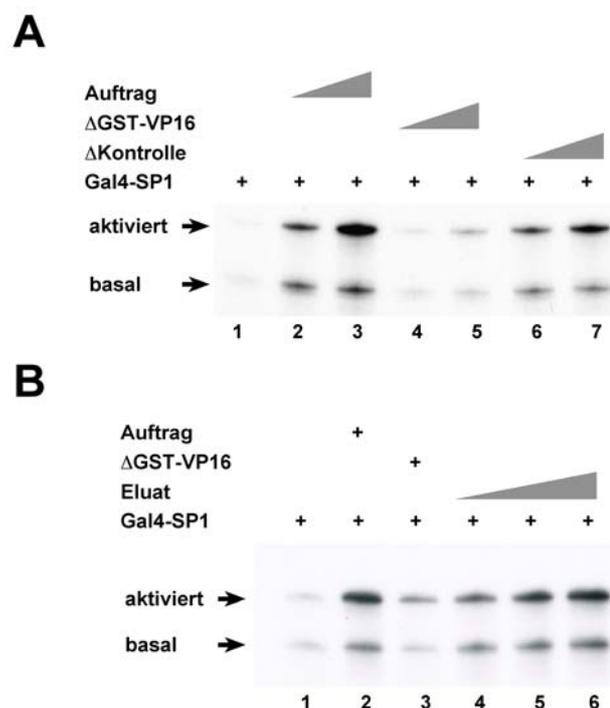


**Abb. 10:** Reinigungsstrategie für PC2 und Messung der Cofaktoraktivität in einem rekonstituierten *in-vitro*-Transkriptionssystem. (A) Flußdiagramm zur Isolierung der PC2 Aktivität ausgehend von einem HeLa Zellkernextrakt über eine Phosphocellulose-Säule (P11) und zwei DEAE-Cellulose-Säulen (DE52) bzw. Metallionenaffinitätschromatographie (Ni-NTA). USA eluiert bei 0.85 M KCl von der Phosphocellulose P11. Der Säulendurchbruch der ersten DEAE-Cellulose-Säule bei 0.1 M KCl (DE52 0.1) enthält USA(100), die Vorläuferfraktion zur Anreicherung der PC2 Aktivität, welche in einem Gipfel bei 0.09 M KCl der nachgeschalteten zweiten DE52-Säule eluiert. Eine biochemisch und funktionell identische Aktivität findet sich in den Eluatzen (zwischen 20 und 100 mM Imidazol) einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarosesäule. MGW: Molekulargewicht. (B) Die verwendeten Reporterkonstrukte pMRG5 (aktiviert) und pMLΔ53 (basal) sind schematisch dargestellt. Der Reporter zur Messung der aktivierten Transkription enthält fünf Bindungsstellen für Gal4-Aktivatorproteine (5xGAL). (C) Analyse der PC2 Aktivität einer DE52-Fraktion. 6 µl der Fraktion wurden im rekonstituierten *in-vitro*-Transkriptionssystem mit jeweils 20 ng der beschriebenen Reporter getestet. Als Aktivatoren (je 25 ng) wurden Gal4(1-94)-Sp1 und Gal4(1-147)-AH benutzt. Gal4(1-94), das keine Aktivierungsdomäne aufweist, diente als Kontrolle. (D) Analyse der PC2 Aktivität einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Fraktion (20 mM Imidazol). Es wurden 1 und 3 µl der Fraktion wie in (C) getestet.

## 4.2. Die Coaktivatorfunktion von PC2 läßt sich durch Affinitätssysteme depletieren

### 4.2.1. Die PC2-Funktion bindet an die Aktivierungsdomäne des viralen Transaktivators VP16

Ausgangspunkt für die Affinitätsreinigung mittels der Aktivierungsdomäne von VP16 (Abschn. 1.2.5.2.) war folgende Hypothese: "Ein Coaktivator sollte an die Transaktivierungsdomäne eines Modellaktivators binden". Der virale Aktivator VP16 wurde deshalb gewählt, weil er zum einen eine kompakte Aktivierungsdomäne (79 aa, 8.4 kDa) aufweist, die sehr gut charakterisiert ist, zum anderen in vielen Eukaryonten, von der Bäckerhefe bis zum Menschen, aktiv ist. Letzteres macht ihn zu einem idealen Werkzeug für die Untersuchung genereller Cofaktorfunktionen, die evolutionär konserviert sind. Ein gewisser Nachteil von VP16 ist die Tatsache, daß seine Aktivierungsdomäne einen sehr hohen Anteil an sauren Aminosäureresten besitzt ( $pI=3.4$ ), was eine Überlagerung von Kationenauschereffekten mit der eigentlichen Affinitätschromatographie mit sich bringt. Dieses Manko kann aber zum Teil dadurch wettgemacht werden, daß Punktmutationen bekannt sind, die zu einem Funktionsverlust der Aktivierungsdomäne *in vivo* und *in vitro* führen (Abschn. 1.2.5.2.), welche wiederum als „Kontrollsäulen“ (Abschn. 3.13.6.) eingesetzt werden können. Von dieser Möglichkeit wird in einem späteren Abschnitt der



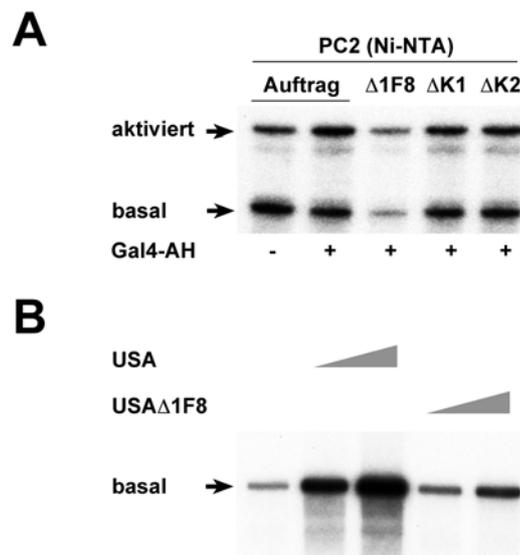
**Abb. 11:** Depletion der Cofaktoraktivität von PC2 durch immobilisiertes GST-VP16. **(A)** Die Aktivität wird durch GST-VP16 ( $\Delta$ GST-VP16) nicht aber durch eine GST-Kontrollsäule ( $\Delta$ Kontrolle) gebunden. **(B)** Die Aktivität läßt sich mit Hilfe von 10 mM Glutathion von der Affinitätssäule eluieren (Eluat). Als Auftrag diente jeweils eine PC2 DE52-Fraktion.

Arbeit Gebrauch gemacht. Vorarbeiten im Labor (K. Kaiser) konnten demonstrieren, daß die PC2 Funktion in der Tat an immobilisiertes GST-VP16 bindet, nicht aber an GST-Kontrollsäulen. Die Cofaktoraktivität läßt sich zudem durch eine schonende Elution der Affinitätssäule mit Glutathion – dabei wird allerdings die funktionelle Gruppe (GST-VP16) miteluiert – zurückgewinnen. Das Verfahren ist exemplarisch in Abbildung 11 dargestellt. Da bei dieser Methode ein großer Überschuß an GST-VP16-Fusionsprotein in den Eluaten präsent ist, war sie so nicht einsetzbar um Polypeptide in einem silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel zu identifizieren, die an die Aktivierungsdomäne von VP16 gebunden hatten. Ferner war zu diesem Zeitpunkt schon bekannt, daß VP16 mit verschiedenen Coaktivatoren (z.B. PC4, SAGA und NuA4) und generellen Transkriptionsfaktoren wechselwirken kann (Abschn. 1.2.5.2.), so daß die Suche nach einem weiteren Aktivator-unabhängigen Affinitätssystem angezeigt war.

#### **4.2.2. Die PC2 Funktion wird durch einen anti-Polyglutamin-Anktikörper beeinträchtigt**

Auf der Suche nach einem zusätzlichen Affinitätssystem erwies sich ein monoklonaler Motivantikörper (1F8; Dr. H.T.M. Timmers, Utrecht, unveröffentlicht), der homopolymere Glutaminabfolgen in Proteinen bindet, als geeignetes Werkzeug zur (partiellen) Depletion der PC2 Funktion. Motivantikörper, welche Proteinmotive, die selbstverständlich in vielen verschiedenen zellulären Proteinen vorhanden sein können, als antigene Epitope erkennen, waren insofern gute Kandidaten, da Transkriptionsfaktoren in der Regel eines oder mehrere dieser antigenen Determinanten besitzen. Zum Beispiel sind glutamin-, serin-/threonin-, aspartat-/glutamat- und prolinreiche Sequenzabschnitte bei Transkriptionsfaktoren häufig anzutreffen (Abschn. 1.2.5.). Die bereits erwähnte Stimulation der basalen Transkription durch PC2 Fraktionen (Abb. 10C) war außerdem in funktioneller Hinsicht ähnlich zur Wirkungsweise des sogenannten Mediators aus *S. cerevisiae*, einem Coaktivator der Bäckerhefe, welcher zu Beginn der neunziger Jahre erstmals beschrieben wurde (Abschn. 1.3.1.). Der Hefe-Mediator enthält zwei Polypeptide (Med3 und Gal11), mit Polyglutaminregionen, so daß ein Austesten des Motivantikörpers 1F8 sinnvoll erschien.

Tatsächlich konnte eine deutliche Verminderung der Cofaktorfunktion von PC2 beobachtet werden, wenn PC2 Fraktionen mit auf Protein G Sepharose immobilisiertem 1F8-Antikörper inkubiert wurden, und eine Analyse des Überstandes im rekonstituierten *in-vitro*-Transkriptionssystem erfolgte (Abb. 12A, mittlere Spur). Auffällig war wiederum, daß auch die basale Funktion, ähnlich wie bei der Depletion an immobilisiertem GST-VP16 (Abb. 12A), von dieser Prozedur betroffen war. Wie in Abb. 12B zu erkennen, reduzierte die Immundepletion der PC2 Vorläuferfraktion USA mit dem anti-Polyglutamin-Antikörper die



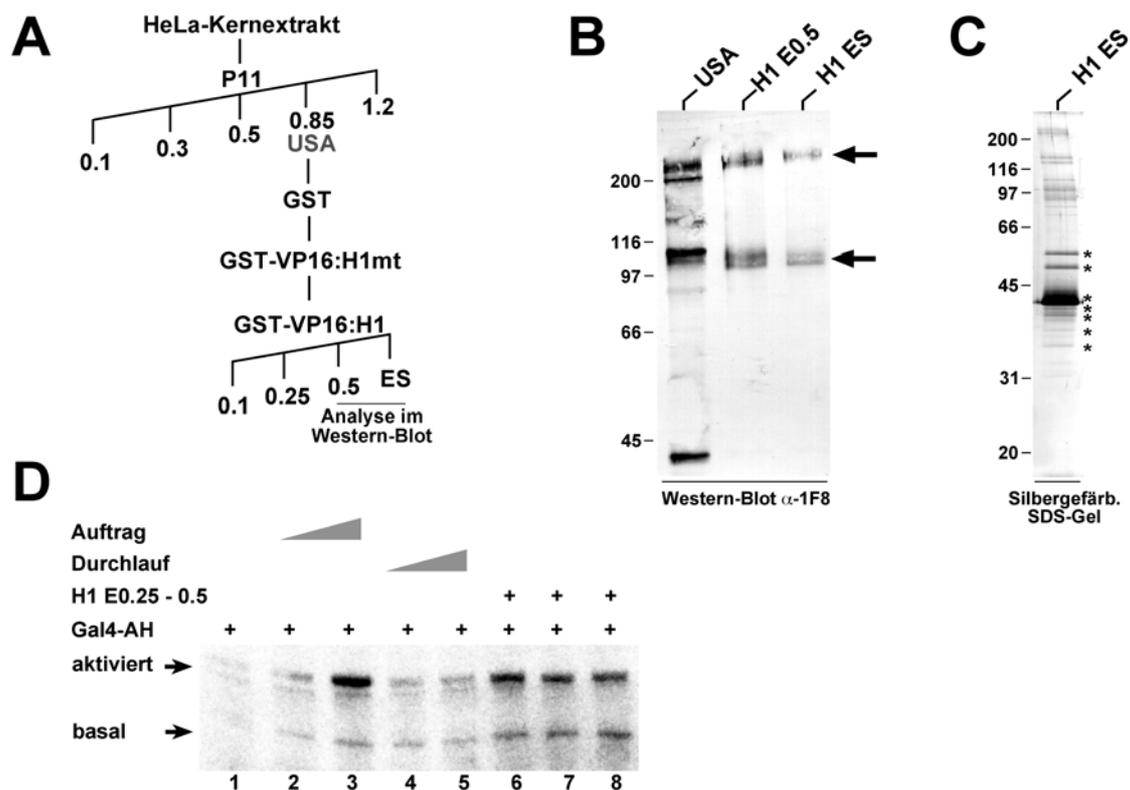
**Abb. 12:** Der anti-Polyglutamin-Motivantikörper 1F8 als Werkzeug zur Bindung PC2 assoziierter Proteine. **(A)** Depletion der PC2 Aktivität ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Fraktion) im Durchlauf ( $\Delta 1\text{F8}$ ) einer 1F8 Protein G Sepharosesäule. Als Säulen zur Spezifitätskontrolle wurden Protein G Sepharose gebundener NC2 $\alpha$ (4G7)-Antikörper ( $\Delta\text{K1}$ ) und Protein G Sepharose ( $\Delta\text{K2}$ ) eingesetzt. Die *in-vitro*-Transkriptionsanalyse erfolgte wie in Abb. 10 dargestellt. **(B)** Beeinträchtigung der basalen Stimulation der *in-vitro*-Transkription durch USA im Durchbruch ( $\text{USA}\Delta 1\text{F8}$ ) einer 1F8 Protein G Sepharosesäule. Die Analyse erfolgte im rekonstituierten System mit TBP und 50 ng des Reporters pML5xGAL (ohne Gal4-Aktivatorproteine).

Stimulation der basalen Transkription durch USA in ähnlicher Weise. Da der Motivantikörper auch TBP und damit den generellen Transkriptionsfaktor TFIID (Abschn. 1.2.3.) bindet (USA enthält TFIID), wurde das Experiment mit für die Transkription sättigenden Mengen an TBP durchgeführt. Eine stabile Bindung von TBP an das Reportergen wurde durch eine fünfzigminütige Vorinkubation von TBP und TFIIA mit dem Reporter (vor Zugabe der anderen GTFs bzw. von USA) gewährleistet. Nichtsdestotrotz könnte der beobachtete Effekt auch durch einen Synergismus von TFIID und PC2 in USA erklärt werden, und zwar dann, wenn PC2 den in USA präsenten TFIID-Komplex durch Austausch von nicht-produktiven (TBP-enthaltenden) PICs (Abschn. 1.2.4.) funktionell ins Spiel bringt.

Eine Analyse der Polypeptide in einem silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel, welche an den Motivantikörper gebunden hatten, ergab – wie erwartet – ein komplexes Bandenmuster (Daten nicht gezeigt), das aufgrund der inhärenten Promiskuität des Antikörpers zunächst nicht näher analysiert wurde. Zusammenfassend kann man jedoch feststellen, daß nun zu diesem Zeitpunkt zwei Verfahren etabliert waren, die, obwohl beide nicht hochspezifisch, in Kombination (zumindest) die Identifikation von PC2 (Abb. 10A) assoziierten Polypeptiden erlauben sollten. Diese Annahme war auch insofern berechtigt, da es keinen einsichtigen Grund dafür gab, daß Eiweiße, die nicht mit PC2 korreliert sind, ein kongruentes Bindungsverhalten an beide Affinitätsäulen zeigen könnten. Das genaue Vorgehen wird im nächsten Kapitel beschrieben.

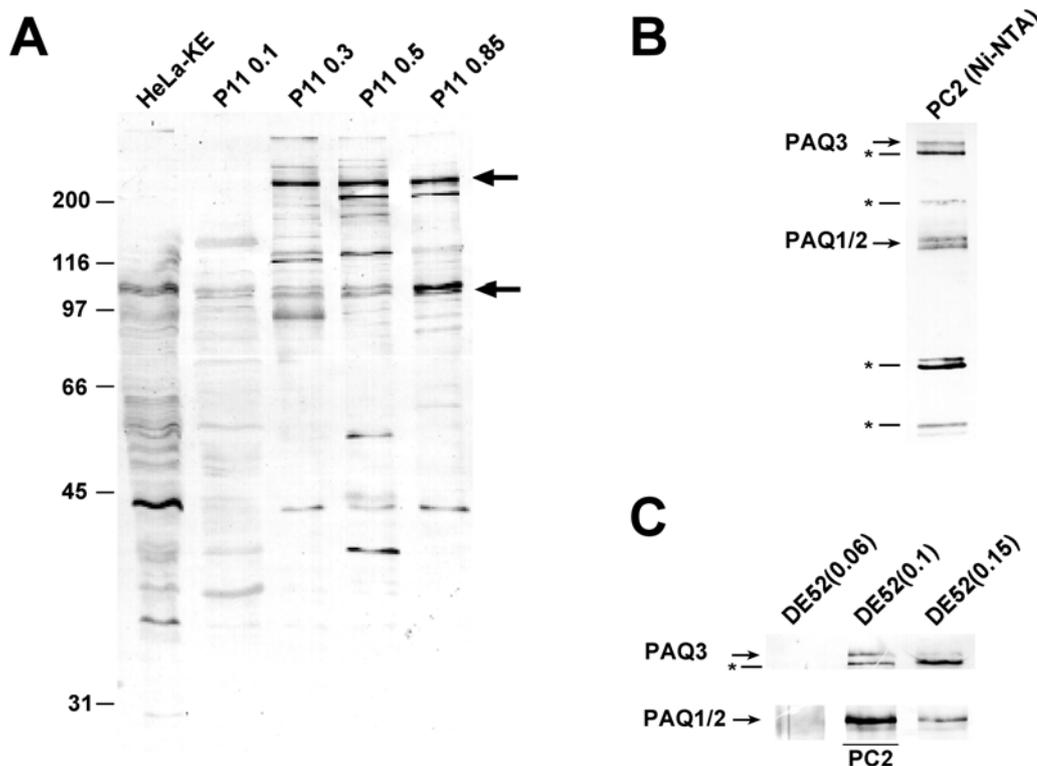
### 4.2.3. Proteine mit polyglutaminreichen Regionen coeluiieren mit PC2

Die Strategie zur Identifizierung von Proteinen, die an GST-VP16 binden und homopolymere Glutaminabfolgen in ihrer Primärstruktur aufweisen, ist anschaulich in Abb. 13 dargestellt. Die Chromatographieschritte wurden wie beschrieben durchgeführt (Abschn. 3.13.6.). Da die Subregion H2 der VP16-Aktivierungsdomäne in unseren *in-vitro*-Transkriptionssystemen praktisch inaktiv ist (Ikeda *et al.*, 2002), wurde mit GST-VP16:H1 als Affinitätssystem gearbeitet. Als Auftrag wurde die PC2 Vorläuferfraktion USA benutzt.



**Abb. 13:** Analyse von Proteinen mit polyglutaminreichen Regionen aus USA, die an die Subdomäne H1 der VP16 Aktivierungsdomäne (VP16:H1) binden. **(A)** Reinigungsschema. GST: Glutathion S-Transferase, GST-VP16:H1Mt: GST-VP16:H1-Fusionsprotein mit F442P Mutation in H1, GST-VP16:H1: GST-VP16:H1-Fusionsprotein; die Fusionsproteine waren auf Glutathionsepharose immobilisiert. Elutionsschritte sind in [M] KCl angegeben. ES: Elution bei 0.1 M KCl mit dem Detergens N-Laurylsarcosin (0.2 %). **(B)** Analyse der an GST-VP16:H1 (H1) gebundenen Proteine mit dem anti-Polyglutamin-Motivantikörper 1F8 ( $\alpha$ -1F8). Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von 230 kDa und 105/108 kDa, welche mit GST-VP16:H1 interagieren, werden durch 1F8 detektiert. **(C)** Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, das diejenigen Proteine zeigt, welche im sehr sauberen Detergenseluat (ES) der H1-Affinitätssäule enthalten sind. Kontaminierende Polypeptide, die aus der Affinitätssäule selbst stammen, sind gekennzeichnet (\*). **(D)** Transkriptionsanalyse der Fraktionen aus der Affinitätschromatographie an immobilisiertem GST-VP16:H1 im rekonstituierten System mit je 50 ng der Reporter pMRG5 (aktiviert) und pML $\Delta$ 53 (basal). Auftrag: 0.2 und 1.0  $\mu$ l USA, Durchlauf: 0.2 und 1.0  $\mu$ l des 0.1 M KCl Säulendurchbruchs der H1-Affinitätssäule. Es wurden zwei Fraktionen beim 0.25 M KCl Elutionsschritt gesammelt, die getrennt analysiert wurden (Spur 6 und 7). Spur 8: 0.5 M KCl Eluat. Das Eluat ES wurde nicht analysiert, da das Detergens mit der Cofaktorfunktion interferiert (Daten nicht gezeigt).

Die Experimente führten zu folgendem Ergebnis. Mit Hilfe des anti-Polyglutamin-Antikörpers konnten drei Polypeptide – eine Proteinbande bei ca. 230 kDa und ein Duplet bei ca. 105/108 kDa – im Western-Blot detektiert werden, die auf einer GST-VP16:H1-Glutathionsepharose-Säule (jedenfalls zum Teil) mit der Cofaktorfunktion coeluierten. Als nächstes stellte sich die Frage, ob diese Polypeptide auch in PC2 Fraktionen präsent sind. Deshalb wurde das Elutionsverhalten dieser Proteine auf der Phosphocellulose P11, der DEAE-Cellulose (DE52) und der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gemäß dem PC2 Reinigungsschema (siehe Abb. 10A) näher untersucht (Abb. 14).



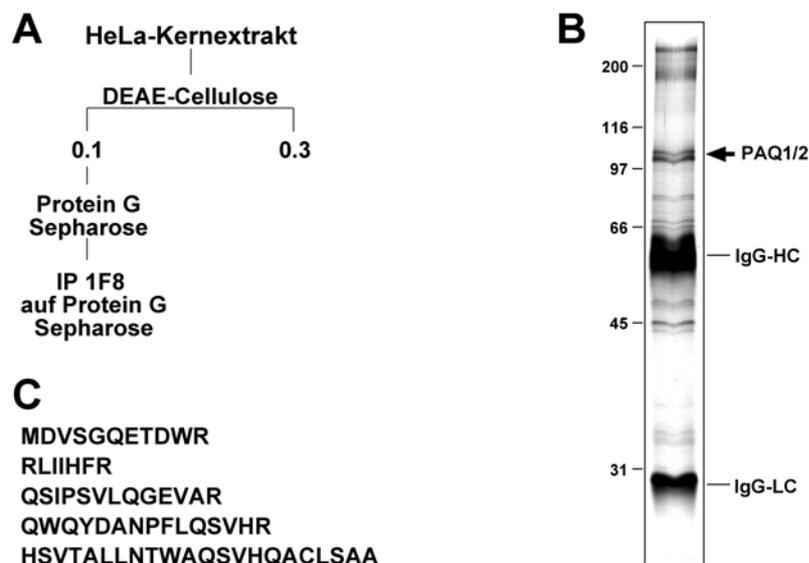
**Abb. 14:** PC2-assoziierte glutamin(Q)-reiche Proteine: PAQs. (A) Western-Blot-Analyse der Phosphocellulose P11 Fraktionen mit dem anti-Polyglutamin-Motivantikörper 1F8. Die drei Polypeptide, die spezifisch an die H1-Domäne von VP16 binden (siehe Abb. 13B), sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Das Duplet bei 105/108 kDa ist in der P11 0.85 M KCl Fraktion (USA) angereichert. HeLa-KE: HeLa-Kernextrakt. (B) und (C) PAQ1/2 und PAQ3 sind in PC2 Fraktionen präsent. Es handelt sich dabei um diejenigen Polypeptide, welche spezifisch mit GST-VP16:H1 interagieren. Glutaminreiche Proteine, welche keine strikte Korrelation zur Funktion aufweisen (siehe Text), sind markiert (\*). (C) DE52 Eluate bei 0.06 M KCl, 0.1 M KCl (PC2) und 0.15 M KCl wurden in den Spuren 1 bis 3 aufgetragen.

Dabei konnte gezeigt werden, daß die drei Polypeptide, welche mit GST-VP16:H1 interagieren, Bestandteile von PC2 Fraktionen sind, und zwar sowohl von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose als auch von DE52(0.1) Fraktionen (Abb. 14B und C). Deshalb wurden diese PC2-assoziierten glutamin(Q)-reichen Proteine zunächst mit PAQ1/2 (105/108 kDa Duplet) und PAQ3 (230 kDa Bande) bezeichnet. Der Einsatz der beiden Affinitätssysteme war also insofern erfolgreich, daß PAQ1/2 und PAQ3 als Kandidaten für Proteine, die mit der PC2 Funktion verbunden sein könnten, identifiziert wurden.

### 4.3. Identifizierung und Reinigung des PC2-assoziierten glutaminreichen Proteins PAQ und Klonierung seines Gens

#### 4.3.1. Reinigung von PAQ1/2 zur Ermittlung von Peptidsequenzen mittels Massenspektroskopie

Mit Hilfe des Motivantikörpers 1F8, der auf Protein G Sepharose immobilisiert war, wurde eine präparative Immunpräzipitation durchgeführt, mit dem Ziel genügende Mengen an PAQ1/2-Protein für die Bestimmung von Peptidsequenzen im Massenspektrometer bereitzustellen. Zu diesem Zweck wurde ein HeLa-Kernextrakt auf DEAE-Cellulose (DE52) aufgetragen und der Säulendurchbruch bei 0.1 M KCl (Puffer BC100) als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation verwendet, nachdem die Ionenstärke auf 0.3 M KCl eingestellt und das Detergens Igepal CA630 in einer Endkonzentration von 0.1 % zugegeben wurde (siehe auch Abschn. 3.13.7.). Um den Hintergrund an unspezifisch bindenden Proteinen zu reduzieren fand eine Vorinkubation der DEAE-Cellulose Fraktion mit Protein G Sepharose statt. Das Verfahren ist in Abb. 15A skizziert. Die an den Antikörper gebundenen Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, mittels kolloidaler Coomassie-Färbung (Abschn. 3.9.3.4.) sichtbar gemacht, und die beiden Polypeptide der Doppelbande bei 105/108 kDa getrennt ausgeschnitten (Abb. 15B). Anschließend wurde der tryptische Verdau der Eiweiße im Massenspektrometer analysiert (Dr. C. Eckerskorn, Toplab). Die erhaltenen Peptidfragmente sind in Abb. 15C dargestellt.



**Abb. 15:** Ermittlung von PAQ1/2 Peptidsequenzen. (A) Schema der präparativen Immunpräzipitation (IP). (B) Analytisches silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Die in (C) aufgelisteten Peptidsequenzen wurden aus der markierten (Pfeil) Doppelbande gewonnen. IgG-HC (schwere Kette), IgG-LC (leichte Kette des Antikörpers). (C) Durch Massenspektrometrie erhaltene Peptidfragmente.

Die Analyse ergab zudem, daß die beiden Polypeptide des Duplets sehr wahrscheinlich zum identischen Protein gehören. Das unterschiedliche Laufverhalten im SDS-Gel könnte posttranslationale Modifikationen zur Ursache haben, da Hinweise auf das Vorliegen von zwei verschiedenen Spleißvarianten in dieser Arbeit nicht gefunden werden konnten. Außerdem war häufig eine Variation der relativen Intensitäten der beiden Banden zueinander in der SDS-PAGE zu beobachten, auch wenn für unterschiedliche Experimente die exakt identische Probe verwendet wurde. Daher besteht auch die Möglichkeit, daß das beobachtete Laufverhalten im SDS-Gel eine intrinsische Eigenschaft des Proteins ist, und daher auf zwei potentiell unterschiedliche Konformere zurückgeführt werden könnte, deren Sekundärstruktur nicht vollständig durch die Einlagerung in die SDS-Micellen aufgelöst wird.

Die Identität von PAQ3 konnte bei diesem Experiment jedoch nicht geklärt werden, da nur unzureichende Mengen des Proteins immunpräzipitiert wurden (siehe Abb. 15B). Wie sich im Verlauf der Arbeit indes herausstellte, war PAQ3 ein bereits bekanntes Protein (TRAP230; Ito *et al.*, 1999), das zusammen mit PAQ1/2 in einem Multiproteinkomplex vorliegen kann (diese Arbeit). Deshalb wird PAQ1/2 im folgenden einfach mit PAQ bezeichnet.

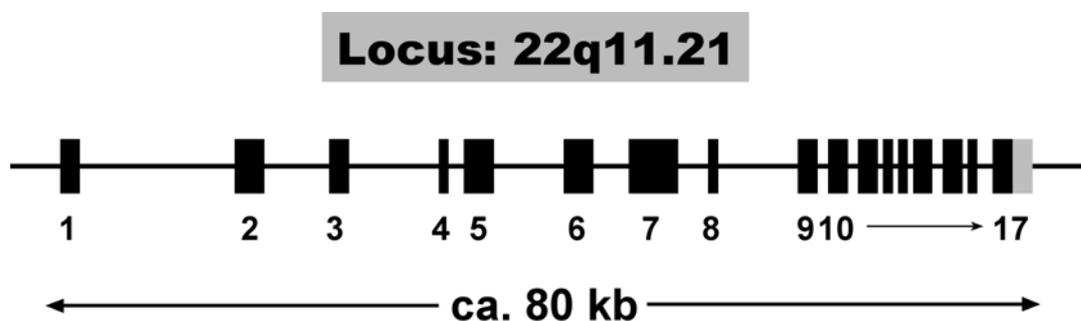
Die Peptidesequenzen wurden benutzt um mit den Programmen BLASTP und TBLASTN (Abschn. 3.19.1.1.) die NCBI-Datenbanken zu durchsuchen. Es konnte dabei kein – zu diesem Zeitpunkt – bekanntes Protein gefunden werden. Allerdings war es möglich potentielle Abschnitte der PAQ cDNA in Form von ESTs (engl. „*expressed sequence tags*“) und genomische Sequenzen auf sogenannten PAC-Konstrukten (engl. „*phage P1 artificial chromosomes*“) zu identifizieren. Diese Informationen wurden verwendet um die komplette cDNA des Proteins zu klonieren.

#### **4.3.2. Klonierung der cDNA von PAQ und Bestimmung der Genstruktur**

Die Analyse des genomischen PAC-Konstruktes PAC m11 (NCBI Genbank Zugriffsnummer AC004033; Dr. Bruce Roe, Universität von Oklahoma) zeigte, daß sich das Gen für PAQ auf dem humanen Chromosom 22 befindet, was die nachfolgende Aufklärung der Genstruktur erheblich erleichterte. Der Grund dafür war, daß das Chromosom 22 zum damaligen Zeitpunkt (Juli 1999) bereits nahezu komplett sequenziert war.

Durch eine Kombination von Exon/Intron-Vorhersagen *in silico* (Abschn. 3.19.2.) und dem Aneinanderreihen von überlappenden EST-Sequenzen (Schuler, 1997; Usuka *et al.*, 2000) war es zunächst möglich, die vollständige cDNA (inklusive des Polyadenylierungssignals) – nach manuellen Korrekturen – vorherzusagen. Der offene Leserahmen codiert für ein Protein aus 748 Aminosäuren.

Um die PAQ cDNA auch physikalisch zu isolieren wurde eine Adenokarzinom cDNA Bibliothek (Clontech) mit einer Sonde durchmustert, die den Nukleotiden 88-379 des EST-Klons IMAGp998E13267 (Genbank Zugriffsnummer AL046886) entspricht. Die Sonde wurde durch RT-PCR aus HeLa Gesamt-RNA generiert (Abschn. 3.12.2.). Der isolierte cDNA Klon (ca. 2.1 kb), DG1.1 genannt (G. Stelzer), repräsentiert jedoch nicht die vollständige cDNA, sondern codiert nur für die Aminosäuren 1-382 von PAQ. Da der EST-Klon IMAGp998E13267 bis auf den N-Terminus von PAQ die komplette cDNA-Sequenz besitzt wurde die vollständige PAQ cDNA folgendermaßen hergestellt. Mit den Primern DG-NotI und DG-Xho-1000 (Abschn. 2.7) wurde aus dem Klon DG1.1 mittels PCR ein 1 kb Fragment amplifiziert, das die Exons 1 und 2 der PAQ cDNA beinhaltet. Das Amplicon wurde dann in die *NotI*- und *XhoI*-Schnittstellen eines modifizierten pcDNA3.1-Plasmids (Invitrogen, NL) kloniert, dessen *HindIII*-Restriktionsschnittstelle zuvor eliminiert worden war. Nun wurde ein 2.7 kb Fragment aus dem EST-Klon IMAGp998E13267 in die *HindIII*- und *XhoI*-Schnittstelle des im vorigen Schritt erzeugten Vektors kloniert, was zur Herstellung der vollständigen cDNA führte (Berti *et al.*, 2001). Die Sequenz war in vollkommener Übereinstimmung mit den Daten aus der Massenspektrometrie, da z.B. sowohl ein Peptid, das identisch zum N-Terminus (MDVSGQETDWR), als auch ein Peptid, welches identisch zum C-Terminus (HSVTALLNTWAQSVHQACLSAA) von PAQ ist, identifiziert werden konnte (Abb. 15C). Darüber hinaus konnte mittels eines *in-vitro*-Transkriptions-Translationssystems (Retikulozyten) demonstriert werden, daß mit der klonierten cDNA als Matrize ein Polypeptid mit einem zum endogenen PAQ identischen apparenten Molekulargewicht (SDS-PAGE) synthetisiert werden kann (Daten nicht gezeigt). Die Organisation der Exon-Intron-Struktur des PAQ-Gens (Genbank-Eintrag: PCQAP; Zugangsnummer AF328769), und damit auch die cDNA-Sequenz, wurde im Labor von Dr. G. Novelli (Universität Tor Vergata, Rom) durch PCR-Analysen verifiziert (Berti *et al.*, 2001). Eine skizzierte Darstellung des Gens ist in Abb. 16 zu finden. Die komplette cDNA- und Aminosäuresequenz findet sich in Abb. 17.



**Abb. 16:** Exon-Intron-Struktur des PAQ-Gens. Das Gen liegt auf dem Locus 22q11.21 und besteht aus 17 Exons (schwarze Rechtecke). Die 3'UTR (nicht translaterter Bereich) des Exons 17 ist grau hinterlegt. Exon 4 ist das kleinste (30 bp), Exon 7 das größte (345 bp) Exon. Die genomische Organisation wurde durch das Humangenomprojekt bestätigt. Der Genbankeintrag (BC013985) weist allerdings einen Polymorphismus in Exon 7 auf, was zu einer Verlängerung der CAG-Sequenzwiederholungen um CAGCAG an Position 260 der publizierten cDNA (AF328769) führt.

5' GCA CGA GGG GCC AAG CGG GAT ACG GGC GGC GGG AGC TGG GGA ACA GGC ATG GAC  
M D

10 19 28 37 46

55 GTT TCC GGG CAA GAG ACC GAC TGG CGG AGC ACC GCC TTC CGG CAG AAG CTG GTC  
V S G Q E T D W R S T A F R Q K L V

64 73 82 91 100

109 AGT CAA ATC GAG GAT GCC ATG AGG AAA GCT GGT GTG GCA CAC AGT AAA TCC AGC  
S Q I E D A M R K A G V A H S K S S

118 127 136 145 154

163 AAG GAT ATG GAG AGC CAT GTT TTC CTG AAG GCC AAG ACC CGG GAC GAA TAC CTT  
K D M E S H V F L K A K T R D E Y L

172 181 190 199 208

217 TCT CTC GTG GCC AGG CTC ATT ATC CAT TTT CGA GAC ATT CAT AAC AAG AAA TCT  
S L V A R L I I H F R D I H N K K S

226 235 244 253 262

271 CAA GCT TCC GTC AGT GAT CCT ATG AAT GCA CTC CAG AGC CTG ACT GGC GGA CCT  
Q A S V S D P M N A L Q S L T G G P

280 289 298 307 316

325 GCT GCG GGA GCC GCT GGA ATT GGC ATG CCT CCT CGG GGC CCG GGA CAG TCT CTG  
A A G A A G I G M P P R G P G Q S L

334 343 352 361 370

379 GGC GGG ATG GGT AGC CTT GGT GCC ATG GGA CAG CCA ATG TCT CTC TCA GGG CAG  
G G M G S L G A M G Q P M S L S G Q

388 397 406 415 424

433 CCG CCT CCT GGG ACC TCG GGG ATG GCC CCT CAC AGC ATG GCT GTC GTG TCT ACG  
P P P G T S G M A P H S M A V V S T

442 451 460 469 478

487 GCA ACT CCA CAG ACC CAG CTG CAG CTC CAG CAG GTG GCG CTG CAG CAG CAG CAG  
A T P Q T Q L Q L Q Q V A L Q Q Q Q

496 505 514 523 532

541 CAA CAG CAG CAG TTC CAG CAG CAG CAG CAG GCG GCG CTA CAG CAG CAG CAG CAG  
Q Q Q Q F Q Q Q Q Q A A L Q Q Q Q Q

550 559 568 577 586

595 CAG CAG CAA CAG CAG CAG TTC CAG GCT CAG CAG AGT GCC ATG CAG CAG CAG TTC  
Q Q Q Q Q Q F Q A Q Q S A M Q Q Q F

604 613 622 631 640

649 CAA GCA GTA GTG CAG CAG CAG CAG CAG CTC CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
Q A V V Q Q Q Q Q L Q Q Q Q Q Q Q

658 667 676 685 694

703 CAT CTA ATT AAA TTG CAT CAT CAA AAT CAG CAA CAG ATA CAG CAG CAG CAA CAG  
H L I K L H H Q N Q Q Q I Q Q Q Q Q

712 721 730 739 748

757 CAG CTG CAG CGA ATA GCA CAG CTG CAG CTC CAA CAA CAG CAA CAG CAG CAG CAG  
Q L Q R I A Q L Q L Q Q Q Q Q Q Q

766 775 784 793 802

811 CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG GCT TTG CAG GCC CAG CCA CCA ATT CAG CAG  
Q Q Q Q Q Q Q Q A L Q A Q P P I Q Q

820 829 838 847 856

865 CCA CCG ATG CAG CAG CCA CAG CCT CCG CCC TCC CAG GCT CTG CCC CAG CAG CTG  
P P M Q Q P Q P P S Q A L P Q Q L

874 883 892 901 910

919                    928                    937                    946                    955                    964  
 CAG CAG ATG CAT CAC ACA CAG CAC CAC CAG CCG CCA CCA CAG CCC CAG CAG CCT  
Q Q    M    H    H    T    Q    H    H    Q    P    P    P    Q    P    Q    Q    P

973                    982                    991                    1000                    1009                    1018  
 CCA GTT GCT CAG AAC CAA CCA TCA CAA CTC CCG CCA CAG TCG CAG ACC CAG CCT  
 P    V    A    Q    N    Q    P    S    Q    L    P    P    Q    S    Q    T    Q    P

1027                    1036                    1045                    1054                    1063                    1072  
 TTG GTG TCA CAG GCG CAA GCT CTC CCT GGA CAA ATG TTG TAT ACC CAA CCA CCA  
 L    V    S    Q    A    Q    A    L    P    G    Q    M    L    Y    T    Q    P    P

1081                    1090                    1099                    1108                    1117                    1126  
 CTG AAA TTT GTC CGA GCT CCG ATG GTG GTG CAG CAG CCC CCA GTG CAG CCC CAG  
 L    K    F    V    R    A    P    M    V    V    Q    Q    P    P    V    Q    P    Q

1135                    1144                    1153                    1162                    1171                    1180  
 GTG CAG CAG CAG CAG ACA GCA GTA CAG ACA GCT CAG GCT GCC CAG ATG GTG GCT  
 V    Q    Q    Q    Q    T    A    V    Q    T    A    Q    A    A    Q    M    V    A

1189                    1198                    1207                    1216                    1225                    1234  
 CCC GGA GTC CAG GTC AGC CAG AGC AGC CTC CCC ATG CTG TCC TCG CCG TCA CCG  
 P    G    V    Q    V    S    Q    S    S    L    P    M    L    S    S    P    S    P

1243                    1252                    1261                    1270                    1279                    1288  
 GGC CAG CAG GTG CAG ACC CCG CAG TCG ATG CCC CCT CCC CCC CAG CCG TCC CCG  
 G    Q    Q    V    Q    T    P    Q    S    M    P    P    P    P    Q    P    S    P

1297                    1306                    1315                    1324                    1333                    1342  
 CAG CCC GGC CAG CCC AGC TCA CAG CCC AAC TCC AAC GTC AGC TCT GGC CCT GCC  
 Q    P    G    Q    P    S    S    Q    P    N    S    N    V    S    S    G    P    A

1351                    1360                    1369                    1378                    1387                    1396  
 CCA TCT CCC AGT AGC TTC CTG CCC AGC CCC TCA CCG CAG CCC TCC CAG AGC CCA  
 P    S    P    S    S    F    L    P    S    P    S    P    Q    P    S    Q    S    P

1405                    1414                    1423                    1432                    1441                    1450  
 GTG ACG GCG CGG ACC CCA CAG AAC TTC AGT GTC CCC TCA CCT GGA CCT TTA AAC  
 V    T    A    R    T    P    Q    N    F    S    V    P    S    P    G    P    L    N

1459                    1468                    1477                    1486                    1495                    1504  
 ACA CCT GTG AAC CCC AGC TCT GTC ATG AGC CCA GCT GGC TCC AGC CAG GCT GAG  
 T    P    V    N    P    S    S    V    M    S    P    A    G    S    S    Q    A    E

1513                    1522                    1531                    1540                    1549                    1558  
 GAG CAG CAG TAC CTG GAC AAG CTG AAG CAG CTG TCG AAG TAC ATC GAG CCC CTG  
 E    Q    Q    Y    L    D    K    L    K    Q    L    S    K    Y    I    E    P    L

1567                    1576                    1585                    1594                    1603                    1612  
 CGC CGC ATG ATC AAC AAG ATC GAC AAG AAC GAA GAC AGA AAA AAG GAC CTG AGT  
 R    R    M    I    N    K    I    D    K    N    E    D    R    K    K    D    L    S

1621                    1630                    1639                    1648                    1657                    1666  
 AAG ATG AAG AGC CTT CTG GAC ATT CTG ACA GAC CCC TCG AAG CGG TGT CCC CTG  
 K    M    K    S    L    L    D    I    L    T    D    P    S    K    R    C    P    L

1675                    1684                    1693                    1702                    1711                    1720  
 AAG ACC TTG CAA AAG TGT GAG ATC GCC CTG GAG AAA CTC AAG AAT GAC ATG GCG  
 K    T    L    Q    K    C    E    I    A    L    E    K    L    K    N    D    M    A

1729                    1738                    1747                    1756                    1765                    1774  
 GTG CCC ACT CCC CCA CCG CCC CCG GTG CCA CCG ACC AAA CAG CAG TAC CTA TGC  
 V    P    T    P    P    P    P    P    V    P    P    T    K    Q    Q    Y    L    C

1783                    1792                    1801                    1810                    1819                    1828  
 CAG CCG CTC CTG GAT GCC GTC CTG GCC AAC ATC CGC TCA CCT GTC TTC AAC CAT  
 Q    P    L    L    D    A    V    L    A    N    I    R    S    P    V    F    N    H

1837                    1846                    1855                    1864                    1873                    1882  
 TCC CTG TAC CGC ACA TTC GTT CCA GCC ATG ACC GCC ATT CAC GGC CCA CCC ATC  
 S    L    Y    R    T    F    V    P    A    M    T    A    I    H    G    P    P    I

1891 1900 1909 1918 1927 1936  
 ACG GCC CCA GTG GTG TGC ACC CGG AAG CGC AGG CTT GAG GAT GAT GAG CGG CAG  
 T A P V V C T R K R R L E D D E R Q

1945 1954 1963 1972 1981 1990  
 AGC ATC CCC AGT GTG CTC CAG GGT GAG GTG GCC AGG CTG GAC CCC AAG TTC CTG  
 S I P S V L Q G E V A R L D P K F L

1999 2008 2017 2026 2035 2044  
 GTA AAC CTG GAC CCT TCT CAC TGC AGC AAC AAT GGC ACT GTC CAC CTG ATC TGC  
 V N L D P S H C S N N G T V H L I C

2053 2062 2071 2080 2089 2098  
 AAG CTG GAT GAC AAG GAC CTC CCA AGT GTG CCA CCA CTG GAG CTC AGT GTG CCC  
 K L D D K D L P S V P P L E L S V P

2107 2116 2125 2134 2143 2152  
 GCT GAC TAT CCT GCC CAA AGC CCG CTG TGG ATA GAC CGG CAG TGG CAG TAC GAC  
 A D Y P A Q S P L W I D R Q W Q Y D

2161 2170 2179 2188 2197 2206  
 GCC AAC CCC TTC CTC CAG TCG GTG CAC CGC TGC ATG ACC TCC AGG CTG CTG CAG  
 A N P F L Q S V H R C M T S R L L Q

2215 2224 2233 2242 2251 2260  
 CTC CCG GAC AAG CAC TCG GTC ACC GCC TTG CTC AAC ACC TGG GCC CAG AGC GTC  
 L P D K H S V T A L L N T W A Q S V

2269 2278 2287 2296 2305 2314  
 CAC CAG GCC TGC CTC TCA GCC GCC TAG CCA AGA CTG CAG GGA TGG CCC GCA GCC  
 H Q A C L S A A \*

2323 2332 2341 2350 2359 2368  
 TCA TCG GGG CCA AGG ACA CAC GCC TCC TGT CAG ACA CTT CTA GGT GTT GGC TTC

2377 2386 2395 2404 2413 2422  
 CTT AGA GAG CCT GGG GTT AGG TTA GCT TTC CTG CTT TTA TCT TCT GCC TTG GGG

2431 2440 2449 2458 2467 2476  
 ACC TGC CAA ACG AAA TCC CAC ACC TGT ACA GAA CTG GGA TAG GCG CAG TGG AGC

2485 2494 2503 2512 2521 2530  
 GGG TTG CTT GGG GGG CGT TGG CCG ACT TCT TAG AGA AGG CCC TCC ATG TGA CTT

2539 2548 2557 2566 2575 2584  
 CCT CCC AGG AGC CAG ATG CGA TCC TCA GGC TGC TCT CAC CGT GGC CTG TCC ACG

2593 2602 2611 2620 2629 2638  
 GTC CAG GTC CAT CTC AGC AGC GTG AGG GTG CAC TCA GGG TGT TGT TAG AGC GTC

2647 2656 2665 2674 2683 2692  
 TCG TGT GTG CTA GAC GCA CCC CTA CTC GTT CCT ATA GAA CAC AGA GGA CAT AGG

2701 2710 2719 2728 2737 2746  
 AAA CCC TTA AAA CAC ACA TGG GAT TCT CTG GTC ACA GTT TTG GGT TCA GGC TAT

2755 2764 2773 2782 2791 2800  
 GCT GCT TTG GGC AGG TGG AGC ACC CCC CGA GGA AGC CTG CAA GTC CAG GGC ACA

2809 2818 2827 2836 2845 2854  
 GGC TGC CTT TTG GAG GGA GGG CTG GCC CAT AGG TGC TGC TGG CTC CCC GCC ACC

```

2863      2872      2881      2890      2899      2908
AGC TGG GCC TCA GCC CTC ACG GCA TTC CTG CTG AGC ACC GTG GGG CAC CCA GGG

2917      2926      2935      2944      2953      2962
AGC AGG GGC GTC AGG GAT CCT GCT GCC GGC ACC CCT GTG CCG CTG GCA TGA GGG

2971      2980      2989      2998      3007      3016
CCG TGT CCC CAC TGT GAA GGA TGA AGA GCA AGG CCC TCA GGA CCC GTG TCC TCA

3025      3034      3043      3052      3061      3070
GAG CAC CAC ACA CTG AGC ACC CAG AGA CAG CGG GCC TGG CAG CGG GCC GGG CCA

3079      3088      3097      3106      3115      3124
TGC AGG GAG CGC CTC CCT ATG TTG CCT GCC ACT CTG GGC ACC GGC CAG CAC CCT

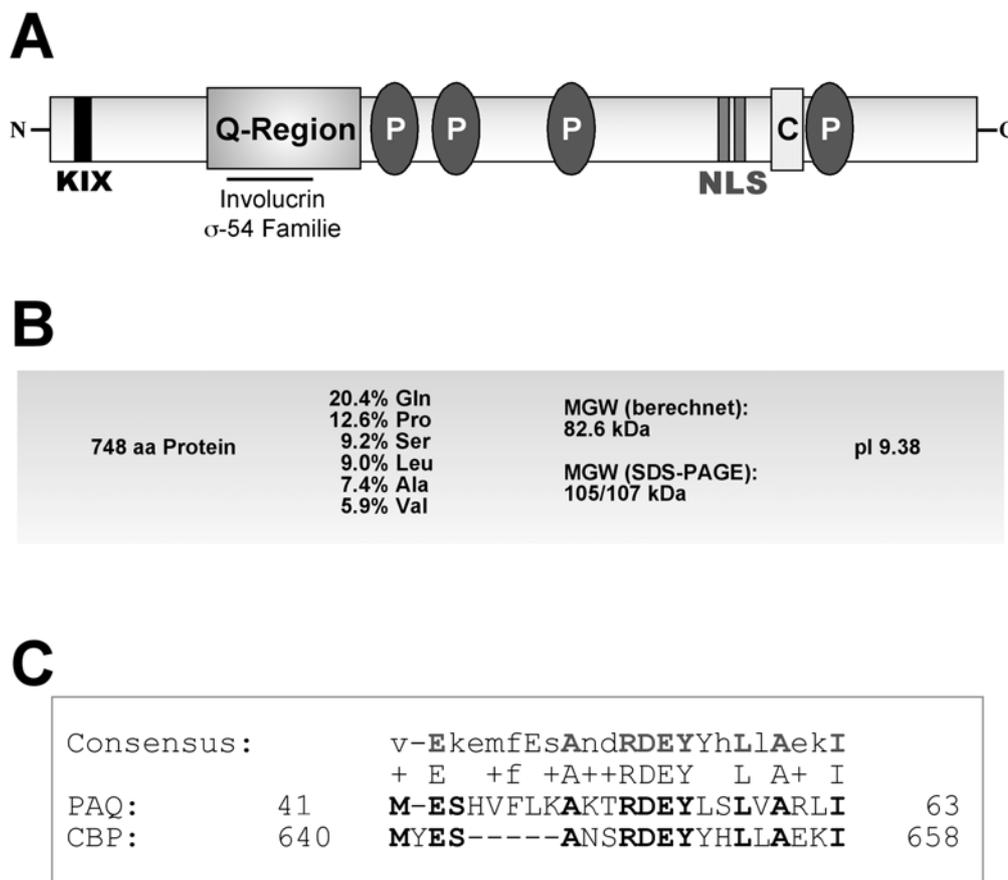
3133      3142      3151      3160      3169      3178
CTG GTG AGA AGA GGT CCC CCC TTT TTA TGT GCA CTA CCC CAC CAT CTG TGA TTA

3187      3196      3205      3214      3223      3232
TAA TAA ATT TAT TAT TCC TGT GAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A 3'

```

**Abb. 17:** Aminosäure- und cDNA-Sequenz von PAQ (Genbankeintrag PCQAP). Dargestellt ist die endgültige Version der Sequenz aus dem Humangenomprojekt (NCBI Zugangsnummer BC013985). Das Stopp-Codon ist durch einen Stern repräsentiert. Die glutaminreiche Region ist unterstrichen.

Eine komplette Analyse der Aminosäuresequenz von PAQ mit Computervorhersage-Algorithmen ergab eine Reihe interessanter Ergebnisse. Mit dem Programm „*DomainSweep*“ (Abschn. 3.19.3.) konnte ein kurzer Sequenzabschnitt von PAQ (aa 41-63) identifiziert werden, der homolog zu einem kurzen Bereich der KIX-Domäne (Radhakrishnan *et al.*, 1997) von CBP ist (Abb. 18A und 18C). Die KIX-Domäne von CBP bindet eine Reihe von Transkriptionsaktivatoren, wie CREB (Parker *et al.*, 1996), MLL (Ernst *et al.*, 2001), Tax und MyoD (Riou *et al.*, 2000), DAF-16 (Nasrin *et al.*, 2000), RelA/NF- $\kappa$ B (Nicot *et al.*, 2001), HTLV p30(II) (Zhang *et al.*, 2001), c-Myb (Parker *et al.*, 1999) sowie NFATc4 (Yang *et al.*, 2001). Hochauflösende Interaktionsdaten zwischen KIX und Aktivierungsdomäne existieren leider nur für das Paar CREB-CBP. Aminosäurereste in KIX, die eine essentielle Funktion für die Interaktion mit der KID-Domäne („*kinase inducible domain*“) von CREB haben (R601, K607, L608, K609, E656, K663), sind allerdings in PAQ nicht konserviert (Dal Peraro *et al.*, 2001; Parker *et al.*, 1996; Shaywitz *et al.*, 2000). Dies spricht gegen eine direkte Wechselwirkung von PAQ mit CREB, schließt diese Möglichkeit jedoch nicht völlig aus.



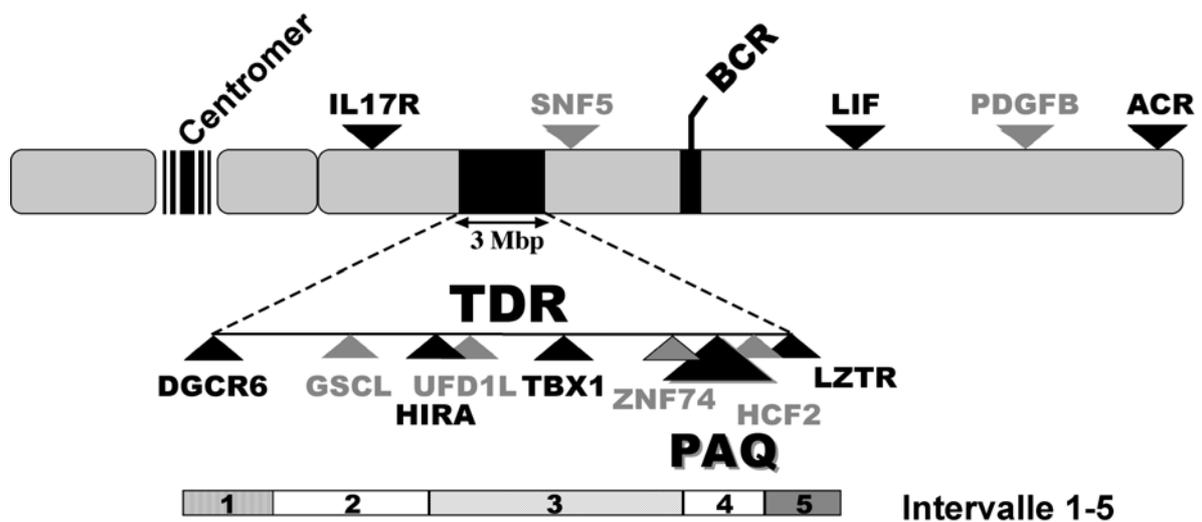
**Abb. 18:** Primärstruktur von PAQ. (A) Domänen und Sequenzmotive aus Computervorhersagen. Der N- und C-terminale Bereich des Proteins enthält überwiegend geladene Aminosäuren, während der Großteil des Proteins aus polaren und hydrophoben Aminocarbonsäuren besteht. Am N-Terminus des Proteins findet sich eine kurze Sequenz (aa 41-63), die in einem kurzen Bereich homolog zur KIX-Domäne (siehe (C)) von CBP (Abschn. 1.4.2.1.) ist. Von aa 160-260 erstreckt sich eine glutaminreiche Domäne (Q-Region), die homopolymere Glutaminsequenzwiederholungen von bis zu 14 aa aufweist. Computeranalysen (Programm „DomainSweep“, W2H-Husar, Abschn. 3.19.3.) zeigen eine Ähnlichkeit dieser Region mit Proteinen der Involucrin- bzw.  $\sigma$ -54 Familie (siehe Text). Weitere *in-silico*-Analysen sagen die Existenz von vier prolinreichen Domänen (P) und einer potentiellen „Coil“-Region (C) voraus. Außerdem läßt sich eine zweigeteilte Kernlokalisationssequenz (NLS, „nuclear localization signal“) vorhersagen (aa 507-524). (B) Physikochemische Parameter von PAQ. pI: Isoelektrischer Punkt, MGW: Molekulargewicht. (C) Sequenzhomologie zwischen dem Aminoterminus von PAQ und der KIX-Domäne (siehe Text) der Histonacetyltransferase CBP. Identische Aminosäuren sind fettgedruckt. Eine KIX-Consensussequenz für CBP und p300 aus verschiedenen Spezies ist angegeben.

Bei der Q-reichen Region von PAQ konnte eine gewisse Ähnlichkeit mit den Q-reichen Domänen von Proteinen der Involucrin (Eckert und Green, 1986) und  $\sigma$ -54 (Übersichtsartikel: Buck *et al.*, 2000) Familie festgestellt werden. Involucrin ist ein Keratinocyten-spezifisches Protein, daß auf der Innenseite der Plasmamembran durch das Enzym Transglutaminase mit Membranproteinen kovalent quervernetzt wird (Nemes *et al.*, 1999). Bakterielle Transkriptionsfaktoren der  $\sigma$ -54 Klasse ersetzen den konstitutiven  $\sigma$ -70 Faktor an

induzierbaren Genen unter Ausbildung eines alternativen Holoenzym, das durch Signaltransduktionsmechanismen und Enhancer-ähnliche cis-Elemente reguliert wird. Die glutaminreiche Region spielt dabei eine Rolle in der Übermittlung derjenigen Signale der Enhancer-gebundenen Aktivatoren auf die RNA-Polymerase, welche zum Aufschmelzen der DNA-Doppelhelix am Transkriptionsstart führen (Hsieh *et al.*, 1994). Der hohe Anteil der Aminocarbonsäure Prolin (Abb. 18B) spiegelt sich im Auftreten von vier prolinreichen Domänen wieder, ein Motiv, daß man häufig in Transkriptionsfaktoren finden kann (Abschn. 1.2.5.). Zudem spricht die Detektion eines zweigeteilten Kernlokalisationsignals (NLS in Abb. 18A) für das Vorliegen eines Kernproteins, was mit den experimentellen Daten insoweit konsistent ist, da PAQ biochemisch in Zellkernen identifiziert werden konnte (Abschn. 4.3.1.).

### **4.3.3. Das Gen für PAQ liegt auf dem langen Arm von Chromosom 22 im Abschnitt q11.21: der DiGeorge-Locus**

Eine weitergehende Analyse der genomischen Sequenz von PAQ führte zu einer interessanten Beobachtung, denn es stellte sich heraus, daß das Gen auf einem Krankheits-Locus auf Chromosom 22 lokalisiert ist (Berti *et al.*, 2001). Es handelt sich dabei um den sogenannten *DiGeorge-Locus* im Abschnitt 22q11.21. Heterozygote Deletionen in einem Bereich, der als „typisch deletierte Region“ (TDR) bezeichnet wird und ca. 3 Megabasenpaare umfaßt (Abb. 19), führen zu einem teilweise sehr heterogenen Krankheitsbild, das gemein unter dem Namen *DiGeorge* (DGS)- oder auch *CATCH-22-Syndrom* firmiert (Übersichtsartikel: De Decker und Lawrenson, 2001; Novelli *et al.*, 2000). Das Syndrom tritt mit einer Häufigkeit von 1:4000 bei Neugeborenen auf, wobei 85-90 % der Deletionen *de novo*, wahrscheinlich aufgrund von Rekombinationsfehlern (ungleiches „*crossing-over*“) bei der meiotischen Reifeteilung, entstehen (Scambler, 2000). Dies macht die Krankheit zum zweit häufigsten genetischen Defekt nach dem *Down-Syndrom*. Kennzeichnend für das DiGeorge-Syndrom ist die Tatsache, daß je nach Patient die beobachteten Symptome teilweise drastisch variieren können, was unterschiedliche Krankheitsbilder zur Folge hat. Patienten leiden demnach an Herzfehlern (Persistenter *Truncus arteriosus*), Defekten des Thymus (und damit des Immunsystems), einer abnormalen Gesichtsform, Hypocalcämie und dem Auftreten einer „Hasenscharte“. Daher auch der Name CATCH-22 für „*c*ardiac disease“, „*a*bnormal faces“, „*t*hymic hypoplasia“, „*c*left palate“ und „*h*ypocalcemia“. Weitere Symptome sind psychische Beschwerden (z.B. Schizophrenie), Retardation des Wachstums, Mißbildung der oberen Extremitäten, Taubheit und eine reduzierte Lernfähigkeit. Die meisten Patienten weisen jedoch nicht das komplette Spektrum an Symptomen auf, wobei der Herz- und Thymusdefekt indes am häufigsten auftritt.



**Abb. 19:** Der *DiGeorge*-Locus auf Chromosom 22. Hervorgehoben ist die „typisch deletierte Region“ (TDR), die selbst in fünf Intervalle unterteilt wird. Folgende Gene bzw. Loci sind zur Orientierung angegeben. BCR: „*break point cluster region*“, IL17R: Interleukin-17 Rezeptor, SNF5: humanes Swi/Snf5, LIF: Leukämie inhibierender Faktor, PDGFB: „*platelete-derived growth factor B*“, ACR: Acetylcholinrezeptor. Die TDR erstreckt sich vom Gen DGCR6 („*DiGeorge critical region 6*“) bis zum Cistron LZTR. GSCL: „*Gooseoid-like*“, HIRA: „*Hir-like protein A*“, UFD1L: „*Ubiquitin-fusion-degradation-1-like*“, TBX1: T-Box Protein 1, ZNF74: Zinkfingerprotein 74, HCF2: Heparin Cofaktor 2. Das Gen CRKL liegt zwischen HCF2 und LZTR (siehe Text).

Dies spricht entweder gegen eine monogenetische Krankheit oder für einen starken Einfluß von genetischen „*Modifiern*“ auf ein defektes Gen, sprich der genotypische Hintergrund des betroffenen Individuums und exogene Einflüsse spielen eine wichtige Rolle in der Manifestation der Symptomatik. In der Tat weisen viele Befunde auf einen Einfluß von Umweltfaktoren auf das Krankheitsbild hin, da identische Deletionen je nach Patient meist unterschiedlich starke Phänotypen hervorrufen (Epstein, 2001). Dem hingegen scheint die entwicklungsbiologische Ursache für das Syndrom relativ gut geklärt zu sein, da die unterschiedlichen Symptome auf einen ganz bestimmten Zelltyp, die Neuralleistenzellen, zurückgeführt werden können. Diese faszinierende Zellpopulation entsteht in der frühen Embryonalentwicklung auf der dorsalen Seite des Neuralrohrs, von wo aus eine Art „*Ausschwärmen*“ dieser Zellen in den ganzen Embryo hinein stattfindet. Neuralleistenzellen sind dann an der Ausbildung verschiedener Organe und Gewebetypen, wie Haut, peripheres und vegetatives Nervensystem, Gesichtsknochen und Komponenten des Thymus sowie des vasculären Systems, beteiligt (Epstein, 2001). Defizienzen, die das Einwandern von Neuralleistenzellen in die Branchialbögen im vier bis sechs Wochen alten Embryo verhindern, führen unter anderem zum klinischen Erscheinungsbild des *DiGeorge*-Syndroms (siehe Abschn. 8.4.; Scambler, 2000).

Ob das PAQ-Gen an der Ausbildung einer oder mehrerer der Symptome beteiligt sein könnte ist allerdings zu diesem Zeitpunkt völlig offen, und muß auf die Analyse in einem Maus-Modell warten, bei dem das Gen durch homologe Rekombination deletiert worden ist. RNA-Expressionsanalysen in unserem Labor, die an murinen Embryonen durchgeführt wurden, zeigen, daß PAQ in den oben diskutierten Strukturen, wie Branchialbögen, Gesicht und Extremitäten überexprimiert wird (Berti *et al.*, 2001).

In der Literatur wurden inzwischen eine Reihe von Kandidatengen für das DGS vorgeschlagen und zum Teil im Maus-Modell untersucht (Übersichtsartikel: Botta *et al.*, 2001). Dazu gehören die Transkriptionsfaktoren HIRA (Farrell *et al.*, 1999) und Tbx-1 (Jerome und Papaioannou, 2001), das Signaltransduktionsadaptorprotein CRKL (Guris *et al.*, 2001), und das Protein Ufd1l, das eine Rolle im Ubiquitin-Proteasom-Weg spielt (Yamagishi *et al.*, 1999). Allerdings zeigte nur das T-Box Protein (Abschn. 1.2.5.) Tbx-1 einen echten DGS-ähnlichen Phänotyp bei Haploinsuffizienz des TBX1-Gens, während bei den anderen Genen ausschließlich homozygote „knock-out“-Mäuse erkennbare Effekte besitzen. Die TBX1<sup>+/-</sup>-Mäuse zeigten cardiovasculäre Defekte und Missbildungen im Thymus (Lindsay *et al.*, 2001; Merscher *et al.*, 2001). Dies macht Tbx-1 zu einem Schlüsselfaktor für das Verständnis der Herz- und Thymus-Symptomatik beim DGS. Da es jedoch Patienten gibt, bei denen das TBX1-Gen nicht deletiert ist, und welche keine erkennbaren Mutationen in TBX1 aufweisen, spricht einiges dafür, daß noch andere Gene, welche beispielsweise die kritische Gendosis von Tbx-1 beeinflussen könnten, an der Ausbildung des Herzphänotyps beteiligt sein können (Botta *et al.*, 2001).

#### 4.3.4. Herstellung von Antikörpern gegen PAQ

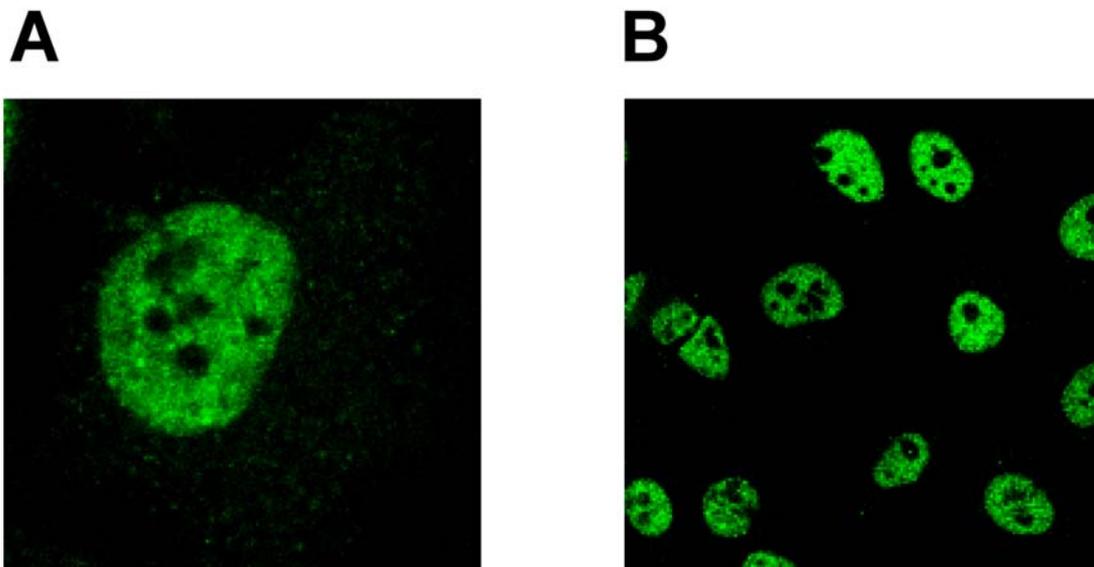
Um einerseits die biochemische Charakterisierung von PAQ voranzutreiben, und andererseits spezifische Antikörper für eine Immunreinigung von PAQ-assoziierten Polypeptiden einsetzen zu können, wurden sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper generiert. Ein an KLH gekoppeltes Peptid, daß dem extremen N-Terminus von PAQ entspricht (Abschn. 2.9.) wurde zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt (Eurogentec, Belgien). Der Peptidantikörper erkannte das PAQ-Protein im Western-Blot, während das Präimmenserum keine Reaktion mit dem Antigen aufwies (Daten nicht gezeigt und Berti *et al.*, 2001).

Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern in Ratten (Abschn. 3.14.3.) wurde in *E. coli* ein GST-Fusionsprotein exprimiert und anschließend über Glutathion-Sepharose gereinigt (Abschn. 3.13.5.7.), welches die Aminosäuren 291 bis 746 von PAQ (NCBI Genbankeintrag AF328769) einschließt.

Zwei Monoklone, PAQ1H7 und PAQ6C9 genannt, wurden ausgewählt und in Kultur expandiert. Beide monoklonalen Antikörper erkannten spezifisch die Doppelbande bei 105/108 kDa im Western-Blot (Daten nicht gezeigt und Mittler *et al.*, 2001).

Zudem erwies sich der monoklonale Antikörper PAQ6C9 als geeignet für die Analyse von PAQ mittels Immunfluoreszenz im konfokalen Lasermikroskop. Das Ergebnis (Abb. 20) läßt sich wie folgt zusammenfassen:

- PAQ ist ausschließlich im Zellkern von HeLa-Zellen lokalisiert
- PAQ kann nicht in den Nucleoli, den Orten der rRNA-Synthese (RNA-Polymerase I) nachgewiesen werden
- Die Verteilung von PAQ im Zellkern ist nicht diffus



**Abb. 20:** PAQ ist ein Kernprotein. Gezeigt ist die Immunfärbung von HeLa-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper PAQ6C9. Die Detektion erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem sekundären anti-Ratten-Antikörper (konjugiert mit dem Farbstoff Alexa 488). (A) Die Aufnahme einer einzelnen Zelle zeigt deutlich, daß das Protein nicht diffus im Zellkern verteilt vorliegt. PAQ ist außerdem nicht in den Nucleoli lokalisiert. (B) Die Analyse einer größeren Population von HeLa-Zellen macht deutlich, daß PAQ in diesen Zellen konstitutiv im Kern lokalisiert ist.

In der Summe deuteten also alle bisher gezeigten Daten darauf hin, daß PAQ ein neuer Transkriptionsfaktor für RNA-Polymerase II sein könnte. Der entsprechende Nachweis soll in den nun folgenden Kapiteln geführt werden.

## 4.4. PAQ ist Teil eines Multiproteinkomplexes: der humane Mediator

### 4.4.1. PAQ ist homolog zu TIG-1/ARC105

Die Publikation einer cDNA für ein Protein, dessen mRNA in der humanen Leukämiezelle K562 nach Stimulation mit dem Tumorpromotor TPA (12-O-tetradecanolyphorbol-13-acetat) hochreguliert wird (Abraham und Solomon, 2000), führte zu folgender Erkenntnis. Das besagte Protein, TIG-1 („*TPA inducible gene 1*“) genannt, war nicht nur zu mehr als 90 % homolog zu PAQ (siehe Abb. 21), sondern wurde auch als Komponente (ARC105) des humanen Coaktivator-Komplexes ARC („*Activator required cofactor*“) diskutiert (Näär *et al.*, 1999). ARC wurde im Labor von Dr. R. Tjian (Berkeley, USA) als Multiproteinkomplex beschrieben, der an die Aktivierungsdomänen von VP16, NF- $\kappa$ B und SREBP-1a („*Sterol receptor enhancer binding protein 1a*“) bindet, und in einem Chromatin *in-vitro*-Transkriptionssystem essentiell für die aktivatorabhängige Transkription ist (Abschn. 1.3.2.1.). Bemerkenswerterweise sind einige der ARC-Untereinheiten ortholog zu Proteinen des Mediators aus *S. cerevisiae* (Abschn. 1.3.1.), so daß ARC zu Recht als humaner Mediator-Komplex bezeichnet werden kann. ARC besitzt zudem eine fast identische Polypeptidzusammensetzung wie die Coaktivatoren DRIP („*Vitamin D receptor interacting proteins*“) und TRAP („*Thyroid hormone receptor associated proteins*“), die unabhängig voneinander in den Laboratorien von Dr. L.P. Freedman (Sloan-Kettering, New York) bzw. Dr. R.G. Roeder (Rockefeller, New York) identifiziert wurden (Abschn. 1.3.2.1.), wobei DRIP und TRAP kein PAQ-ähnliches Protein besitzen. Allerdings zeigte eine Analyse der cDNA des Proteins TRAP230/ARC240 (NCBI Genbankeintrag AAD22033), daß dieses Protein an seinem C-Terminus eine extrem glutaminreiche Region (aa 2086-2158) aufweist, was den Verdacht nahelegte, daß TRAP230 identisch zu PAQ3 (Abschn. 4.2.3.) ist. Daher drängte sich die Annahme auf, daß PAQ Teil eines humanen Mediator-ähnlichen Cofaktorkomplexes sein könnte, was letztlich die Coelution mit der PC2-Funktion (Abschn. 4.2.3.) erklären könnte. Diese Hypothese sollte im weiteren Verlauf der Arbeit getestet werden.

### 4.4.2. PAQ ist in Metazoen evolutionär konserviert und besitzt Homologiebeziehungen zum Mediatorprotein Gal11 aus Hefe

Zum Auffinden von Proteinen in anderen Spezies, welche die Orthologen von PAQ repräsentieren, wurde ein spezieller BLAST-Algorithmus der Arbeitsgruppe Bork (EMBL, Heidelberg) eingesetzt (Abschn. 3.19.1.3.). Zur Generierung eines „*Multiple Alignments*“ wurde das Programm ClustalW im Programmpaket W2H-Husar (Abschn. 3.19.1.3.) verwendet. Das Resultat ist in Abb. 21 dargestellt.

```

1                                     50
cele_PAQ  ~~~~MSEEDW  PSPKFRHEHVI  QRLPEPELARN  RQNAPNLPVP  GDARQVREYV
drome_PAQ  ~~~~MTEDW  QSQKFRQNVII  SKIHDLLPPN  AQDQT.....  KNAGVMENFI
human_PAQ  MDVSGQETDW  RSTAFRQKLV  SQIEDAMRKA  GVAHS.....  KSSKDMESHV
human_TIG  ~~~~MRKA  GVAHS.....  KSSKDMESHV
murine_PAQ  MDVWGQETDW  RSAAFRLKLV  SQIEDAMRKA  GVAHS.....  KSSKDMESHV

51                                     100
cele_PAQ  FAKCMSKDEY  MRTIAKVLNA  INCNSKSAAV  PSVLQESQFH  SPPCTTAALL
drome_PAQ  FRKSRTKDEY  IGLVAKLFMH  YKIMS.RKSQ  QQQQQQQQQG  GPPP.....
human_PAQ  FLKAKTRDEY  LSLVARLIH  FRDIHNKKSQ  ASVSDPMNAL  QSLT.....
human_TIG  FLKAKTRDEY  LSLVARLIH  FRDIHNKKSQ  ASVSDPMNAL  QSLT.....
murine_PAQ  FLKAKTRDEY  LSLVARLIH  FRDIHNKKSQ  ASVSDPMNAL  QSLT.....

101                                    150
cele_PAQ  GNTFAGGTPG  YRAEVPDPDQ  PLSAQAENEP  VTVATTQAST  TPSAENPPGE
drome_PAQ  .NAEMGGGQN  MMQD.P....  .....LNAL  QNLASQGNRN  PQMMFMGAGE
human_PAQ  .GGPAAGAAG  IGMP.P....  .....RGPG  QSLGGMGSLG  AMGQFMSLSG
human_TIG  .GGPAAGAAG  IGMP.P....  .....RGPG  QSLGGMGSGF  AMGQFMSLSG
murine_PAQ  .GGPTPGAAG  IGMP.P....  .....RGPG  QSLGGMGGLG  AMGQFLPLSG

151                                    200
cele_PAQ  .LPAPSASAT  AAVAAVASF  PSLDTSIRPG  GQITPGSQAP  GGGPTPAPN.
drome_PAQ  GAPVPGGPGT  ASNLLQSLNQ  QRFG.....  QQMOPMSNIR  GMPMGAG..
human_PAQ  .QPPPGTSGM  APHSMVVST  ATEQT....  LQLQVALQQ  QQQQQQFQ..
human_TIG  .QPPPGTSGM  APHSMVVST  ATEQT....  LQLQVALQQ  QQQQQQFQ..
murine_PAQ  .QPPPGTSGM  APHGMVVST  TTEQT....  LQLQVALQQ  QQQRQQQF

201                                    250
cele_PAQ  VPFPNGSSOM  NGGPAMGQ..  .PPPOMGAP  NMGGPPNGYG  GYGMNGPPG
drome_PAQ  ...GAGAQOM  MQVQMQQ..  .GGNAPGVM  NVMGAG.GGQ  NQGIVGNPG
human_PAQ  QQQQAALQQ  QQQQQQQQ..  .FQAQSAM  QQQFQA.VVQ  QQQQLQQQQ
human_TIG  QQQQAALQQ  QQQQQQQQ..  .FQAQSAM  QQQFQA.VVQ  QQQQLQQQQ
murine_PAQ  QQQQAALQQ  QQQQQQQQ..  QQFQAQNAM  QQQFQA.VVQ  QQQLQQQQ

251                                    300
cele_PAQ  SG.APMGGNP  YNQIHKDMD  QARPWDPSAH  MYQQQPQWGA  MPPQ.QPHGY
drome_PAQ  QQ.MGVGVGM  PNQMVGPVN  SGPAVGGAG  PNAAPGAGGP  GPNQMGGPM
human_PAQ  QQQHLLKHH  QNQQIQQQ  QQ.LQRIAQL  QLQQQQQQ  QQQQQQAL
human_TIG  QQQHLLKHH  QNQQIQQQ  QQ.LQRIAQL  QLQQQQQQ  QQQQQQAL
murine_PAQ  QQ.HLLKHH  QSQQIQQQ  Q..LQRMAL  QLQQQQQQ  QQ.....AL

301                                    350
cele_PAQ  PGRPMNGQGA  TPTGPSSVLE  SLINPQQYP  GHNQMGPEP  DRNVAAQRAA
drome_PAQ  NVNAMQMP  MQQIQNQLG  MGMNPMRMG  .QNGMGGP.  ...GMPGQG
human_PAQ  QAQPPIQPP  MQQPPPPSQ  ALPQQLQMH  .HTQHQPEP  ...QPQPPEV
human_TIG  EAQPPIQPP  MQQPPPPSQ  ALPQQLQMH  .HTQHQPEP  ...QPQPPEV
murine_PAQ  QAQPPIQPP  MQQPPPPSQ  ALPQQLQMH  .HTQHQPEP  ...QAQPPEI

351                                    400
cele_PAQ  AQQQQQQQQ  QQQQREGMVP  NQGMSSSEDQ  TVYSAKLRNM  RGSCDSLRT
drome_PAQ  MQGMP.QGPH  NVVGGP.AGQ  QVVGAGLPP  NAVQGGMNP  MGGMGVNM.
human_PAQ  AQNQPSQLPP  QSQTQP.LVS  QAQALPGQML  YT.QPPLKFV  RAPMVVQPE
human_TIG  AQNQPSQLPP  QSQTQP.LVS  QAQALPGQML  YT.QPPLKFV  RAPMVVQPE
murine_PAQ  AQNQPSQLPP  QSQSQP.LVS  RAQALPGPML  YAAQQQLKFV  RAPMVVQPE

401                                    450
cele_PAQ  .ARQCRHEGN  ....HEAAHK  LEVMLS.VLEG  KR.....
drome_PAQ  ..PNLQKPN  ....MPMQA  GMFPGNRGG  VGVGGQ....
human_PAQ  VQPQVQQQ.  ....TAVQT  AQAQMVAPG  V.....
human_TIG  VQPQVQQQ.  ....TAVQT  AQAQMVAPG  V.....
murine_PAQ  VQPQVQQVQ  QVQPQAAVQA  AQAQMVAPG  VQMIAEALAQ  GGMHVRARFP

451                                    500
cele_PAQ  .....  .....  .VVSLEYLNH  LEMWIARKOD  FLNIAPMSQN
drome_PAQ  .....  .....  .QPGPFMRS  SPSPADAQC  LQQAQLQQM
human_PAQ  .....  .....  .QVSQSLPM  LSSPSPGQC  VQTPQSMPPP
human_TIG  .....  .....  .QVSQSLPM  LSSPSPGQC  VQTPQSMPPP
murine_PAQ  PTSTMSAGPS  SSISLGGQPT  TVVSQSLPM  LSSPSPGQC  VQTPQSMPPP

```

	501					550
cele_PAQ	QNHMGMNDDPM	MNGEHAMLGN	GQVENEYGGH	EGYGHQQYMG	PPPHMQMHQ	
drome_PAQ	QQQQQLVVG	NQTPTQQPPT	PQMPTEN.MI	ESFALVPOSS	PQ..MMQMN	
human_PAQ	POPSPQPGQP	SSQPNSNVSS	GPAPSESSFL	ESFSPQPSQS	PV..TARTPQ	
human_TIG	POPSPQPGQP	SSQPNSNVSS	GPAPSESSFL	ESFSPQPSQS	PV..TARTPQ	
murine_PAQ	POPSPQPG..	S.QPNSNVSS	GPAPSESSFL	ESFSPQPSQS	PV..TARTPQ	
	551					600
cele_PAQ	PPMWHQQQHQ	QQQRMFDQDH	VMMQCGGGPV	HGMVIRGDMGH	DPMTSPVNNH	
drome_PAQ	SQRNIRQQSP	SASINTPGQV	TGNSPFNPOE	EALYREKYKQ	ITKYIEPIKR	
human_PAQ	N.FSVSPSPGP	LNTPVNPSV	MSPAGSSQAE	EQQLDKLQKQ	LSKYIEPIRR	
human_TIG	N.FSVSPSPGP	LNTPVNPSV	MSPAGSSQAE	EQQLDKLQKQ	LSKYIEPIRR	
murine_PAQ	N.FSVSPSPGP	LNTPVNPSV	MSPAGSSQAE	EQQLDKLQKQ	LSKYIEPIRR	
	601					650
cele_PAQ	RHAPYPNPAA	MRNNMRMPNG	PGPTGRDRNS	MS..GSSMSG	PSSGAPSMNP	
drome_PAQ	MLAKISNDGT	NVEKMTKMSK	LLEILCNPTQ	RVPIETLLKC	EKALEKMDLI	
human_PAQ	MINKIDKNED	RKKDLSKMSK	LIDLLTDPK	RCPLKTLQKC	EIALEKLNKD	
human_TIG	MINKIDKNED	RKKDLSKMSK	LIDLLTDPK	RCPLKTLQKC	EIALEKLNKD	
murine_PAQ	MINKIDKNED	RKKDLSKMSK	LIDLLTDPK	RCPLKTLQKC	EIALEKLNKD	
	651					700
cele_PAQ	MGTPTNQKMG.	.TP.....	.....GSM	GGMSGDLLLN	YDDFLNPTP	
drome_PAQ	SYSGQQFGKS	SNP.....	..LLEVINTT	LQSFVANHTL	YRTRRTLEL	
human_PAQ	MAVPTPPPPP	VPPTKQQLC	QPLLDAVLAN	IRSEVFNHSL	YRTEVAMTA	
human_TIG	MRCPLPHR..	.P.....	.....RCH	R..PNSSTYA	SRSWMSWPT	
murine_PAQ	MAVPTPPPPP	VLPPTKQQLC	QPLLDAVLAN	IRSEVFNHSL	YRTEVAMTA	
	701					750
cele_PAQ	IDALQPTLHV	GQNSMAGPP	..VQRSNLNE	TARKEIQILD	ARFEIDPNHQ	
drome_PAQ	LFGTDITAPV	PAKRPRVEEK	STSFEQEVPH	VLQGEIARLD	TKFKVKLDTT	
human_PAQ	IHGPPITAPV	VCTRKRRLD	..DERQSIPS	VLQGEVARLD	PKFLVNLDP	
human_TIG	SAHLSSTIPC	TAHSFQP~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
murine_PAQ	IHGPPIVSPV	VCSRKSPV~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
	751					800
cele_PAQ	RHDAN.HIIV	VCKIRNQQ..	.FPPLRLVVP	TTYPAAGNVTV	DRAVIDLDAY	
drome_PAQ	SQINNKAIRL	ICCLDDKRLP	SVPPVSVSVP	EEYPWQAPDC	SLAEQEQYSAT	
human_PAQ	HCSNNGTVHL	ICKLDDKDLP	SVPPLELSVP	ADYPAQSPLW	IDRQWQYDAN	
human_TIG	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
murine_PAQ	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
	801					850
cele_PAQ	.LYDDLQNSV	YERLSR.PGL	SSITDYLNAW	EEQVNYQYQYQ	TSGGLDVAFN	
drome_PAQ	PFLQTVQQAL	IARISKLPKN	YLSHLLDLTDW	EMAVRQACSP	QSK...PRA	
human_PAQ	PFLQSVHRM	TSRLLQLPK	HSVTALLNTW	AQSVHQACLS	AA~~~~~	
human_TIG	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
murine_PAQ	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
	851	862				
cele_PAQ	VGNDFFYDNL	NL				
drome_PAQ	VCELSTLLGV	~~				
human_PAQ	~~~~~	~~				
human_TIG	~~~~~	~~				
murine_PAQ	~~~~~	~~				

**Abb. 21:** „Multiple Alignment“ von PAQ-Orthologen in Metazoen. Aminosäurereste, die in allen fünf Polypeptiden konserviert sind, sind dunkelgrau unterlegt. Die Darstellung der in vier von fünf Proteinen konservierten Aminosäurereste ist durch eine mittelgraue Markierung realisiert. Aminosäurereste, welche in nur drei von fünf Proteinen konserviert sind, erscheinen durch einen hellgrauen Hintergrund. *Caenorhabditis elegans* („cele“), *Drosophila melanogaster* („drome“), *Homo sapiens* („human“), *Mus musculus* („murine“). „Cele“ PAQ (hypothetisches Protein R12B2.5, U00066/CE30108), „drome“ PAQ (GH03922 Genprodukt, AE003589), „human“ PAQ (PCQAP, BC013985), „human“ TIG („*TPA inducible gene 1*“ Genprodukt, AF056191), „murine“ PAQ (Pcqp, AF328770).

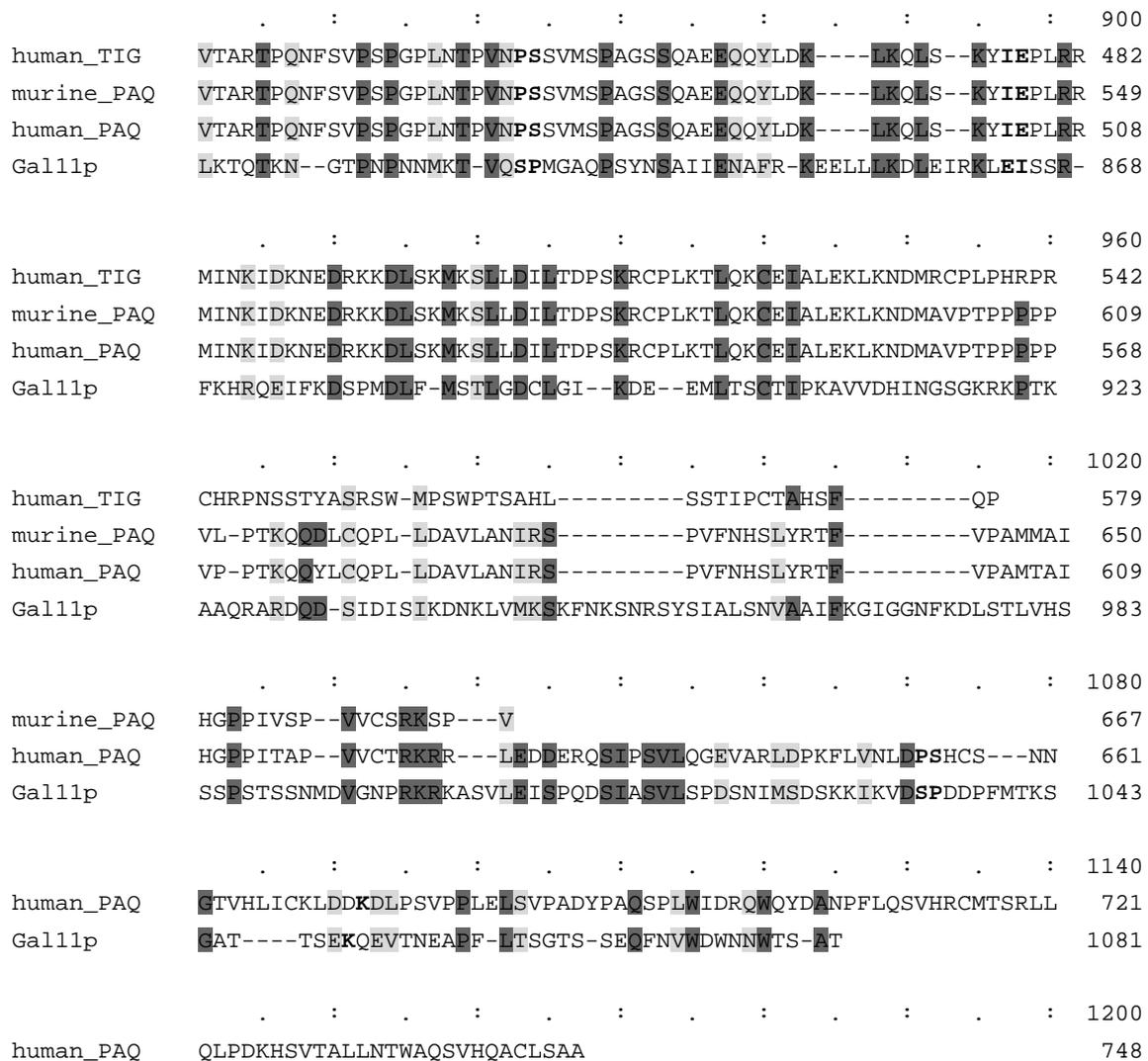
Das Ergebnis zeigt, daß insbesondere der N- und C-terminale Bereich evolutionär konserviert ist, während die glutaminreiche Region nur in Säugern existiert und dort auch konserviert vorliegt. Da das humane PAQ zum einen eine relativ ausgedehnte glutaminreiche Region besitzt, und zum anderen vier prolinreiche Domänen aufweist, insgesamt also durch eine geringe Komplexität der Aminosäurezusammensetzung charakterisiert ist (Abb. 18), mußte davon ausgegangen werden, daß die heute verfügbaren Programme zum Auffinden von Homologiebeziehungen entfernte Verwandtschaftsbeziehungen, z.B. zu Mediatorproteinen der Bäckerhefe, nicht detektieren können (Jones und Swindells, 2002). Deshalb wurden direkt „Alignments“ mit den beiden glutaminreichen Mediatoruntereinheiten von *S. cerevisiae* (Gal11 und Med3/Hrs1/Pgd1) durchgeführt. Dabei zeigte nur Gal11 eine statistisch signifikante Homologie (E-Wert ca.  $4 \cdot e^{-10}$ ), wenn der „Filter“ für Regionen niedriger Komplexität ausgeschaltet wurde. Eine detaillierte Analyse ergab ferner, daß insbesondere der N-Terminus der PAQ-Proteine aus Säugern homolog zu Gal11 ist (Abb. 22). Dies betrifft zum einen den extremen N-Terminus, zum anderen aber auch die KIX-ähnliche Region von PAQ (Abb. 22) mit Homologie zu CBP/p300 (Vgl. Abb. 18), die auch in den PAQ-Orthologen des Fadenwurms und der Tauflicge konserviert ist.

## A

	.	:	.	:	.	:	.	:	.	:	.	:	60																																													
human_TIG													-MRKAGVAHSSKSS-----KDMESHVELLKA 23																																													
murine_PAQ	MDVWG	Q	E	T	D	W	R	S	A	A	F	R	L	K	L	V	S	Q	I	E	D	A	-MRKAGVAHSSKSS-----KDMESHVELLKA 49																																			
human_PAQ	MDVSG	Q	E	T	D	W	R	S	T	A	F	R	K	L	V	S	Q	I	E	D	A	-MRKAGVAHSSKSS-----KDMESHVELLKA 49																																				
Gal11p	MSAAPV	Q	D	K	D	T	L	S	N	A	E	R	A	K	N	V	N	G	L	L	Q	V	L	M	D	I	N	T	L	-	N	G	S	S	D	T	A	D	K	I	R	I	H	A	K	N	F	E	A	A	L	E	A	K	S	60		
	.	:	.	:	.	:	.	:	.	:	.	:	120																																													
human_TIG	KTRD	E	Y	L	-	S	L	V	A	R	L	I	I	H	F	R	-	D	I	H	N	K	S	Q	A	S	V	S	D	P	M	N	A	L	Q	S	L	T	G	G	P	A	A	G	A	A	G	I	G	M	P	P	R	G	P	G	Q	82
murine_PAQ	KTRD	E	Y	L	-	S	L	V	A	R	L	I	I	H	F	R	-	D	I	H	N	K	S	Q	A	S	V	S	D	P	M	N	A	L	Q	S	L	T	G	G	P	T	P	G	A	A	G	I	G	M	P	P	R	G	P	G	Q	108
human_PAQ	KTRD	E	Y	L	-	S	L	V	A	R	L	I	I	H	F	R	-	D	I	H	N	K	S	Q	A	S	V	S	D	P	M	N	A	L	Q	S	L	T	G	G	P	A	A	G	A	A	G	I	G	M	P	P	R	G	P	G	Q	108
Gal11p	SSK	K	E	Y	M	S	M	N	E	K	V	A	V	M	-	R	N	T	Y	N	T	R	K	N	A	V	T	A	A	A	A	N	N	I	K	P	V	E	Q	H	H	I	N	N	L	-----	K	N	S	C	N	113						
	.	:	.	:	.	:	.	:	.	:	.	:	155																																													
human_TIG	S	L	G	G	M	G	S	F	G	A	M	G	Q	P	M	S	L	S	G	Q	P	P	P	P	G	T	S	G	M	A	P	H	S	M	A	116																						
murine_PAQ	S	L	G	G	M	G	L	G	A	M	G	Q	P	L	P	L	S	G	Q	P	P	P	P	G	T	S	G	M	A	P	H	G	M	A	142																							
human_PAQ	S	L	G	G	M	G	S	L	G	A	M	G	Q	P	M	S	L	S	G	Q	P	P	P	P	G	T	S	G	M	A	P	H	S	M	A	142																						
Gal11p	S	A	N	N	M	N	V	N	M	N	L	N	P	Q	M	F	L	N	Q	A	Q	-----	A	R	Q	Q	V	A	141																													

## B

	.	:	.	:	.	:	.	:	.	:	.	:	840																																															
human_TIG	I	S	S	P	S	P	C	Q	Q	V	Q	T	P	Q	-	S	M	P	P	P	Q	P	S	P	Q	P	S	Q	P	N	S	N	V	S	S	G	P	A	P	S	P	S	F	L	P	S	P	S	P	Q	S	P	426							
murine_PAQ	I	S	S	P	S	P	C	Q	Q	V	Q	T	P	Q	-	S	M	P	P	P	Q	P	S	P	Q	P	G	---	S	Q	P	N	S	N	V	S	S	G	P	A	P	S	P	S	F	L	P	S	P	S	P	Q	S	P	493					
human_PAQ	I	S	S	P	S	P	C	Q	Q	V	Q	T	P	Q	-	S	M	P	P	P	Q	P	S	P	Q	P	S	Q	P	N	S	N	V	S	S	G	P	A	P	S	P	S	F	L	P	S	P	S	P	Q	S	P	452							
Gal11p	I	N	K	T	I	N	C	K	-	V	N	G	R	T	K	S	N	T	I	E	V	T	S	I	E	S	T	N	K	K	L	S	I	S	N	A	-	S	Q	Q	D	T	E	R	S	A	S	N	T	A	K	S	T	P	N	T	N	P	S	811



**Abb. 22:** Homologe Bereiche von PAQ und Gal11. (A) Die N-Termini von PAQ und Gal11 sind evolutionär konserviert. (B) „Alignment“ des zentralen und C-terminalen Bereichs von PAQ mit Gal11. Die dargestellten Homologiebeziehungen wurden mit dem Programm Malalign (W2H-Husar; Abschn. 3.19.1.3.) generiert.

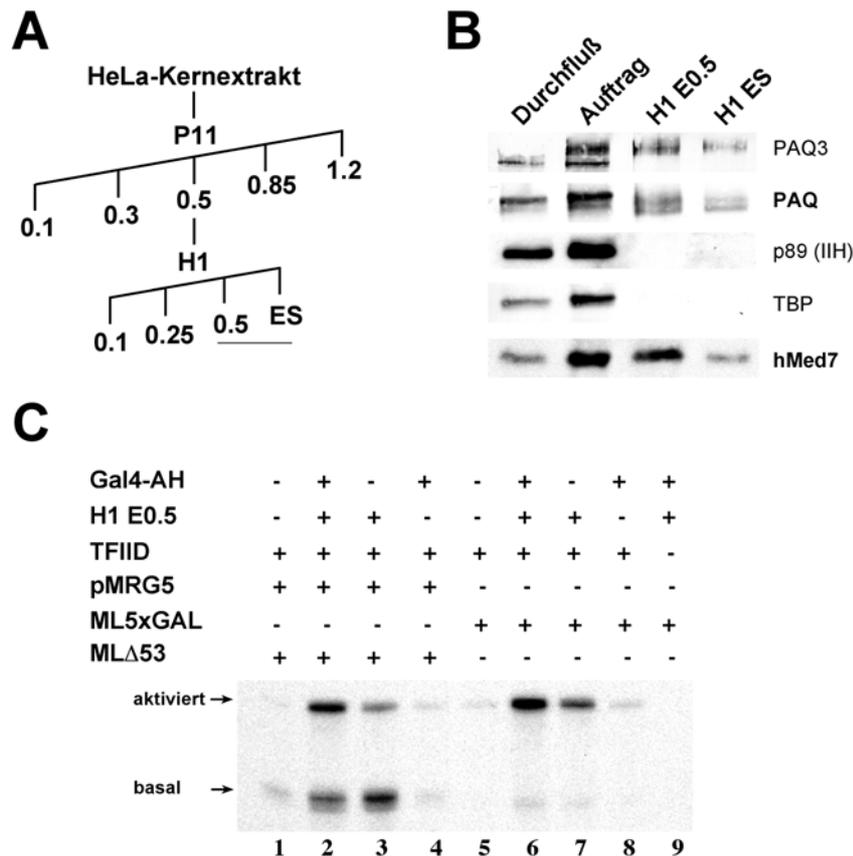
Möglicherweise stellt also auch der N-terminale Bereich des Mediatorproteins Gal11 eine potentielle Bindungsstelle für Aktivatoren dar. In der Tat wurde eine Interaktion eines N-terminalen Fragments von Gal11 (aa 1-351) mit der Gal4-Aktivierungsdomäne beschrieben (Jeong *et al.*, 2001).

Auf eine Illustration des „Alignments“ der Q-reichen Domänen wurde verzichtet. Mögliche Homologiebeziehungen des zentralen und C-terminalen Teils von PAQ mit Gal11 sind in Abb. 22B zu finden. Die Daten müssen aber mit Vorsicht interpretiert werden, da es sich auch hier größtenteils um eine Region reduzierter Komplexität handelt.

Nichtsdestotrotz favorisierten auch die Bioinformatik-Daten eine Rolle von PAQ als Teil eines humanen Mediator-ähnlichen Cofaktorkomplexes. Die experimentelle Bestätigung dieser Hypothese soll nun in den nächsten Kapiteln erbracht werden.

### 4.4.3. Funktionelle Coelution von PAQ mit Mediatoruntereinheiten

Als erstes sollte deshalb eine Coelution von PAQ mit bereits bekannten humanen Mediatoruntereinheiten durch Western-Blot Analyse untersucht werden. Dazu wurde das Elutionsverhalten von PAQ und hMed7 (Myers *et al.*, 1998) bei der Affinitätschromatographie an immobilisiertem GST-VP16:H1 (Abschn. 3.13.6.) studiert. Das Ergebnis ist in Abb. 23 schematisch dargestellt.

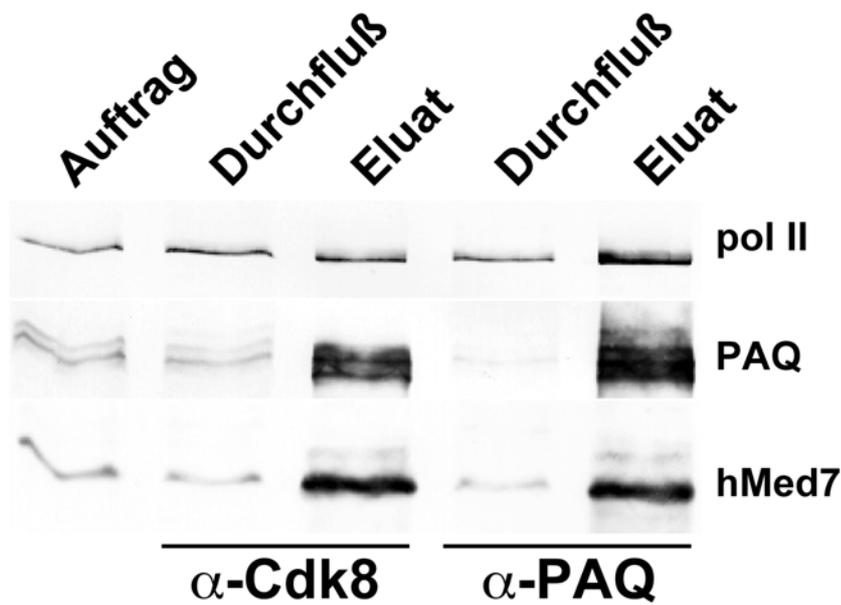


**Abb. 23:** PAQ und hMed7 binden an die Aktivierungsdomäne VP16:H1 und demonstrieren gleiches Elutionsverhalten bei der Affinitätschromatographie. (A) Reinigungsschema. HeLa-Kernextrakt wurde über Phosphocellulose P11 aufgetrennt. Die 0.5 M KCl Fraktion wurde – nachdem sie zuvor über die Kontrollsäulen GST und GST-VP16:H1F442P gelaufen war – im nächsten Schritt auf immobilisiertes GST-VP16:H1 Fusionsprotein (H1) aufgetragen, und mit 0.1 M, 0.25 M und 0.5 M KCl, sowie Detergens (ES) eluiert (vgl. Abschn. 3.13.6.). (B) Western-Blot Analyse der Affinitätschromatographie. PAQ und hMed7 zeigen ein identisches Elutionsprofil, während die generellen Transkriptionsfaktoren TFIID (p89) und TFIID (TBP), welche auch an GST-VP16:H1 binden (vgl. Auftrag und Durchlauf bzw. siehe Abschn. 1.2.5.2.), nicht mehr im Hochsalm (H1 E0.5)- bzw. Detergenseluat (H1 ES) nachweisbar sind. (C) Analyse der Hochsalmfraktion (H1 E0.5) der Affinitätschromatographie (A) in einem rekonstituierten *in-vitro*-Transkriptionssystem. Die Hochsalmfraktion, welche unter anderem PAQ und hMed7 enthält, stimuliert die aktivierte Transkription (Spur 2 und 6). Der basale Effekt auf die *in-vitro*-Transkription (Spur 3 und 7) ist wohl zum größten Teil auf Anwesenheit von RNA-Polymerase II in der Hochsalmfraktion (Daten nicht gezeigt) zurückzuführen. Die Abwesenheit eines Transkriptes bei Weglassen von TFIID im rekonstituierten System (Spur 9) zeigt in Übereinstimmung mit der Western-Blot Analyse (B), daß die Hochsalmfraktion selbst kein TFIID enthält. Die Reporter pMRG5, ML5xGAL und MLΔ53 wurden beschrieben (Abschn. 4.1.1.).

Die Analyse zeigt deutlich ein gemeinsames Bindungs- und Elutionsverhalten der Proteine PAQ und hMed7 an immobilisiertem GST-VP16:H1 (Abb. 23). Eine Coelution von PAQ und hMed7 konnte darüber hinaus auch auf der DE52 DEAE-Cellulose- und Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säule im PC2-Reinigungsschema (Abb. 10) beobachtet werden (siehe auch Abschn. 4.5.3.: Abb. 27 & 28 und Daten nicht gezeigt). Dies wurde als ein weiterer Hinweis dafür gewertet, daß PAQ Teil eines humanen Mediatorkomplexes sein könnte. Die in Abb. 23C deutlich werdende funktionelle Coelution von hMed7 und PAQ mit einer RNA-Polymerase II Cofaktorfunktion konnte zudem durch Chromatographie von PC2 (DE52-Fraktion) an GST-VP16:H1 reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Wie im nächsten Kapitel im Detail beschrieben (Abschn. 4.4.4.), war es schließlich möglich, durch Coimmunreinigung von PAQ mit bekannten humanen Mediatoruntereinheiten, PAQ als neue *bona fide* Mediatorkomponente in humanen Zellen zu identifizieren. Damit ergab sich zunächst eine Verschiebung von der ursprünglichen Fragestellung nach den molekularen Komponenten der PC2-Funktion zu einer Fokussierung auf die Charakterisierung des PAQ-assoziierten humanen Mediatorkomplexes.

#### 4.4.4. Coimmunreinigung von PAQ und humanem Mediator

Um die Frage zu beantworten, ob PAQ Teil des humanen Mediators sei, wurde eine Immunreinigung von Mediator mit einem kommerziellen polyklonalen Antikörper, der gegen die Untereinheit Cdk8 (Gold *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1999) gerichtet ist, durchgeführt. Als Positivkontrolle kam die Immunaффinitätschromatographie mit dem in dieser Arbeit hergestellten monoklonalen anti-PAQ-Antikörper (Klon 1H7, Abschn. 4.3.4.) zum Einsatz. Beide Antikörper wurden zu diesem Zweck auf Protein G Sepharose immobilisiert, (Konzentration 1 mg/ml) und 1 ml HeLa-Kernextrakt (Proteinkonzentration ca. 9 mg/ml) auf 20 µl der entsprechenden Affinitätssäule aufgetragen und wie beschrieben (Abschn. 3.13.7.) prozessiert. Ein extensives Waschen der Säulen erfolgte mit IP-Puffer (150 mM KCl). Anschließend konnten die spezifisch gebundenen Polypeptide im Immunblot analysiert werden (Abb. 24). Die Cdk8-Antikörpersäule hatte einen Komplex gebunden, der nicht nur – wie erwartet (Gu *et al.*, 1999) – hMed7 enthält, sondern auch PAQ. Zudem war es möglich an der PAQ-Immunaффinitätssäule die stabile Bindung von hMed7 nachzuweisen (Abb. 24). Damit war eindeutig gezeigt, daß PAQ Teil eines humanen Mediatorkomplexes ist. Gelfiltrationsexperimente bei denen eine Coelution von PAQ mit weiteren humanen Mediatoruntereinheiten in einem Größenbereich von 1.5 MDa bis 400 kDa beobachtet werden konnte, sollten die in diesem Kapitel (Abschn. 4.4.) gezogenen Schlußfolgerungen noch weiter untermauern (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 24:** PAQ ist eine neuartige Komponente des humanen Mediators. HeLa-Kernextrakt (Auftrag; 5 % der Gesamtmenge) wurde über zwei verschiedene Immunaффinitätssäulen geschickt und der Durchfluß (5.5 %) sowie das Eluat (50 %) im Western-Blot analysiert. Beide Antikörper wurden an Protein G Sepharose immobilisiert;  $\alpha$ -Cdk8: anti-Cdk8-Antikörper,  $\alpha$ -PAQ: anti-PAQ(1H7)-Antikörper. pol II: RNA-Polymerase II große Untereinheit (RPB1).

Über eine Assoziation des Hefe-Mediators bzw. humaner Mediatoren mit substöchiometrischen Mengen an RNA-Polymerase II wurde berichtet (Liu *et al.*, 2001d; Maldonado *et al.*, 1996). Diese Beobachtung konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden, da beide Affinitätssäulen, sowohl die Cdk8- als auch die PAQ-Antikörpersäule, RNA-Polymerase II binden (Abb. 24). In dieser Hinsicht war der PAQ-assozierte Mediator-komplex zunächst also nicht von TRAP/SMCC und ARC unterscheidbar (Gu *et al.*, 1999; Näär *et al.*, 1999).

Da die in der Literatur beschriebenen humanen Mediatoren (CRSP, TRAP/SMCC, DRIP; siehe Abschn. 1.3.2.) zum Teil eine große Heterogenität in ihrer Polypeptidzusammensetzung aufweisen (Ito *et al.*, 1999; Rachez *et al.*, 1999; Ryu *et al.*, 1999), und ein PAQ homologes Protein (TIG-1, siehe Abschn. 4.4.1.) nur in ARC (Näär *et al.*, 1999) nachgewiesen werden konnte, war es zunächst nicht klar, ob PAQ einen integralen Bestandteil aller Mediatoren oder nur eines bestimmten Mediator-komplexes darstellt. Diese Problematik und die Frage nach der möglichen biologischen Funktion des PAQ-Mediator-komplexes soll in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

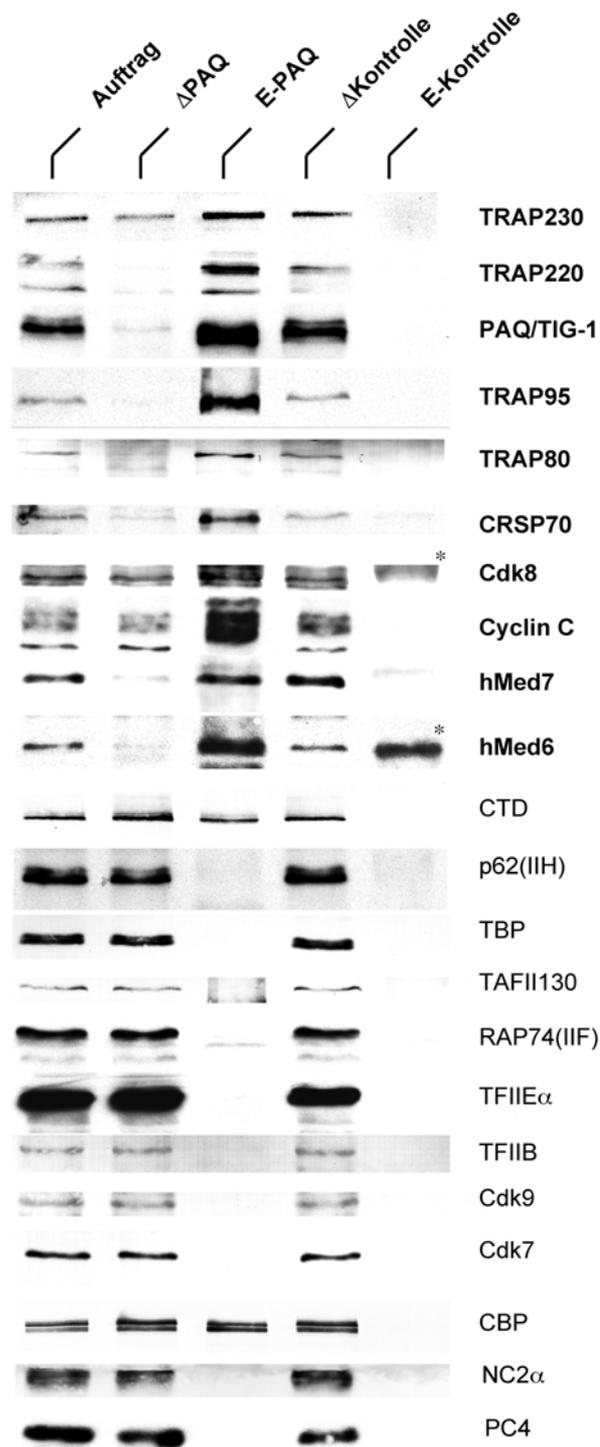
## 4.5. Der humane Mediator ist ein neuer genereller Transkriptionsfaktor in physiologischen Transkriptionssystemen

### 4.5.1. Der überwiegende Teil der humanen Mediatoren ist mit PAQ assoziiert

Mit den bisher gezeigten Experimenten konnte nicht zwischen den beiden Möglichkeiten unterschieden werden, ob PAQ nur eine schwach assoziierte Komponente oder ein integraler Bestandteil des humanen Mediators ist. Deshalb sollte PAQ möglichst quantitativ durch Immundepletion (Abschn. 3.16.1.3.) aus Kernextrakten von humanen Tumorzelllinien entfernt und dabei untersucht werden, inwieweit bekannte Mediatoruntereinheiten bei diesem Verfahren codepletiert werden. Zu diesem Zweck wurde der monoklonale Ratte anti-PAQ-Antikörper (Klon 1H7) auf Protein G Sepharose immobilisiert (Konzentration 2 mg/ml) und 0.1 ml der Affinitätsäule mit 0.5 ml Jurkat-Kernextrakt (Gesamtprotein ca. 6-7 mg/ml) wie beschrieben (Abschn. 3.16.1.3.) beschickt. Eine Spezifitätskontrolle des Verfahrens erfolgte unter identischen Bedingungen mittels einer Protein G Sepharose-Säule, die mit einem monoklonalen Ratte anti-LMP1-Antikörper (TP14B7) beladen war (2 mg/ml). Bei LMP1 handelt es sich um ein virales Protein (EBV), das nur in EBV-infizierten Zellen vorkommt. Der anti-PAQ-Antikörper sowie der Kontrollantikörper besitzen den gleichen Immunglobulin-Isotyp.

Wie in Abb. 25 deutlich zu erkennen, ermöglicht die beschriebene Prozedur eine Depletion von PAQ mit einer Effizienz größer als 90 % (Mittler *et al.*, 2001). Die Mediatoruntereinheiten TRAP220, TRAP95, TRAP80, CRSP70, hMed6 und hMed7 weisen dabei eine korrelierte Codepletion auf, wohingegen TRAP230, Cdk8 und Cyclin C nicht depletiert werden können. In der Bäckerhefe konnte bereits gezeigt werden, daß das Kinase-Cyclin-Paar (zusammen mit den Untereinheiten Srb8 und Srb9) keine konstitutive Komponente des Mediators ist, sondern nur fakultativ mit dem Cofaktorkomplex assoziiert ist (Liu *et al.*, 2001d; Myers und Kornberg, 2000). Darüber hinaus hatte die Beseitigung von Cdk8 aus dem ARC-Komplex keinen Einfluß auf dessen *in-vitro*-Funktion (Näär *et al.*, 1999). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß mit Hilfe der Bioinformatik eine Homologiebeziehung zwischen TRAP230 und Srb8 im aminoterminalen Bereich der beiden Proteine hergestellt werden kann (Daten nicht gezeigt; siehe außerdem <http://bio.lundberg.gu.se/medb/>). Die experimentellen Daten lassen daher folgende Schlußfolgerungen zu:

- PAQ ist ein integraler Bestandteil des humanen Mediators
- In humanen Zellen existiert möglicherweise ein Subkomplex aus Cdk8, Cyclin C und TRAP230 (plus einem weiteren noch nicht identifizierten Protein), der dem Srb8-11 Subkomplex der Bäckerhefe entspricht und nur substöchiometrisch mit Mediator assoziiert ist.



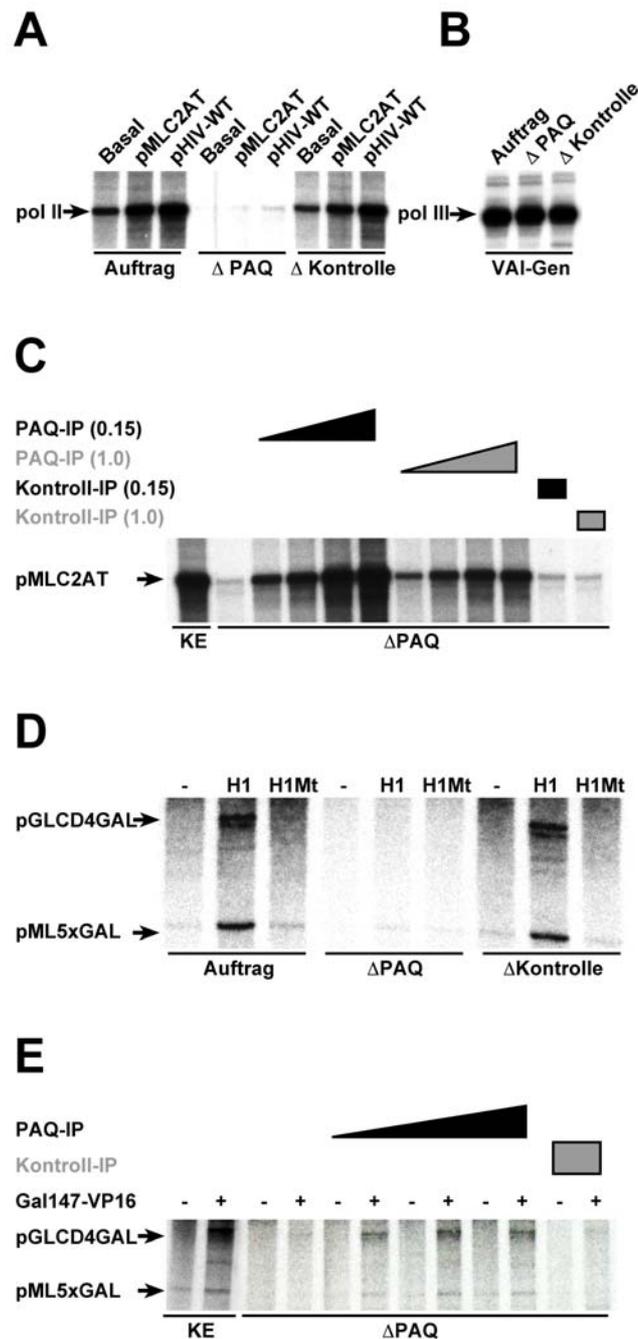
**Abb. 25:** Der monoklonale Antikörper PAQ(1H7) depletiert den Großteil der Mediatoruntereinheiten in einem Kernextrakt. Im Western-Blot wurden 4 % des Auftrags (Jurkat-Kernextrakt) und jeweils 4.4 % des Säulendurchbruchs ( $\Delta$ ) sowie 20 % des spezifisch präzipitierten Materials der PAQ-Antikörper (E-PAQ)- bzw. Kontroll-Antikörpersäule (E-Kontrolle) analysiert. Beide Antikörper waren an Protein G Sepharose immobilisiert (siehe Text). Mediator-Untereinheiten sind in breitem Druckbild dargestellt. Bezüglich ihrer Nomenklatur siehe Abschn. 1.3.2.1. (Tabelle 5). Kreuzreaktionen von Sekundärantikörpern mit der schweren und leichten Kette der Immunglobuline sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. CTD: C-terminale Domäne der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II.

Das erhaltene Resultat ist zudem hochspezifisch, weil die Kontrollsäule keines der oben erwähnten Proteine depletiert noch bindet, und die generellen Cofaktoren (NC2, PC4), der kritische Elongationsfaktor P-TEFb (Cdk9), sowie die generellen Transkriptionsfaktoren von der PAQ-Immunitätssäule weder codepletiert noch gebunden werden (Abb. 25). Eine substöchiometrische Assoziation von RNA-Polymerase II mit humanem Mediator – ca. 20 % der Gesamtmenge – wurde bereits in Abschn. 4.4.4. beschrieben und diskutiert. Die Polymerase-Menge wird daher bei diesem Verfahren nicht drastisch reduziert. Das selbe gilt auch für die Histonacetyltransferase CBP (Abschn. 1.4.2.1.), deren Auftreten in der Immunfällung dadurch erklärt werden kann, daß CBP mit RNA-Polymerase II interagiert (Cho *et al.*, 1998; Kee *et al.*, 1996). Dafür spricht obendrein, daß die relativen Mengen der beiden Transkriptionsfaktoren im Western-Blot in etwa gleich sind. Diese Vermutung konnte in der Tat im Verlauf der Arbeit bestätigt werden, da „Polymerase-freie“ Mediatorpräparationen kein CBP mehr enthielten (siehe Abschn. 4.5.3.).

In einem unabhängigen experimentellen Ansatz konnten Immunfluoreszenzstudien von PAQ und TRAP220 mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie eine eindeutige Colokalisation der beiden Proteine beweisen (G. Stelzer). Dies ist in vollkommenem Einklang mit den bereits präsentierten Daten und wurde deshalb auch als eine weitere Bestätigung der oben gemachten Schlußfolgerungen gesehen (die entsprechende Abbildung befindet sich im Anhang, Abschn. 8.5., Abb. 41).

#### **4.5.2. Die RNA-Polymerase II-Transkription ist Mediator-abhängig**

Das im vorhergehenden Abschnitt vorgestellte Verfahren ermöglichte die quantitative Entfernung eines Großteils der humanen Mediator Komplexe aus einem Zellkernextrakt. In Anbetracht der Tatsache, daß Kernextrakte die Basis eines exzellenten *in-vitro*-Transkriptionssystem darstellen, welches alle (extrahierbaren) nukleären Proteine in nahezu physiologischen Mengenverhältnissen enthält (näheres siehe Abschn. 3.16.1.), sollte in einer Art „biochemischem *Knockout*“ die Rolle der PAQ-assoziierten Mediatoren in diesem groben System funktionell untersucht werden. Vorversuche zeigten einen dramatischen Effekt mit einer reproduzierbaren Reduktion der RNA-Polymerase II-Transkription um 90 bis nahezu 100 % des Ausgangssignals. Deshalb galt es die Frage zu beantworten, ob Mediatoren im Kernextrakt ausschließlich für die Aktivator-abhängige oder auch für die basale Transkription gebraucht werden. Die Antwort war eindeutig, denn die experimentellen Daten konnten zweifelsfrei zeigen, daß Mediatoren absolut essentiell für die basale Transkription von RNA-Polymerase II sind (Mittler *et al.*, 2001).



**Abb. 26:** PAQ-Mediator ist ein neuer genereller Transkriptionsfaktor in physiologischen Transkriptionssystemen. **(A)** Die Depletion des HeLa-Kernextrakts (Auftrag) mit dem anti-PAQ-Antikörper ( $\Delta$ PAQ) schaltet die RNA-Polymerase II-Transkription (pol II) nahezu komplett aus, während ein Kontroll-Antikörper ( $\Delta$ Kontrolle) keinen Effekt auf die *in-vitro*-Transkription hat. USF-Reporter: pMLC2AT, Sp1-Reporter: pHIV-WT. **(B)** Die RNA-Polymerase III-Transkription (pol III) wird durch das Verfahren ( $\Delta$ PAQ) nicht beeinträchtigt. **(C)** Rekonstitution der RNA-Polymerase II-Transkription durch PAQ-Mediator in einem depletierten ( $\Delta$ PAQ) HeLa-Kernextrakt (KE). Die basale Cofaktoraktivität bleibt auch nach intensivem Waschen mit IP-Puffer/0.15 M KCl (0.15) bzw. IP-Puffer/1.0 M KCl (1.0) erhalten. **(D)** und **(E)** PAQ-Mediator ist essentiell für Promotoren mit (pML5xGAL) oder ohne (pGLCD4GAL) TATA-Element, die von Gal147-VP16 reguliert werden. **(D)** Immundepletion ( $\Delta$ PAQ) in einem Jurkat-Kernextrakt (Auftrag). Gal147-VP16:H1 (H1), Gal147-VP16:H1F442P (H1Mt). **(E)** Rekonstitution der Transkription im Jurkat-Kernextrakt (KE). Der Waschschritt erfolgte mit IP-Puffer/0.15 M KCl.

Im Experiment selbst wurde der Adenovirus ML-„core“-Promotor (enthält keine Aktivatorbindungsstellen) als basaler Reporter verwendet. Gleichzeitig wurden zwei Reporter, von denen der eine durch USF, der andere hingegen durch Sp1 aktiviert werden kann, eingesetzt. Die Transkription des basalen Reportergens war im depletierten Kernextrakt fast gänzlich ausgeschaltet. Auch die RNA-Syntheserate der beiden Reporter mit Aktivatorbindungsstellen war massiv beeinträchtigt. Obwohl schwer zu quantifizieren, schien die relative Stimulation durch die Aktivatoren USF bzw. Sp1 im Mediator-depletierten Kernextrakt allerdings erhalten zu bleiben (Abb. 26A). Dies kann entweder auf die nicht komplette Beseitigung aller Mediatoren durch das Immundepletionsprotokoll (vgl. Abb. 25) oder die Wirkung der noch vorhandenen Coaktivatoren (PCs, TAFs etc.) zurückgeführt werden. Diese Effekte sind absolut spezifisch, da ein Kontrollantikörper (siehe Abschn. 4.5.1.) die *in-vitro*-Transkription nicht beeinflusst (Abb. 26A). Darüber hinaus zeigt sich die RNA-Polymerase III-Transkription durch die Depletion des Kernextraktes für Mediatoren vollkommen unbeeinflusst (Abb. 26B).

Um gänzlich auszuschließen, daß der monoklonale anti-PAQ-Antikörper in irgend einer Art und Weise eine vollkommen unspezifische Inhibition der Klasse II-Transkription verursacht, sollte eine Rekonstitution der Transkription durch Rückgabe des immunpräzipitierten Materials durchgeführt werden. Dies war selbst nach extensivem Waschen unter Hochsalzbedingungen (IP-Puffer mit 1.0 M KCl) möglich. Die Wiederfindungsrate (bezogen auf die Aktivität) betrug dabei ca. 25 % (Abb. 26C). Die bereits gewonnenen Resultate konnten ferner für Reportergene reproduziert werden, die Promotoren mit bzw. ohne TATA-Box besitzen, und durch Gal4-VP16 bzw. Gal4-VP16:H1 aktiviert werden (Abb. 26D und E).

Weil das Depletionsverfahren auch die Gesamtmenge an RNA-Polymerase II im Kernextrakt verringert (vgl. Abb. 25) wurde sichergestellt, daß diese Reduktion nichts mit dem beobachteten Effekt zu tun hat. Eine titrierte Rückgabe des gereinigten Enzyms zeigte keinerlei Stimulation bzw. Rekonstitution der *in-vitro*-Transkription (Daten nicht gezeigt).

Auf den ersten Blick waren die Ergebnisse in der Tat sehr überraschend, weil humane Mediator Komplexe zuvor ausschließlich als Coaktivatoren beschrieben wurden (Übersichtsartikel: Malik und Roeder, 2000). Im Unterschied zu dieser Arbeit (Mittler *et al.*, 2001) wurden dabei aber zumeist hochgereinigte rekonstituierte *in-vitro*-Transkriptionssysteme verwendet, denen einige der Kontrollmechanismen des groben Kernextraktsystems gänzlich fehlen. Beispielsweise wird das rekonstituierte System nicht mehr durch die Kinaseaktivitäten von Cdk7 (TFIIH) und Cdk9 (Elongationsfaktor P-TEFb) reguliert (Daten nicht gezeigt), da unter anderem negative Faktoren wie NELF und DSIF fehlen. Wie wichtig eine Balance zwischen positiven und negativen Transkriptionsfaktoren *in vivo* sein kann, wurde bereits in der Einleitung besprochen (Abschn. 1.2.8.). Es wurde außerdem bereits mehrfach erwähnt (Abschn. 1.2.5.2.), daß eine Punktmutation (F442P) in der Subregion H1 der VP16-Aktivierungsdomäne zu einem nahezu vollkommenen

Funktionsverlust des Aktivators in Zellen führt (Ikeda *et al.*, 2002; Regier *et al.*, 1993). Diese Eigenschaft wird, im Gegensatz zum gereinigten System (Daten nicht gezeigt), indes nur von einem groben Kernextraktssystem in einer akkuraten Art und Weise *in vitro* rekapituliert (vgl. Abb. 26D). Die Kombination der erwähnten Unterschiede mag also dafür verantwortlich sein, daß die essentielle Rolle von humanen Mediatoren für die RNA-Polymerase II-Transkription, nur im Kernextraktssystem zu entdecken war. Beachtet man hingegen die Daten aus der Bäckerhefe, in der durch genomweite RNA-Expressionsstudien eine absolut essentielle Rolle der Mediatoruntereinheit Srb4 für die gesamte RNA-Polymerase II-Transkription nachgewiesen wurde (Holstege *et al.*, 1998), machen die oben präsentierten Resultate durchaus Sinn. Kürzlich konnten die hier gemachten Beobachtungen im Labor von Dr. R.G. Roeder (Rockefeller, New York) in einem ähnlichen aber unabhängigen Ansatz reproduziert werden. Die Immundepletion von HeLa-Kernextrakten mit einem anti-TRAP25-Antikörper führte auch in diesem Labor zu dem gleichen Ergebnis, daß Mediator in groben Systemen – und damit sehr wahrscheinlich auch in menschlichen Zellen – ein genereller Transkriptionsfaktor ist (Baek *et al.*, 2002).

#### **4.5.3. Der humane Mediatorkomplex B-Med ist essentiell für die RNA-Polymerase II-Transkription**

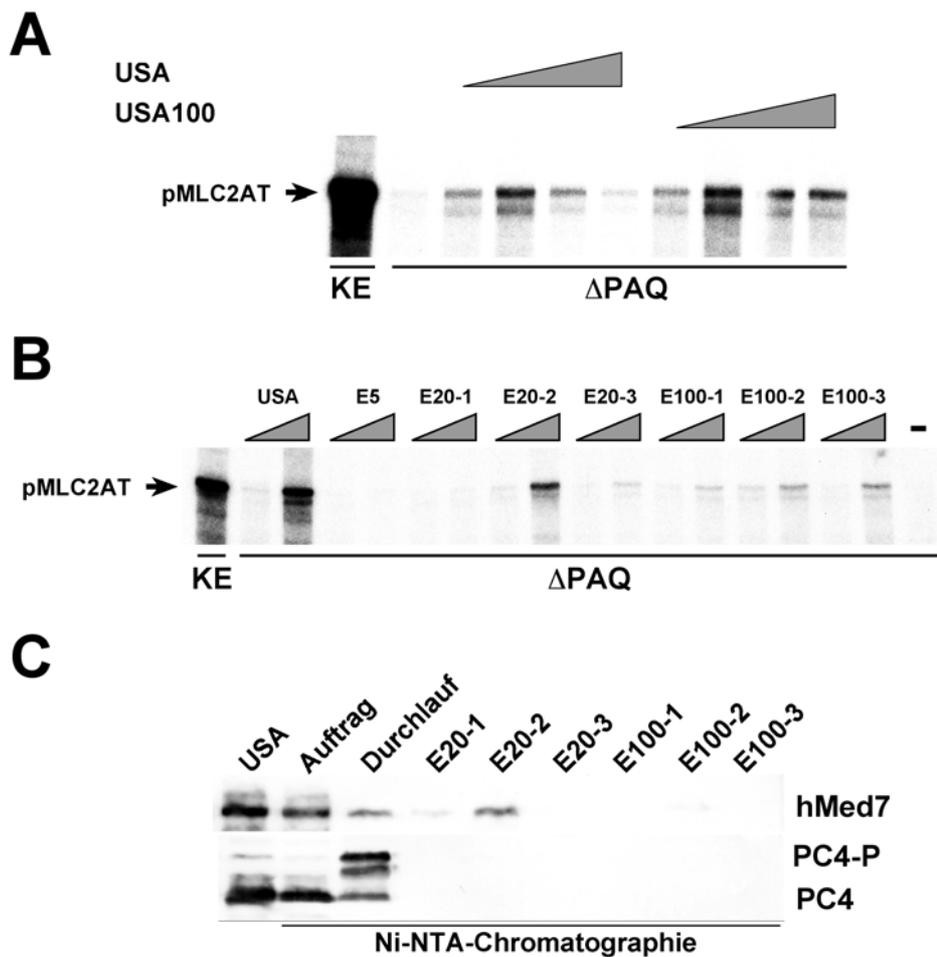
Weitergehende Forschungen im Labor von Dr. R.G. Roeder, die parallel zu der hier vorgestellten Arbeit betrieben wurden, kamen auch zu dem Ergebnis, daß die PC2-Funktion mit einem humanen Mediatorkomplex coeluiert (vgl. z.B. Abschn. 4.2.3.). In Anlehnung an das in Abschn. 4.1.2. vorgestellte Reinigungsschema und unter Verwendung einer transgenen Zelllinie, die ein Flag-hMed10-Fusionsprotein stabil exprimiert, konnte ferner gezeigt werden, daß bei der Größenausschlußchromatographie auf Superose 6 im Bereich von 500 kDa ein humaner Mediatorkomplex eluiert, der in einem finalen Schritt durch Immunaffinitätschromatographie mittels einer anti-Flag-Antikörper-Säule isoliert werden konnte (Malik *et al.*, 2000). Dieser Multiproteinkomplex enthielt die meisten bis dato bekannten humanen Mediatoruntereinheiten, allerdings fehlten Cdk8/Cyclin C, TRAP230 und TRAP240. Außerdem waren TRAP220, TRAP100 und hMed6 substöchiometrisch repräsentiert. Eine exakte Zusammensetzung des publizierten Komplexes findet sich im Anhang (Abschn. 8.6.). Die über Immunreinigung erhaltene homogene PC2-Mediatorpräparation besaß indes in einem gereinigten rekonstituierten *in-vitro*-Transkriptionssystem keinerlei Aktivität als echter Coaktivator. Eine Cofaktoraktivität konnte nur im Zusammenspiel mit den generellen Cofaktoren PC3/Topoisomerase I und PC4 gemessen werden. Dabei handelte es sich aber – wenn man strenge Kriterien anlegt – „nur“ um eine ca. 3.5-fache Stimulation der basalen Transkription (Malik *et al.*, 2000).

Auch in dieser Publikation konnte ein breites Elutionsprofil von Mediatoren auf einer Gelfiltrationssäule (Superose 6) im Bereich von 1.5 MDa bis ca. 400 kDa beobachtet werden, was sicherlich als ein deutlicher Hinweis auf eine starke Heterogenität und Variabilität humaner Mediatoren gewertet werden kann. Andererseits zeigen elektronenmikroskopische Daten (Kryo-EM), daß Mediatoren alles andere als globuläre Multiproteinkomplexe sind (Übersichtsartikel: Meisterernst, 2002), und deshalb *per se* kein ideales Elutionsverhalten in der Größenausschlußchromatographie aufweisen können.

Um den erwähnten Problemen, die praktisch zu einem - wenn auch noch nicht verstandenen - Funktionsverlust in einem gereinigten *in-vitro*-Transkriptionssystem führen, aus dem Weg zu gehen, sollte nun an dieser Stelle untersucht werden, ob in Anbetracht der Heterogenität humaner Mediatoren, alle im Kernextrakt vorhandenen Mediatorkomplexe als essentielle basale Cofaktoren fungieren, oder nur eine ganz bestimmte Form für den im vorhergehenden Kapitel vorgestellten dramatischen Effekt (Abschn. 4.5.2.) verantwortlich ist. Interessant war in diesem Zusammenhang natürlich, inwieweit PC2-Fractionen in der Lage sind, die RNA-Synthese im PAQ-Mediator-depletierten Extrakt wieder anzuschalten.

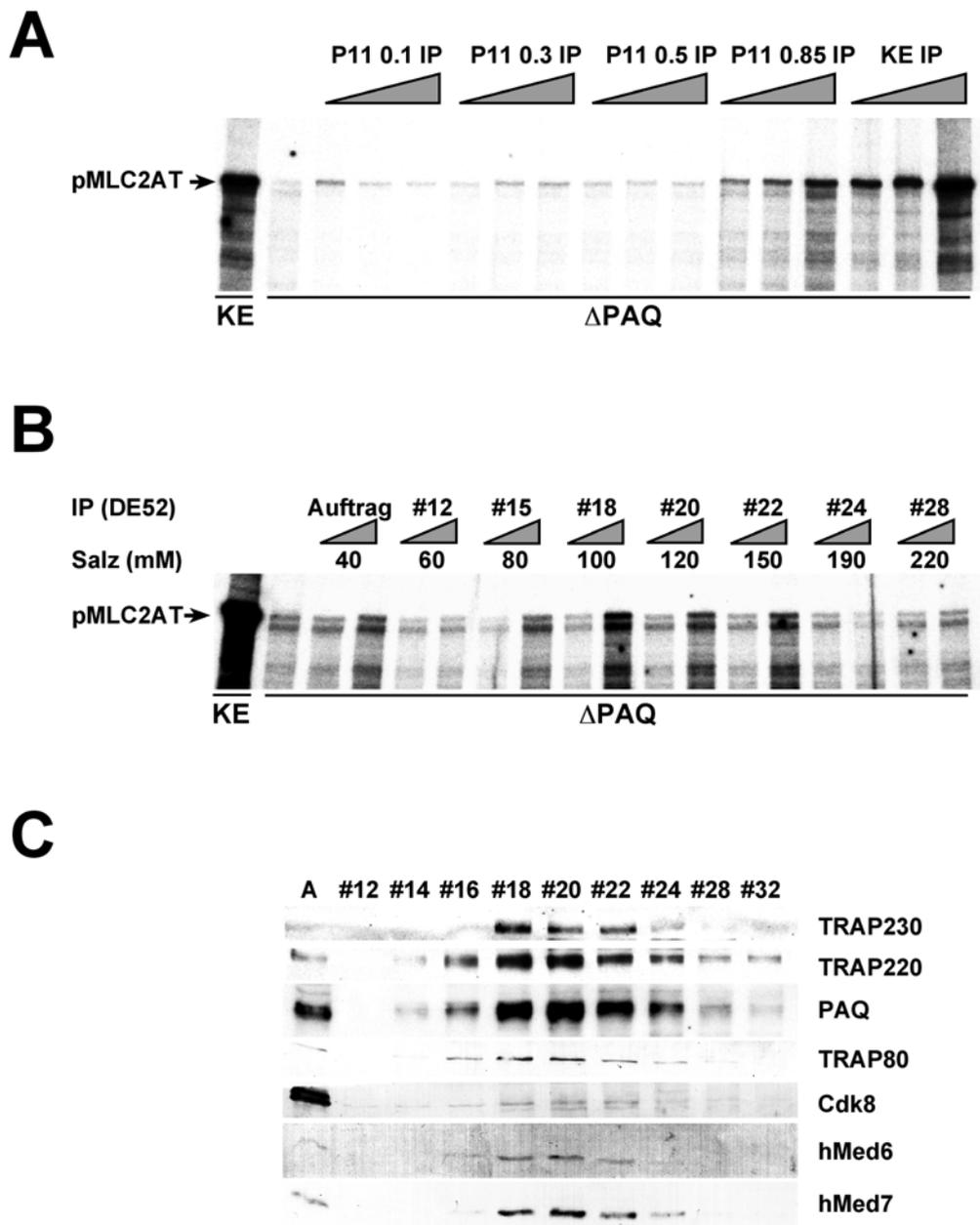
Sowohl über DEAE-Cellulose als auch über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gereinigte PC2-Fractionen konnten die RNA-Polymerase II-Transkription rekonstituieren (Abb. 27). Dies ließ allerdings die Frage unbeantwortet, ob es sich dabei um eine PC2-spezifische Eigenschaft handelt, oder beispielsweise auch Mediatoren, die nicht zusammen mit USA eluieren, dieses Verhalten zeigen. Es sei an dieser Stelle angemerkt, daß die Hauptmenge der Mediator-Proteine im Phosphocellulose P11-Reinigungsschema (Abb. 10) zu etwa gleichen Teilen in der P11 0.5- und P11 0.85(USA)-Fraktion auftritt (Daten nicht gezeigt). Deshalb sollte mit einer Kombination aus klassischer Säulenchromatographie und Immunaффinitätsreinigung (PAQ1H7) eine systematische Analyse (vgl. auch Abb. 29) durchgeführt werden. Die experimentellen Daten dazu sind in Abb. 28 illustriert.

Tatsächlich befindet sich der für die generelle Funktion im Kernextrakt relevante Mediator-komplex ausschließlich in der USA-Fraktion, und demonstriert ein exaktes Coelutionsverhalten mit der publizierten PC2-Aktivität (Kretzschmar *et al.*, 1994b; Malik *et al.*, 2000) mit einem Aktivitätsgipfel bei ca. 0.1 M KCl auf dem DE52-Gradienten (Mittler *et al.*, 2001). Die Western-Blot-Analyse zeigt ferner eine sehr gute Korrelation des Aktivitätsprofils mit den jeweils vorhandenen Mediator-Mengen (Abb. 28C). Dies bedeutet, daß im einfachsten Fall, ein ganz bestimmter Mediatorkomplex existieren muß, welcher für die basale RNA-Polymerase II-Transkription absolut essentiell ist. Um diesen wichtigen Transkriptionsfaktor näher zu charakterisieren sollte folgende Strategie zum Einsatz kommen. Der aus der P11 0.5-Fraktion stammende Komplex (nachstehend einfach mit **Med** bezeichnet) wurde einem Vergleich mit dem Komplex aus USA [nachfolgend **B-Med** (basaler Mediator) genannt] bzgl. struktureller Unterschiede in der Proteinzusammensetzung unterzogen.

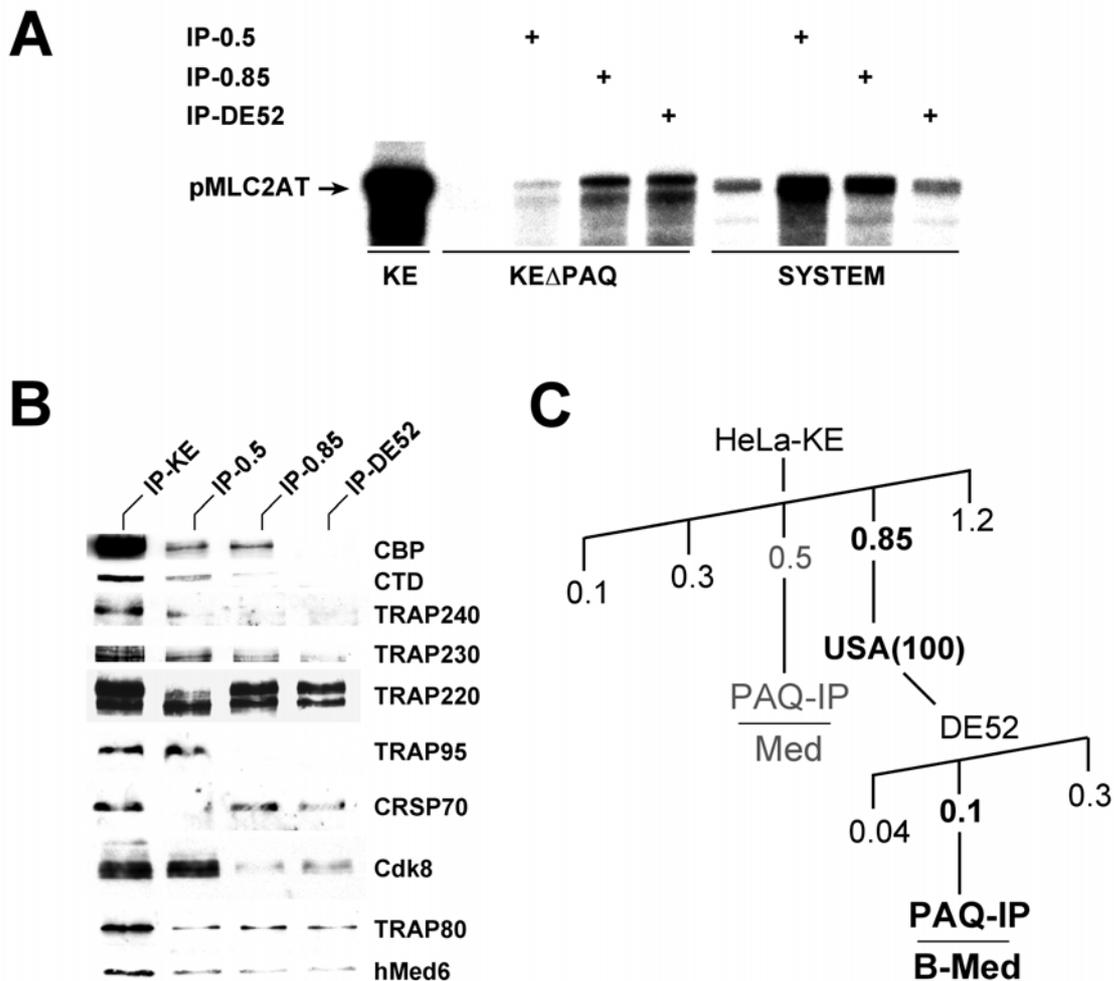


**Abb. 27:** Rekonstitution der *in-vitro*-Transkription im PAQ-Mediator depletierten Kernextrakt durch PC2. **(A)** Die PC2-Vorläuferfraktion USA und eine PC2 DE52-Fraktion (0.1 M KCl) sind in der Lage die RNA-Synthese im depletierten Kernextrakt ( $\Delta$ PAQ) wieder herzustellen. Die PC2-Fraktion war zuvor zehnfach konzentriert worden. Das Titrationsprofil der Aktivität läßt vermuten, daß die Fraktionen noch eine oder mehrere inhibitorische Komponenten enthalten. KE: HeLa-Kernextrakt. **(B)** Die PC2 Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose Fraktion (E20-2) rekonstituiert die RNA-Synthese im depletierten Extrakt ( $\Delta$ PAQ). Getestet wurden verschiedene Fraktionen der Eluate der Metall-Affinitätschromatographie: E5 (5 mM Immidazol), E20 (20 mM Immidazol) und E100 (100 mM Immidazol). Anmerkung: Die Fraktion E20-2 ist auch als Coaktivator im gereinigten System aktiv (siehe Abb. 10D). **(C)** Analyse der PC2 Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose Fraktionen aus (B) im Immunblot. Die Mediatoruntereinheit hMed7 ist zur Aktivität korreliert. PC4-P: phosphoryliertes PC4.

Wie schon in Abb. 28A zu sehen, eluiert B-Med fast ausschließlich mit PC2 (Abb. 29A). Die am weitesten angereicherte B-Med-Präparation, die durch Immunaffinitätschromatographie einer PC2 DE52-Fraktion an einer PAQ(1H7)-Antikörpersäule erhalten werden konnte, war in der Lage die RNA-Synthese im PAQ-Mediator depletierten Extrakt zu rekonstituieren, hatte aber keinerlei Effekt auf die basale *in-vitro*-Transkription in einem gereinigten Transkriptionssystem (Abb. 29A). Lediglich eine moderate Coaktivatorfunktion konnte im gereinigten System (mit TFIID & Gal4-AH) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 28:** Der basale humane Mediator-Komplex B-Med lässt sich aus USA und PC2-Fractionen isolieren und stellt einen neuen generellen Transkriptionsfaktor in groben *in-vitro*-Transkriptionssystemen dar. (A) B-Med eluiert in der USA(P11 0.85)-Fraktion. Die PAQ-Mediator Komplexe wurden durch Immunreinigung (IP) mit auf Protein G Sepharose immobilisiertem PAQ(1H7)-Antikörper aus den entsprechenden Phosphocellulose (P11) Fraktionen (0.1 M bis 0.85 M KCl) isoliert. Als Positivkontrolle diente HeLa-Kernextrakt (KE). Der jeweilige Auftrag betrug stets 10 CV. Die Säulen (CV=50  $\mu$ l) wurden mit 300 CV IP-Puffer/150 mM KCl, 2x 200 CV IP-Puffer/1.0 M KCl und 300 CV IP-Puffer/90 mM KCl gewaschen. Die Transkriptionsreaktionen wurden mittels Titration (Variationsbreite Faktor 5) des gereinigten Materials bei einer Maximalmenge von 5  $\mu$ l Säulenäquivalent im PAQ-Mediator depletierten Kernextrakt ( $\Delta$ PAQ) durchgeführt. (B) B-Med coeluiert mit PC2-Fractionen. Der Aktivitätsgipfel entspricht der 0.1 M KCl Fraktion (#18) des DE52-Gradienten. Die Analyse erfolgte wie in (A) beschrieben. (C) Western-Blot-Analyse der in (B) verwendeten Ausgangsfractionen (#) des DE52-Gradienten. Die Transkriptionsaktivität in (B) korreliert nahezu perfekt zum Elutionsprofil der getesteten Mediator-Proteine.



**Abb. 29:** Med und B-Med: zwei unterschiedliche Formen von PAQ-assoziierten Mediator-komplexen die strukturell und funktionell differieren. **(A)** B-Med ist ein basaler Transkriptionsfaktor im Kernextraktssystem (KEΔPAQ) hat aber keine basale Funktion im rekonstituierten Transkriptionssystem (SYSTEM). Die Immunaффinitätschromatographie (IP) wurde wie in Abb. 28 beschrieben durchgeführt. Allerdings erfolgte das Waschen der Immunreinigung aus der P11 0.5-Fraktion (IP-0.5) nicht mit Hochsalzpuffer sondern mit 3x 300 CV IP-Puffer/150 mM KCl. Das gereinigte System enthielt TBP an Stelle von TFIID. IP-0.5: Med; IP-0.85: B-Med Vorläufer; IP-DE52: B-Med, siehe (C). **(B)** B-Med (IP-DE52) unterscheidet sich strukturell von Med (IP-0.5). Western-Blot-Analyse der beiden unterschiedlichen Mediator-komplexe (Erklärung siehe Text). CTD: große Untereinheit der RNA-Polymerase II. **(C)** Reinigungsschema für Med und B-Med.

Vergleicht man Abb. 29A und 29B so wird deutlich, daß die Stimulation der basalen Transkriptionsaktivität im gereinigten System – insbesondere durch Med – perfekt zur Anwesenheit von Mediator-assoziiierter RNA-Polymerase II (CTD) korreliert ist. Die Analyse im Immunblot zeigt zudem, daß sich Med und B-Med auch strukturell voneinander unterscheiden. Besonders auffällig ist das Fehlen der Untereinheit CRSP70 in Med und umgekehrt von TRAP95 in B-Med, während die humanen Mediator-komponenten TRAP80 bzw. hMed6 in etwa die gleiche Stöchiometrie besitzen.

Darüber hinaus ist B-Med durch zwei Formen von TRAP220, die ein unterschiedliches Laufverhalten in der SDS-PAGE aufweisen, charakterisiert. Schließlich sind auch die relativen Mengen an TRAP240, TRAP230 und Cdk8 in B-Med im Vergleich zu Med drastisch reduziert (Abb. 29B). Diese, zugegebenermaßen limitierte, strukturelle Analyse von B-Med (Mittler *et al.*, 2001) hat sehr große Ähnlichkeiten mit den publizierten Beschreibungen des PC2-Komplexes aus dem Roeder-Labor (siehe Abschn. 8.6. und Malik *et al.*, 2000) bzw. des CRSP-Komplexes aus dem Tjian-Labor (Ryu und Tjian, 1999; Taatjes *et al.*, 2002). Da PAQ eine gemeinsame Untereinheit von Med und B-Med zu sein scheint, lassen sich die beiden funktionell unterschiedlichen Komplexe nicht durch Immunaффinitätschromatographie an einem immobilisierten PAQ-Antikörper in einem Schritt biochemisch separieren. Sehr wahrscheinlich verläuft die Abtrennung des Med-Komplexes von B-Med durch Phosphocellulose- und DE52-Chromatographie (Abb. 29C) nicht quantitativ vollständig ab, so daß eine Kontamination von B-Med mit Med die substöchiometrischen Mengen der Untereinheiten TRAP240, TRAP230 und Cdk8 in B-Med gut erklären könnte. Eine exakte Definition von B-Med kann daher in Zukunft nur mittels Immunreinigung unter Verwendung eines B-Med-spezifischen Antikörpers (z.B. anti-CRSP70) erfolgen.

Inwieweit die strukturellen Unterschiede etwas mit der unterschiedlichen Funktion von Med und B-Med zu tun haben, ist zum jetzigen Zeitpunkt wissenschaftlich nicht beantwortbar. Auch kann über die biologische Rolle zweier unterschiedlicher Mediatoren nur spekuliert werden (siehe Diskussion und Meisterernst, 2002). Vor kurzem konnte allerdings gezeigt werden, daß der ursprünglich als ARC beschriebene Koaktivator (Näar *et al.*, 1999) in Wirklichkeit eine Mischung aus zwei Komplexen darstellt, und zwar aus CRSP und ARC-L (Taatjes *et al.*, 2002), wobei ARC-L als praktisch identisch zu TRAP/SMCC, NAT und wohl auch Med angesehen werden kann (zum Vgl. siehe auch Abschn. 1.3.2.1.). Obwohl die Autoren ein gereinigtes Transkriptionssystem in Verbindung mit einem groben, dem Aufbau von *bona fide* Chromatin dienenden *Drosophila* Embryonalextrakt verwendet haben, kommen sie faktisch zum gleichen Ergebnis, und zwar, daß nur derjenige Mediator-Komplex, welcher CRSP70 enthält, in ihrem Chromatin *in-vitro*-System funktionell aktiv ist (Taatjes *et al.*, 2002). Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, daß die strukturellen Differenzen durchaus funktionell verschiedene Oberflächen zur Konsequenz haben könnten, wenngleich diese Hypothese durch biochemische und zelluläre Studien in Zukunft bestätigt werden muß.

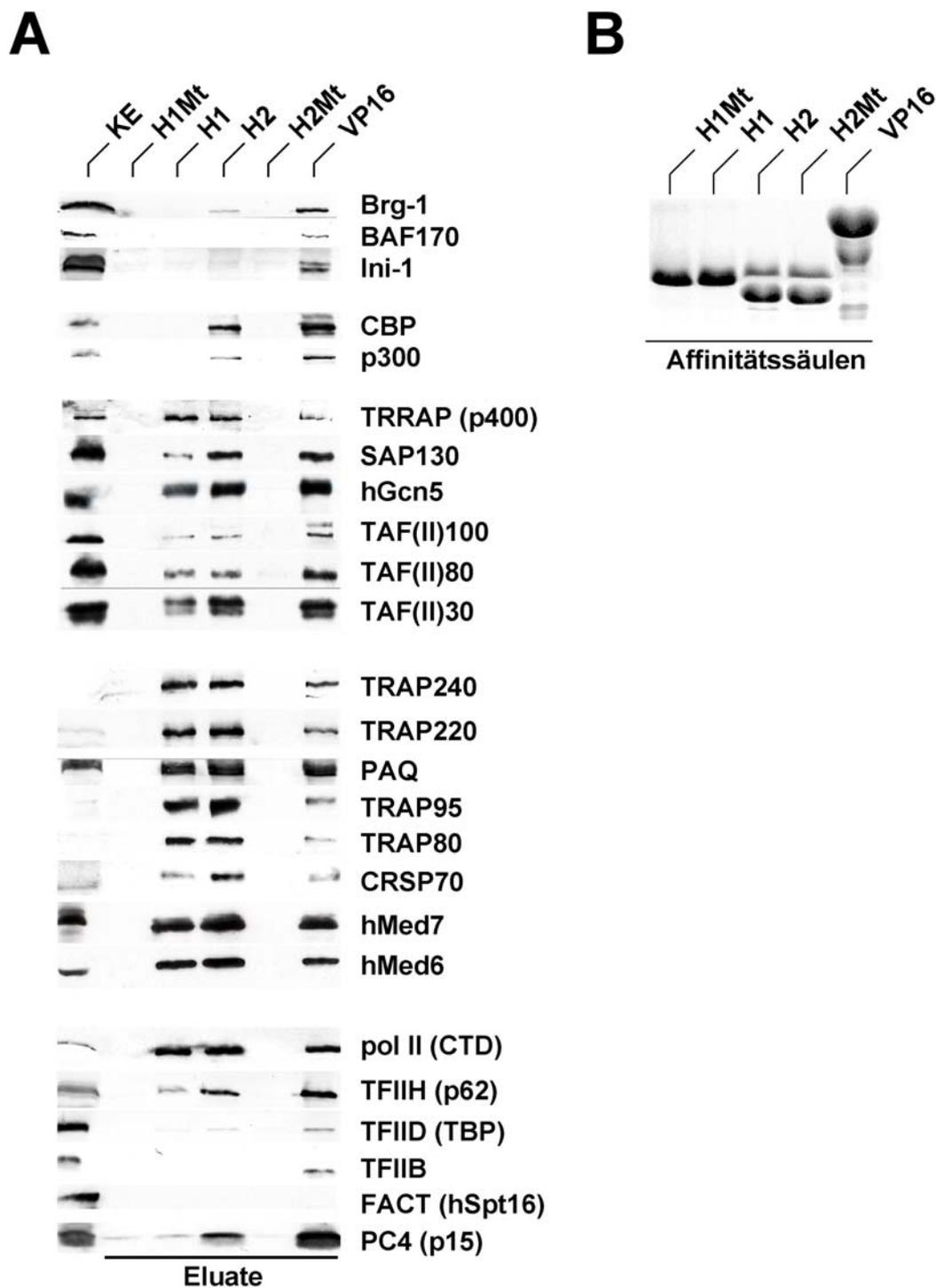
Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß humane Mediatoren in „physiologischen“ *in-vitro*-Transkriptionssystemen (Kernextrakt, Chromatinsystem) eine essentielle Rolle für die RNA-Polymerase II-Transkription spielen, und daß es eine ganz bestimmte Form (oder sollte man besser Zustandsform sagen?) gibt, hier B-Med genannt, die selbige Funktion vermitteln kann (Mittler *et al.*, 2001).

## 4.6. Analyse der VP16-Transaktivierungsdomäne: auf dem Weg zum funktionellen Proteom

### 4.6.1. Die VP16-Aktivierungsdomäne interagiert mit GTFs, Mediatoren und Chromatin-Faktoren

Zu Beginn dieser Arbeit wurde GST-VP16 eingesetzt, um die Coaktivatorfunktion von PC2 zu depletieren (Abschn. 4.2.1.), was letztendlich zur Identifikation von PAQ, einer neuen Untereinheit humaner Mediatoren führte (Abschn. 4.3.). Da PC2 und B-Med, die beide aus der USA(100)-Fraktion (Meisterernst *et al.*, 1991) stammen, zwischenzeitlich als humane Mediator Komplexe identifiziert werden konnten (Malik *et al.*, 2000; Mittler *et al.*, 2001), war es interessant, das Bindungsverhalten von humanen Mediatoruntereinheiten an die Aktivierungsdomäne von VP16 und deren Subregionen zu studieren. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, ob die Interaktion von Mediator und VP16 spezifisch ist, d.h., ob die Bindung des Cofaktors durch die bereits beschriebenen Punktmutationen (Abschn. 1.2.5.2.) in den jeweiligen Subdomänen VP16:H1 bzw. VP16:H2 beeinträchtigt werden kann. Darüber hinaus sollten die Untersuchungen Grundlage für ein besseres Verständnis der Funktionsweise der VP16-Aktivierungsdomäne sein.

Zu diesem Zweck wurden HeLa-Kernextrakte parallel mit den im folgenden aufgeführten GST-VP16 Affinitätssäulen (immobilisiert an Glutathion-Sepharose, ca. 2 mg Fusionsprotein pro ml Matrix) nach einer Vorinkubation mit einer GST-Säule wie beschrieben (Abschn. 3.13.6.) inkubiert: GST-VP16:H1, GST-VP16:H1(F442P), GST-VP16:H2, GST-VP16:H2 (FFF473, 475, 479AAA) und GST-VP16 (je 0.2 ml Säulenvolumen). Gefolgt von einem extensiven Waschen mit HEGN100-Puffer (3x 25 CV), wurden die Affinitätssäulen mit 2.5 CV HEGN500-Puffer (Salzluat) und anschließend mit 2.5 CV Detergens (N-Laurylsarcosin) bzw. Glutathion eluiert. Als erstes sollte dabei die Frage geklärt werden, inwieweit die VP16-gebundenen Mediatoren in der Lage sind, B-Med in einem PAQ-Mediator depletierten Kernextrakt (Abschn. 4.5.) zu ersetzen. Sowohl die Salzluate von GST-VP16:H1 als auch von GST-VP16:H2 (und natürlich auch von GST-VP16) können die RNA-Synthese im depletierten Kernextraktssystem vollständig rekonstituieren, während die Eluate der Kontrollsäulen GST-VP16:H1Mt und GST-VP16:H2Mt nahezu inaktiv sind (Daten nicht gezeigt). Dies besagt, daß beide Subdomänen der VP16-AD die B-Med-Aktivität *in vitro* rekrutieren können, was im Immunblot bestätigt werden konnte, denn CRSP70 befindet sich in den Salzluaten von H1 und H2 (Abb. 30). Allerdings scheint die VP16-AD nicht zwischen Med und B-Med bezüglich ihrer Bindungseigenschaften unterscheiden zu können, da z.B. TRAP95, TRAP240, CRSP70 und Cdk8 an beiden Subdomänen detektiert werden können (Abb. 30 und Ikeda *et al.*, 2002).



**Abb. 30:** Die Aktivierungsdomäne des *Herpes simplex* Virionproteins VP16 interagiert mit einer Vielzahl unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren. (A) Western-Blot-Analyse der gebundenen Polypeptide. Aufgetragen wurden jeweils 4 % der Salzeluate (siehe Text) und 0.5 % des Auftrags (KE: Hela-Kernextrakt). Humaner Swi/Snf-Komplex (Brg-1, BAF170, Ini-1), TFIC (TRRAP, SAP130, hGcn5, TAF<sub>II</sub>100, TAF<sub>II</sub>80, TAF<sub>II</sub>30), Mediatoren (TRAP240, TRAP220, PAQ, TRAP95, TRAP80, CRSP70, hMed7, hMed6), Histonacetyltransferasen (CBP, p300), generelle Transkriptionsfaktoren (RNA-Polymerase II, TFIIH, TFIID, TFIIB), Negativkontrolle (FACT), PC4. (B) Coomassie gefärbtes SDS Polyacrylamidgel zur Analyse der relativen Mengen an immobilisiertem Ligand für die Affinitätschromatographie.

Dies ist in Übereinstimmung mit Resultaten aus der Analyse von „ARC“ (Näär *et al.*, 1999), der ja unter anderem auf der Basis eines Detergenseluats einer VP16-Affinitätssäule (praktisch identisch zu dem hier verwendeten Verfahren) definiert wurde, aber aufgrund aktueller Ergebnisse als Mischung zweier Mediator Komplexe (ARC-L/TRAP/SMCC und CRSP) betrachtet werden muß, die sich über eine Glyceringradienten-Ultrazentrifugation voneinander separieren lassen (Taatjes *et al.*, 2002). Bei genauer Betrachtung von Abb. 30 mag es dem aufmerksamen Beobachter auffallen, daß die relative Menge der analysierten Mediator-Proteine in den Salzeluaten der GST-VP16 (und z.T. der GST-H1) Affinitätssäule reduziert ist. Dies liegt daran, daß ein Teil der gebundenen Mediatoren nicht mit Hochsalz, sondern erst mit Detergens – aus noch ungeklärten Gründen – von den Ligandensäulen eluiert werden kann. Angemerkt sei, daß der Einfachheit halber auf die Darstellung der Detergenseluats in Abb. 30 verzichtet wurde. Nichtsdestotrotz läßt sich eine hoch-spezifische Wechselwirkung humaner Mediatoren mit den beiden Subdomänen H1 und H2 der VP16-AD feststellen.

Da in der Hefe *S. cerevisiae* die VP16-AD mit dem Cofaktorkomplex SAGA (Abschn. 1.4.2.1.) interagiert (Ikeda *et al.*, 1999), war es naheliegend eine Interaktion mit dem orthologen humanen Multiproteinkomplex TFIIIC (Wieczorek *et al.*, 1998) zu überprüfen. In der Tat konnte eine spezifische Bindung von ausgewählten TFIIIC-Untereinheiten bestätigt werden (Abb. 30). Allerdings muß an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen werden, daß die Klasse II TAFs TAF<sub>II</sub>100, TAF<sub>II</sub>80 und TAF<sub>II</sub>30 auch Komponenten des TFIID-Komplexes sind (siehe Anhang 8.1. sowie Bell und Tora, 1999). Die funktionelle Relevanz dieser Beobachtung wurde im Labor von Dr. L. Tora (IGBMC, Illkirch/Strasbourg) unter Verwendung von „antisense“-Oligodesoxyribonukleotiden in transienten Reportersystemen auf zellulärer Ebene bestätigt. Kürzlich wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, über eine Wechselwirkung des mit TFIIIC verwandten STAGA-Komplexes und VP16 berichtet (Martinez *et al.*, 2001). Während die HATs CBP und p300 (spezifisch) nur an die Subdomäne H2 binden (Abb. 30 und Ikeda *et al.*, 2002), wird die HAT hGcn5 (in ihrer Eigenschaft als TFIIIC-Untereinheit) von H1 und H2 *in vitro* rekrutiert. Inwiefern die enzymatische Aktivität von hGcn5 für die Funktion der VP16-AD benötigt wird bleibt allerdings Gegenstand weitergehender Studien. Für die Funktion der AF2 (Abschn. 1.2.5.1.) von nukleären Hormonrezeptoren (Vitamin D-Rezeptor, Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  und PPAR $\gamma$ ) scheint der TFIIIC-Komplex (Liganden-abhängig!) inklusive seiner HAT-Funktion eine entscheidende Rolle zu spielen (Yanagisawa *et al.*, 2002). Darüber hinaus sieht es danach aus, daß Gcn5 in *S. cerevisiae* für die *in-vivo*-Funktion der VP16-AD wichtig ist (Stafford und Morse, 2001). Das TFIIIC-Protein TRRAP, das in seinem C-terminalen Bereich eine Homologie zur Proteinfamilie der ATM/PI 3-Kinasen aufweist (McMahon *et al.*, 1998), ist jedoch keine TFIIIC-spezifische Untereinheit, sondern auch gleichzeitig eine Komponente der beiden HAT-Komplexe NuA4 in Hefe (Allard *et al.*, 1999) und TIP60 in Säugern (Ikura *et al.*, 2000).

Ob ein humaner NuA4-Komplex, wie in *S. cerevisiae* beschrieben (Ikeda *et al.*, 1999) auch an die VP16-AD bindet, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Ein Test auf eine potentielle Bindung des TIP60-Komplexes, der unter anderem zwei DNA-abhängige Helikasen enthält (TIP49 und TIP48), mußte aufgrund fehlender Antikörper ebenfalls zurückgestellt werden. Funktionelle Studien konnten immerhin zeigen, daß die vollständige VP16-AD eine Helikaseaktivität (Abschn. 3.17) rekrutieren kann, welche auf einer Superose 6 Gelfiltrationssäule in einem Bereich von 1.5 bis 1.0 MDa eluiert (Daten nicht gezeigt).

Auch die generellen Transkriptionsfaktoren TFIID, TFIIB und RNA-Polymerase II weisen ein spezifisches Bindungsverhalten an die VP16-AD und ihre beiden Subdomänen H1 und H2 auf. Für die TFIID-Untereinheit p62 und die TFIIB-Komponente TAF<sub>II</sub>31 konnte in der Vergangenheit eine direkte Bindung an VP16 beobachtet werden (Uesugi *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1994). TFIIB hingegen bindet nur an die vollständige Aktivierungsdomäne, wobei eine direkte Interaktion von TFIIB mit der VP16-AD gezeigt werden konnte (Lin *et al.*, 1991). Die bereits bekannte Bindung von TFIIF an die VP16-AD (Zhu *et al.*, 1994) konnte bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

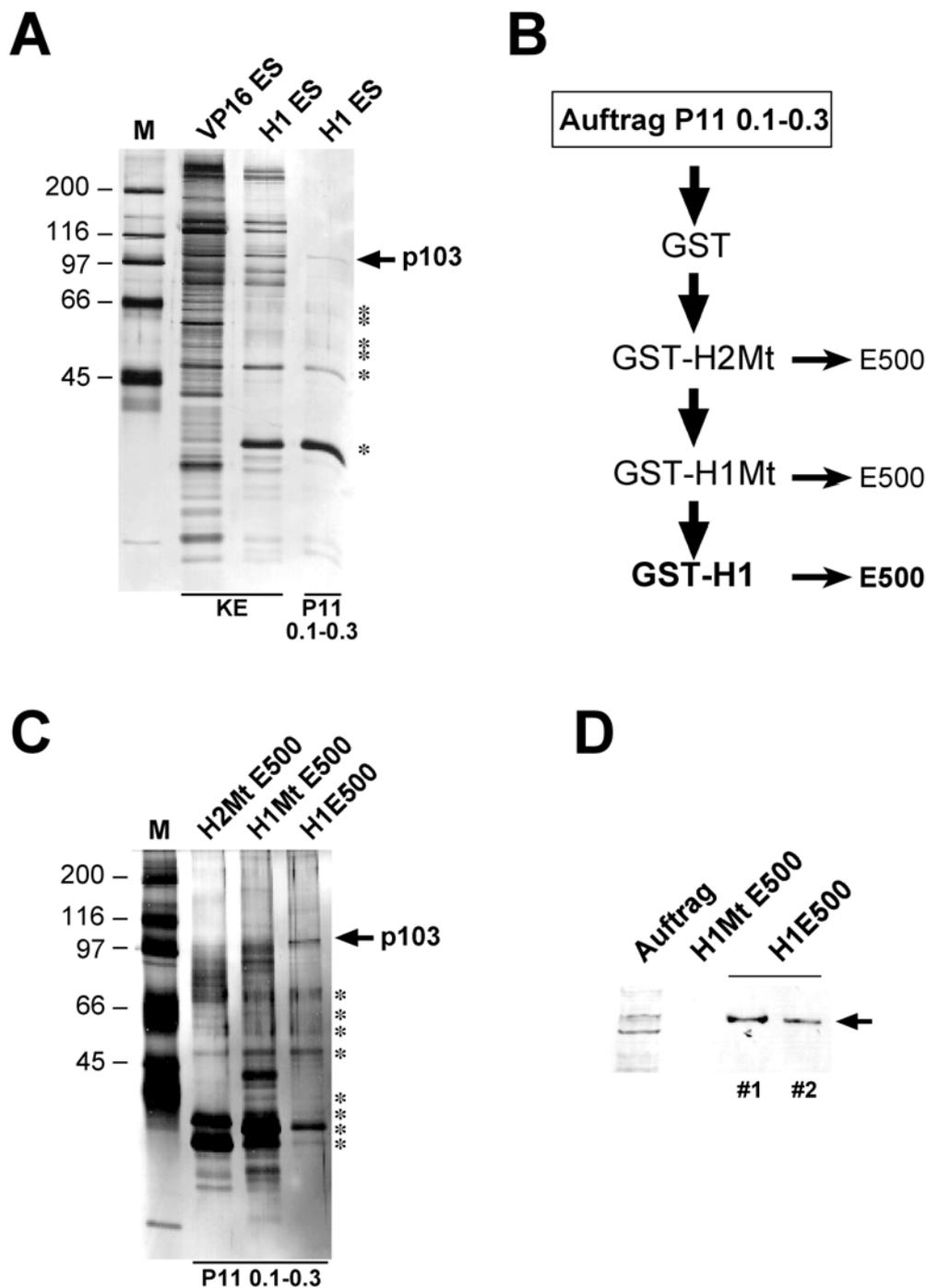
Der generelle Coaktivator PC4 (Kaiser und Meisterernst, 1996) demonstriert nur ein spezifisches Bindungsverhalten an H2, während die Bindung an H1 als unspezifisch zu betrachten ist.

Wie bereits erwähnt rekrutiert die VP16-AD hochspezifisch die beiden HATs hGcn5 und CBP/p300, währenddessen eine Bindung von Komponenten des humanen Swi/Snf-Chromatinremodellierungskomplexes als schwach und eher unspezifisch einzustufen ist. Allerdings weisen die untersuchten Untereinheiten Brg-1, BAF170 und Ini-1 ein nicht kongruentes Bindungsverhalten auf, was unter anderem daran liegen könnte, daß die humanen Swi/Snf-Komplexe (auch BAF-Komplexe genannt) durch eine extreme Heterogenität in ihrer Zusammensetzung charakterisiert sind (Übersichtsartikel: Klochender-Yeivin *et al.*, 2002). Die spezifische Wechselwirkung von Brg-1 mit H2 macht indes durchaus Sinn, da das orthologe Protein Swi2/Snf2 in der Bäckerhefe ebenfalls (und zwar direkt) an VP16:H2 bindet (Neely *et al.*, 2002). Wie in Hefe gezeigt (Ranish *et al.*, 1999; Yudkovsky *et al.*, 1999), könnte eine stabile Bindung dieser Remodellierungsmaschinen erst in einem trimeren Komplex aus Aktivator, hSwi/Snf und Promotor-DNA stattfinden, eine Situation die unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen nicht gegeben war. Bei der Rekrutierung von hSwi/Snf an Gene *in vivo* mag also ein Zusammenspiel von Aktivator und der Eigenschaft des Remodellierungskomplexes sequenzunspezifisch, aber stabil an DNA zu binden (Dallas *et al.*, 2000; Nie *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 1996; Zlatanova und van Holde, 1998), eine wichtige Rolle spielen (Liu *et al.*, 2001c).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die Transaktivierungsdomäne von VP16 mit einem ganzen „Zoo“ an Transkriptionsfaktoren *in vitro* interagieren kann, wobei eine vollständige Analyse des funktionellen Proteoms in Zukunft mit Hilfe der Massenspektrometrie gefolgt von einer „Target“-Evaluierung auf zellulärer Ebene mittels RNA<sub>i</sub>- oder „antisense“-Strategien erfolgen muß. Von großem Interesse wird es dabei sein herauszufinden, welche der Interaktoren essentiell für die *in-vivo*-Funktion der VP16-AD sind und inwieweit sich ein spezifisches Bindungsverhalten (bezogen auf die bereits besprochenen Punktmutationen in H1 und H2) in Form einer spezifischen Funktion messen läßt.

#### **4.6.2. Ein neues Protein mit Homologie zur Von-Willebrand-Faktor Typ A-Domäne bindet an VP16:H1**

Vorangegangene Arbeiten im Labor konnten zeigen, daß die direkte Interaktion von CBP/p300 mit VP16:H2 wichtig für die zelluläre Funktion von VP16 ist. Außerdem konnte herausgefunden werden, daß H2 in einem groben *in-vitro*-Transkriptionssystem in Kombination mit einem Chromatin-Reporter Acetyl-CoA abhängig funktioniert (Ikeda *et al.*, 2002). Die Subdomäne VP16:H1 hingegen ist auch ohne ein Chromatinsystem im Kontext des „groben“ Kernextraktsystems voll aktiv (siehe Abb. 26D). Darüber hinaus wurde über eine Bindung von rekombinantem TRAP80 an VP16:H2 (nicht aber an H1) berichtet (Ito *et al.*, 1999). Da bisher keine direkten Interaktoren für VP16:H1 in Säugerzellen bekannt sind, schien eine Untersuchung der H1-gebundenen Proteine interessant. Mehr durch Zufall konnte dabei ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht (SDS-PAGE) von 103 kDa identifiziert werden, das an GST-VP16:H1 (an Glutathion-Sepharose immobilisiert; vgl. Abschn. 4.6.1.) gebunden vorliegt, wenn HeLa-Kernextrakt aber auch die Phosphocellulose P11 Nidrigsalzeluat (P11 0.1-0.3) als Auftrag für die Ligandenaffinitätschromatographie (Verfahren wie in Abschn. 3. 13.6. beschrieben) eingesetzt wurden (G. Mittler und M. Meisterernst, unveröffentlicht). Das entsprechende silbergefärbte Gel ist in Abb. 31A zu sehen (gezeigt sind die Detergenseluat). Um das entsprechende Polypeptid identifizieren zu können, wurde p103 nach dem in Abb. 31B illustrierten Schema angereichert, die Fraktion auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (ein analytisches Gel befindet sich in Abb. 31C) und schließlich auf eine PVDF-Membran zur Vorbereitung der Edmann-Sequenzierung (AG Dr. F. Lottspeich, MPI für Biochemie, Martinsried) elektrotransferiert. Die Sequenzierung des N-Terminus ergab folgende Aminosäuresequenz: MVPGSEGPA. Ein Durchsuchen der NCBI-Datenbank (TBLASTN) ergab zunächst einen Cosmid-Klon (R31181, Zugriffsnummer AC006942, Chromosom 19) als Treffer, auf dem die 101 N-terminalen Aminosäuren des gesuchten Proteins zu finden waren.



**Abb. 31:** Identifizierung von p103. **(A)** Ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 103 kDa bindet an VP16:H1. Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Aufgetragen wurden die Detergenseuate (ES: HEGN100/0.2 % N-Laurylsarcosin) der Affinitätsäulen (Liganden auf Glutathion-Sepharose immobilisiert) GST-VP16 (VP16) bzw. GST-VP16:H1 (H1). Marker (M), HeLa-Kernextrakt (KE). Unspezifisch gebundenen Proteine sind mit einem Stern (\*) markiert (vgl. auch Gel in (C)). **(B)** Reinigungsschema für p103. **(C)** Analyse der Reinigung von p103 im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Aufgetragen sind die Salzeluate (HEGN500) der beiden Kontrollsäulen GST-VP16:H2Mt (H2Mt E500) und GST-VP16:H1Mt (H1Mt E500), sowie die Fraktion #1 des Salzeluats (HEGN500) von GST-VP16:H1 (H1 E500). Unspezifisch gebundene Polypeptide sind gekennzeichnet (\*). Mutante (Mt). **(D)** Western-Blot-Analyse der Reinigung (C) mittels eines gegen p103 gerichteten Kaninchen Antiserums (#DE99490). P11 0.1-0.3 (Auftrag).

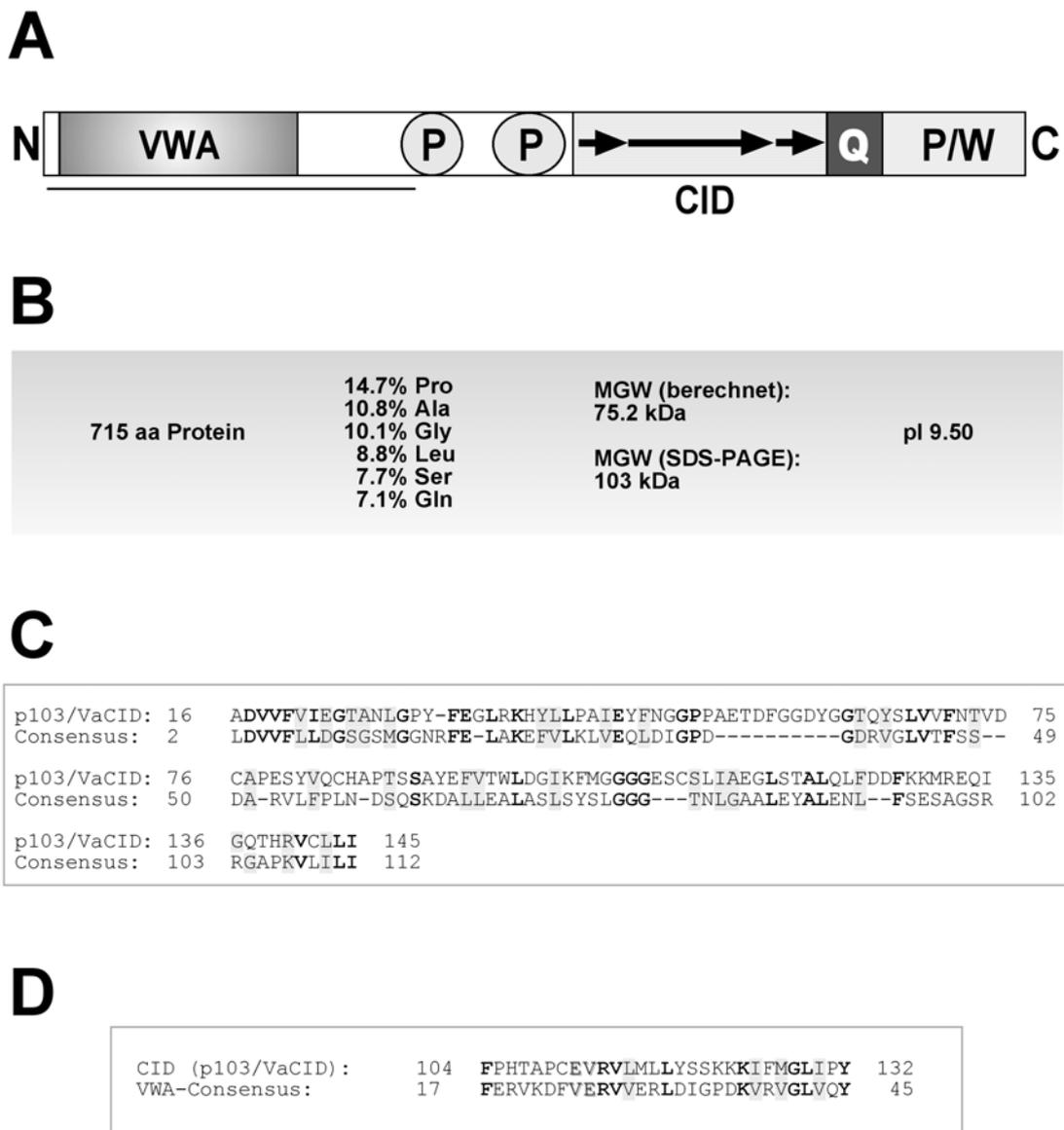
Auf der Basis der vorhergesagten Aminosäuresequenz wurde ein polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus (Abschn. 2.12., VCI/p103 #DE99490) in Kaninchen hergestellt (Eurogentec, Belgien). Das Antiserum reagierte mit p103 im Western-Blot (Abb. 31D). Es war keine Immunreaktion mit dem Salzeluat der Kontrollsäule GST-VP16:H1Mt (Mt: Mutante F442P) detektierbar, was die spezifische Interaktion von p103 mit der Subdomäne H1 der VP16-AD belegt.

Mit dem Fortschreiten des internationalen Humangenomprojekts und der Fertigstellung der Arbeitsversion des menschlichen Genoms (McPherson *et al.*, 2001; Olivier *et al.*, 2001) war es schließlich möglich, das für p103 codierende Gen auf Chromosom 19q13.3 zu lokalisieren (Cosmidklone R31181/ Zugriffs-nummer AC006942 und F23669/Zugriffsnummer AC018766; NCBI-Datenbank). Es handelt sich dabei um das theoretisch vorhergesagte Protein TCBAP0758 (NCBI-Zugangsnummer NP\_112235), das identisch zu einer im Rahmen des deutschen Humangenomprojekts (Wiemann *et al.*, 2001) klonierten cDNA-Sequenz (mRNA aus Testis, Klon DKFZp434K0512; NCBI-Zugriffsnummer AL136746) ist. Die cDNA codiert für ein Polypeptid mit einem berechneten Molekulargewicht von 75.2 kDa (siehe Anhang Abschn. 8.7.). Die Diskrepanz zum apparenten Molekulargewicht von 103 kDa in der SDS-PAGE kann bislang nicht erklärt werden. Während der ermittelte N-Terminus von p103 aufgrund der Edmann-Sequenzierung als gesichert zu betrachten ist, konnte der C-Terminus bzw. das 3'-Ende der cDNA bislang nur durch Bioinformatik (Vorhersage der Exons und eines Polyadenylierungssignals) nicht aber experimentell (z.B. durch 3'RACE-PCR) bestätigt werden (Ulf Schaberg, Diplomarbeit).

Das korrespondierende orthologe Protein aus der Maus mTCBAP0758 konnte ebenfalls in der NCBI-Datenbank (Zugangsnummer AAH21333) gefunden werden. Ein entsprechender cDNA-Klon (mRNA aus Niere, Klonnummer IMAGp998F046318Q2; NCBI-Zugriffsnummer AW611009) konnte vom IMAGE-Konsortium bezogen werden, und diente als Matrize für die PCR-Klonierung der Nukleotide 1-870 (aa 1-290) der murinen p103-cDNA mittels der Primer mMp103ATG-EcoRI und mMp103-930-XbaI (Abschn. 2.7.). Das Amplicon wurde über die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstellen in den Vektor pBluescript II KS+ (Stratagene) kloniert. Ein durch Restriktion mit *EcoRI* und *NotI* erhaltenes Fragment wurde schließlich in den ebenso restringierten Vektor pGSTpar3 (Sheffield *et al.*, 1999) kloniert. Dieses Konstrukt fungierte als Expressionsplasmid zur Reinigung des GST-Fusionsproteins (Abschn. 3.13.5.7.) GST-Mp103(1-290) aus *E. coli.*, welches zur Immunisierung von Ratten und der nachfolgenden Herstellung eines monoklonalen Antikörpers (Abschn. 3.14.3.) gegen p103 verwendet wurde. Da die Aminosäuresequenz des humanen und murinen p103 in diesem Bereich nahezu identisch ist (vgl. Abb. 33), konnte erwartet werden, daß der entsprechende Antikörper auch das menschliche Protein detektiert.

Ein Monoklon (Name: VCI 9C2), der mit p103 bzw. dem Fusionsprotein GST-Mp103(1-290) sowohl im ELISA als auch im Western-Blot eine Immunreaktion zeigte, konnte selektiert werden (Daten nicht gezeigt und Abb. 34A).

Eine komplette Analyse der Aminosäuresequenz von p103 mit Computervorhersage-Algorithmen ergab mehrere interessanter Ergebnisse. Im N-terminalen Bereich des Proteins (aa 16-145) konnte eine signifikante Homologie zur Von-Willebrand-Faktor-Typ A (VWA)-Domäne (NCBI CD-Eintrag: smart00327) festgestellt werden (Abb. 32). Der Von-Willebrand-Faktor (VWF) ist ein großes extrazelluläres Glykoprotein mit der Fähigkeit zu Multimerisieren und erfüllt zwei essentielle Funktionen in der Hämostase des Blutes. Zum einen vermittelt er die Adhäsion von Blutplättchen an das subendotheliale Bindegewebe, zum anderen bindet er den Blutgerinnungsfaktor VIII, welcher in Abwesenheit vom VWF extrem schnell aus dem Blut entfernt wird, was VWF zu einem wichtigen Protein der Blutgerinnungskaskade macht (Übersichtsartikel: Sadler, 1998). Der VWF besitzt selbst drei VWA-Domänen (A1-A3), wobei die Kristallstrukturen von A1 und A3 bereits gelöst werden konnten (Emsley *et al.*, 1998; Huizinga *et al.*, 1997), wohingegen von A2 nur ein Modell existiert (Jenkins *et al.*, 1998). Die VWA-Domäne besteht im Prinzip aus einem klassischen Rossmann-Faltungsmotiv, mit einer  $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\alpha 3\beta 4\alpha 4\beta 5\alpha 5\alpha 6\alpha 7\beta 6\alpha 8$  ( $\alpha$ :  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ :  $\beta$ -Faltblatt) Sekundärstruktur, wie man sie beispielsweise ähnlich in der GTPase Ras findet (Edwards und Perkins, 1995; Edwards und Perkins, 1996). Zahlreiche Proteine besitzen die VWA-Domäne, darunter die Komplementfaktoren B, C2, CR3, CR4, Collagene (Typ VI, VII, XII, XIV), die alpha-Kette von Integrinen (I-Domäne), die humane DNA-Helikase Ku80, *C. elegans* Unc-36 (Ionenkanal), humanes VPARP (eine Poly-(ADP-ribose)-Polymerase), eine Ser-/Thr-Kinase (PpkA) aus *Pseudomonas aeruginosa*, ein hypothetisches Protein (NCBI Zugriffsnummer T41581) aus *S. pombe*, eine Magnesium-Chelatase-Untereinheit (ChII) aus *Methanothermobacter thermoautotrophicus* und ein „copine-like“ Protein (AAK63871) aus *A. thaliana*. Dies zeigt, daß die VWA-Domäne erstens nicht auf extrazelluläre Proteine beschränkt ist und zweitens in Archaeen, Eubakterien, Pflanzen und niederen sowie höheren Eukaryonten vorkommt. Bemerkenswerterweise besitzt auch die p44 Untereinheit von TFIIH und der Anthrax-Toxin-Rezeptor (ATR; Bradley *et al.*, 2001) eine VWA-Domäne. Im Falle von ATR bindet das protektive Antigen (PA) von *B. anthracis* direkt an die VWA-Domäne. Es ist deshalb stark anzunehmen, daß es sich bei der VWA-Domäne um ein Protein-Protein-Interaktions-Modul handelt, nicht zuletzt auch deswegen, weil für die A1-Domäne des VWF eine direkte Bindung an das Glykoprotein GPIIb $\alpha$  bekannt ist, und für dessen A3-Domäne über eine direkte Interaktion mit Collagenen berichtet wurde (Sadler, 1998).



**Abb. 32:** Primärstruktur von p103/VaCID: „*VP16 associated protein with conserved interesting domain*“. (A) Domänen und Sequenzmotive aus Computervorhersagen. Am N-Terminus des Proteins findet sich eine längere Sequenz (aa 16-145), die homolog zur VWA-Domäne (siehe auch C) des Von-Willebrand-Faktors (siehe Text) ist. Von aa 237-275 sowie aa 301-387 erstrecken sich zwei prolinreiche Regionen (P). Weitere *in-silico*-Analysen belegen die Existenz einer evolutionär konservierten, bisher nicht beschriebenen bzw. charakterisierten Domäne, die vorläufig CID („*conserved interesting domain*“) genannt wurde (aa 397-541). Die Pfeile symbolisieren (potentielle) Sequenzwiederholungen innerhalb der CID-Domäne (kleine Pfeile) bzw. zwischen CID-Domänen (großer Pfeil; bei Proteinen mit zwei CID-Domänen). Der CID-Domäne schließt sich ein kurzer Q-reicher Sequenzabschnitt (Q) an (aa 546-563), dem eine prolin- und tryptophanreiche Region (P/W) am C-Terminus des Proteins folgt. Der N-terminale Abschnitt (aa 1-290), der zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers VCI 9C2 als GST-Fusion in *E. coli* exprimiert wurde, ist mit einem Balken unterlegt. (B) Physikochemische Parameter von p103/VaCID. pI: Isoelektrischer Punkt, MGW: Molekulargewicht. (C) Sequenzhomologie zwischen dem Aminoterminus von p103/VaCID und der VWA-Domäne (siehe Text). Dargestellt ist eine hypothetische VWA-Consensussequenz. Identische Aminosäuren sind fettgedruckt. Konservative Austausche von Aminosäureresten sind grau hinterlegt. (D) Sequenzhomologie zwischen der VWA- und der CID-Domäne. Darstellung wie in (C).

Die typische VWA-Domäne hat eine durchschnittliche Länge von etwa 180 Aminosäuren (Jenkins *et al.*, 1998), von denen allerdings nur die ersten 112 Aminosäurereste (62 %) in p103 konserviert sind (Abb. 32C).

Eine Kernlokalisationssequenz konnte nicht vorhergesagt werden. Das Programm PSORT (W2H-Husar), welches die Aminosäurezusammensetzung mit bekannten Proteinen vergleicht (Bickmore und Sutherland, 2002), prognostiziert mit einer Wahrscheinlichkeit von 74 %, daß es sich bei p103 um ein Kernprotein handeln muß. Der hohe Anteil der Aminocarbonsäure Prolin (Abb. 32B) spiegelt sich im Auftreten von drei prolinreichen Regionen wieder (Abb. 32A).

Weitere *in-silico*-Analysen führten zu einem überraschenden Ergebnis, denn es konnte eine Domäne in p103 identifiziert werden (aa 397-541), deren Aminosäuresequenz nahezu identisch zu einem zunächst theoretisch vorhergesagten Protein, das später als PTOV1 (*protstate tumor overexpressed 1*) publiziert wurde (Benedit *et al.*, 2001), und dessen Gen ca. 14 kb stromabwärts vom 3'-terminalen Exon des p103-Gens auf Chromosom 19q13.3-13.4 lokalisiert ist. Diese Domäne unbekannter Funktion wurde CID („*conserved interesting domain*“) genannt, weswegen p103 nachfolgend auch mit VaCID für „*VP16 associated protein with conserved interesting domain*“ (Diplomarbeit, Ulf Schaberg) bezeichnet wird. Das Protein PTOV1 besteht im wesentlichen aus zwei CID-Domänen, so daß ihm weitere Homologiebeziehungen – wie z.B. eine VWA-Domäne – zu p103/VaCID fehlen. Bemerkenswerterweise besitzt die CID-Domäne einen sehr kurzen Sequenzabschnitt mit Homologie zur Consensussequenz der VWA-Domäne (Abb. 32D). Man muß allerdings abwarten, ob dies eine funktionelle Bedeutung hat oder zufälliger Natur ist.

Im Gegensatz zur VWA- tritt die CID-Domäne in der Evolution erst bei höheren multizellulären Organismen in Erscheinung. Es konnten Proteine mit einer CID-Domäne in der Taufliede, der Maus, der Ratte, im Rind, im Krallenfrosch und im Kugelfisch durch Datenbanksuche identifiziert werden (diese Studien und Diplomarbeit, Ulf Schaberg). Das Durchsuchen der genomischen Datenbanken von *C. elegans* und *S. cerevisiae* ergab keine signifikanten Treffer. Aufgrund fehlender funktioneller Daten bleibt die biologische Rolle, welche die CID-Domäne spielt, fürs erste unbekannt. Weiterführende Studien sollten in Zukunft aber die Funktion dieser in höheren Metazoen hochkonservierten Domäne im Kontext von Zellen bzw. von Modellorganismen aufklären können.

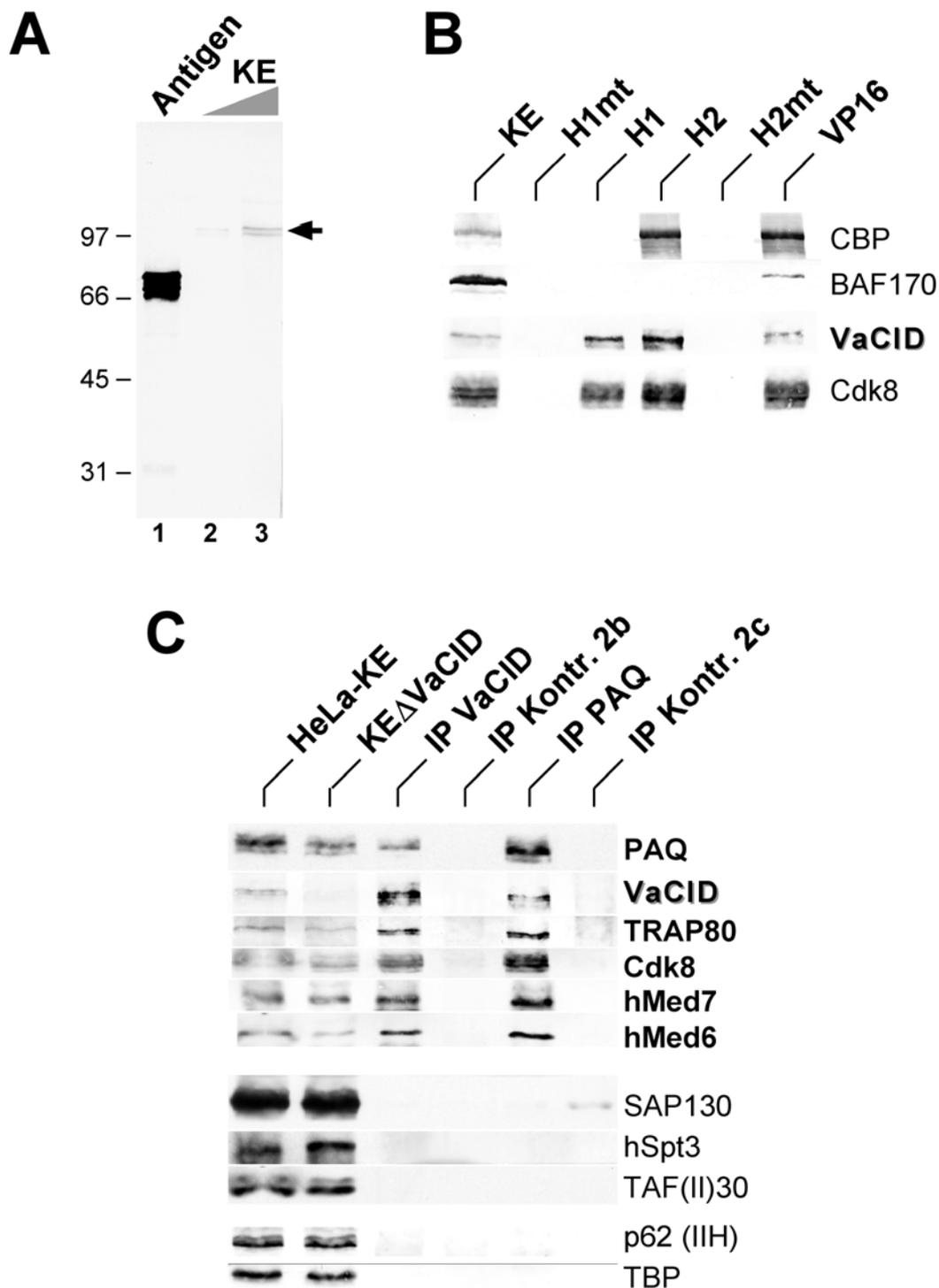
Zur Vervollständigung der Computeranalysen wurde schließlich noch ein „*Multiple Alignment*“ mit den p103/VaCID-homologen Proteinen durchgeführt. Zum Auffinden der Orthologen wurde der spezielle BLAST-Algorithmus der Arbeitsgruppe Bork (EMBL, Heidelberg) und das Programm PSI-BLAST eingesetzt (Abschn. 3.19.). Zur Generierung eines „*Multiple Alignments*“ wurde das Programm ClustalW im Programmpaket W2H-Husar (Abschn. 3.19.1.3.) verwendet. Das Resultat ist in Abb. 33 dargestellt. Man kann erkennen, daß insbesondere die VWA-Domäne inklusive dem Linker zwischen VWA und der ersten prolinreichen Region (siehe Abb. 33) stark konserviert ist.

	1								50
VaCID_drome	~MEVDQIP..	....LADVVF	VIEGSAINGA	YINELKTNYP	LPTLEHFTTG				
VaCID_human	MVPGSEGP	AGSVVADVVF	VIEGTANLGP	YFEGLRKHYL	LPAIEYFNGG				
VaCID_murine	MVPGSEGP	AGGLVADVVF	VIEGTANLGP	YFEE LRKHYL	LPAIEYFNGG				
VaCID_xlaevis	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~				
	51								100
VaCID_drome	SIDEREYLIA	ERFATLYGIV	VYRTAANLLE	PVCSTYGFEL	QPQKVMETIE				
VaCID_human	PPAET.DFGG	DYGGTQYSLV	VFNTVDCAPE	SYVQCHAPTS	SAYEFVTWLD				
VaCID_murine	PPAET.DFGG	DYGGTQYSLV	VFNTVDCAPE	SYVQCHAPTS	SAYEFVTWLD				
VaCID_xlaevis	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~				
	101								150
VaCID_drome	RLPLVGGGME	SCAHMAEGFA	AAHGCFDDIS	ERFQLLDQTS	VORHCILICN				
VaCID_human	GIKFMGGGGE	SCSLIAEGLS	TALQLFDDFK	KMFEQIGQT.	.HRVCLLICN				
VaCID_murine	GIKFMGGGGE	SCSLIAEGLS	TALQLFDDFK	KMFEQIGQT.	.HRVCLLICN				
VaCID_xlaevis	~~~~~	~TRLIAEGLS	TALQLFDDFK	KMFEQIGQT.	.HKVCILICN				
	151								200
VaCID_drome	SPPYQMPETE	SWKYPGKSCF	QLAALFNERK	INLSIIAPRK	MFVLFKLFMK				
VaCID_human	SPPYLLPAVE	STTYSGCTTE	NLVQKIGERG	IHFSIVSPRK	LPALRLLFEX				
VaCID_murine	SPPYLLPAVE	STTYSGCTTE	SLVQKIGERG	IHFSIVSPRK	LPALRLLFEX				
VaCID_xlaevis	SPPYLLPAVE	STTYSGYTTE	NLVQKIGERG	IHFSIISPRK	LPALRTLFEX				
	201								250
VaCID_drome	ADGDQPIT..	..SKNYAKNI	RHLVLLKGYG	LKERAPSPNS	MAAQMAAPNA				
VaCID_human	AAPPALLEPL	QPFTDVSQDP	RHMVIVRGLV	LPVGGG....	.....				
VaCID_murine	AAPPALLEPL	QPADVSQDP	RHMVIVRGLV	LPVGGG....	.....				
VaCID_xlaevis	AMPVGMIE..	QPEKDYSDPE	RHMIVRGMID	LPVVGAT...	.....				
	251								300
VaCID_drome	AQATVQQQQQ	QQQNQAGQQQ	QGQGMPMDDT	EAQQQQQQQQ	QQQQQQQQGN				
VaCID_human	.....	...SALGPLQ	SKCPVPLPPA	APSG.....	...ATLSAA				
VaCID_murine	.....	...STSGSLQ	TKCAVPLPPA	EASA.....	...ATLSAA				
VaCID_xlaevis	.....	...SVPGVIP	LKCPVFQETL	EVIP.....	...SQIANA				
	301								350
VaCID_drome	PQQQVMNMNT	MQQQQEGENP	EAGLINPQQQ	QQLLQQQQQN	QFVSNQMNQ				
VaCID_human	PQQ.....	...PLE.FVP	EQQVQVPG..N	LSAAQVAAQN	AVEAAKNQKA				
VaCID_murine	PPQ.....	...ALE.FVP	EQQVQVPG..N	LSAAQVAAQN	AVEAAKSOKA				
VaCID_xlaevis	PLH.....	...QLE.FVQ	EPYMVFPQNT	LTPAHAAAHS	AVEAAKN...				
	351								400
VaCID_drome	NFQQNVGPGQ	NRWMPNQP	QARPPFMQGA	GNVGGVGGG	GMQQNPNSAL				
VaCID_human	GLGPRFSPIT	P...LQQAAP	GVGPPFSQAP	APQLPPGPPG	...APK...				
VaCID_murine	GLGPRFSPIN	P...LQQAAP	GVGPPFSQAP	APPLAPVPPG	...APK...				
VaCID_xlaevis	.....HNTN	...LPNSAR	GRVLMILYSS	KKKLFMG...	.....				
	401								450
VaCID_drome	ISRINAPPEN	QTVTSLQQQQ	QQQAQQQQQQ	QQQAQQQQQQ	RMQMLSQQQM				
VaCID_human	.....PPBA	.....	.....	.....	...SPPSL				
VaCID_murine	.....PPBA	.....	.....	.....	...SPPSL				
VaCID_xlaevis	.....LIEN	.....	.....	.....	...DSSGF				
	451								500
VaCID_drome	LNHQQLQQQQ	QLAQQQQQQ	QGQQQQQVNP	NAGNNMMPAS	NAGNMSNPQQ				
VaCID_human	VSTVAPG..S	GLAPTACPGA	PSMAGT....	.....V	APGVSGPSP				
VaCID_murine	VSTVAPG..P	VLAAPACPGA	PSLAGT....	.....V	TPGVNGESA				
VaCID_xlaevis	VNGIR....Q	VITNHKQVQM	QKIDQQ....	.....R	NMGAQVGA				



Das selbe gilt auch für die CID-Domäne, wohingegen der C-terminale Bereich von p103/VaCID zwischen den einzelnen Spezies deutlicher variiert. Dies könnte bedeuten, daß die beiden Domänen strukturiert vorliegen, was auch mit Sekundärstrukturvorhersagen für p103/VaCID übereinstimmen würde (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes sollte das Bindungsverhalten von p103/VaCID an die VP16-AD mit Hilfe des neu generierten monoklonalen Ratten anti-VaCID-Antikörpers (VCI 9C2) untersucht werden. Vorgegangen wurde, wie im vorhergehenden Abschnitt dargelegt. Das Ergebnis war wiederum überraschend, denn p103/VaCID war sowohl im Eluat der H1-Affinitätssäule als auch im Eluat der H2-Affinitätssäule im Immunblot detektierbar (Abb. 34B), nicht aber in den Eluaten der Kontrollsäulen (GST-H1Mt & GST-H2Mt). Dies war auf den ersten Blick insofern verwunderlich, da bei der präparativen Reinigung von p103/VaCID kein zusätzliches Protein aus dem Auftrag (P11 0.1-0.3), an die VP16:H1-Säule gebunden war (siehe Abb. 31), was für eine direkte Interaktion von p103/VaCID mit der H1-Domäne der VP16-AD spricht. Dies bedeutet, daß das Protein möglicherweise auch direkt an VP16:H2 binden kann, oder aber Teil eines Proteinkomplexes ist, welcher von beiden Subregionen der VP16-Transaktivierungsdomäne rekrutiert wird. Vergleicht man das Bindungsverhalten von p103/VaCID an VP16 mit dem anderer Proteine, so fällt auf, daß es exakt identisch zu dem von humanen Mediatoruntereinheiten ist (Abb. 30). Deshalb sollte untersucht werden, ob p103/VaCID in Kernextrakten humaner Tumorzellen mit Mediatoren assoziiert vorliegen kann. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Immunreinigung von humanem Mediator mit einem anti-PAQ-Antikörper (Klon 6C9), wie in Abschn. 4.4. beschreiben, durchgeführt. Als Positivkontrolle kam die Immunaффinitätschromatographie mit dem in dieser Arbeit hergestellten monoklonalen anti-VaCID-Antikörper (Klon VCI9C2) zum Einsatz. Zur Spezifitätskontrolle wurden Kontroll-Antikörpersäulen mit Immunglobulinen des gleichen Isotyps benutzt. Ein extensives Waschen der Säulen erfolgte mit IP-Puffer (150 mM KCl). Anschließend konnten die spezifisch gebundenen Polypeptide im Immunblot analysiert werden (Abb. 34C). Die PAQ-Antikörpersäule hatte, wie beschrieben (Abschn. 4.5.1.), einen Mediatorkomplex gebunden, der nicht nur – wie erwartet (Mittler *et al.*, 2001) – TRAP80, hMed7, Cdk8 und hMed6 enthält, sondern auch p103/VaCID. Zudem war es möglich an der anti-VaCID-Immunaффinitätssäule die stabile Bindung der gerade erwähnten Mediatoruntereinheiten nachzuweisen (Abb. 34C). Das Protein VaCID zeigte weder eine Interaktion mit den Komponenten des TFIC-Komplexes SAP130, hSpt3 und TAF<sub>II</sub>30, noch mit den generellen Transkriptionsfaktoren TFIID (TBP) bzw. TFIIF (p62). Wie für Mediator beschrieben (Gu *et al.*, 1999) konnte eine substöchiometrische Assoziation von RNA-Polymerase II detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Damit war eindeutig gezeigt, daß VaCID mit humanem Mediator assoziiert vorliegen kann, was die Präsenz des Proteins sowohl im Eluat einer H1- als auch einer H2-Säule erklärt.



**Abb. 34:** p103/VaCID ist mit humanem Mediator assoziiert. (A) Der monoklonale Ratte anti-VaCID-Antikörper (VCI 9C2) erkennt spezifisch ein Polypeptid bei 103 kDa in einem HeLa-Kernextrakt (KE). Aufgetragen sind in Spur 1 200 ng Antigen (GST-Mp103(1-310)) sowie 10 µg (Spur2) bzw. 40 µg (Spur 3) HeLa-Kernextrakt. (B) VaCID weist ein spezifisches Bindungsverhalten an beide Subdomänen der VP16-AD auf. (C) Western-Blot-Analyse der Interaktion von VaCID mit humanem Mediator. Aufgetragen sind Kernextrakt (KE), der Durchbruch der  $\alpha$ -VaCID-Immunaффinitätssäule ( $KE\Delta VaCID$ ), das Eluat der  $\alpha$ -VaCID-Immunaффinitätssäule (IP VaCID), das Eluat der Kontrollsäule für  $\alpha$ -VaCID (IP Kontr. 2b; Isotyp IgG2b), das Eluat der  $\alpha$ -PAQ-Immunaффinitätssäule (IP PAQ) und das Eluat der Kontrollsäule für  $\alpha$ -PAQ (IP Kontr. 2c; Isotyp IgG2c).

---

Das substöchiometrische Erscheinen im Eluat der  $\alpha$ -PAQ-Immunaффinitätssäule deutet daraufhin, daß es sich bei p103/VaCID unter Umständen um ein Protein handelt, das nur eine Komponente eines bestimmten Teils humaner Mediator Komplexe ist. Alternativ könnten der  $\alpha$ -VaCID- bzw. der  $\alpha$ -PAQ-Antikörper wechselseitig mit der Bindung von VaCID respektive PAQ an humane Mediatoren interferieren. Die Tatsache, daß p103/VaCID offensichtlich in „freier Form“ in den Niedrigsalzfraktionen einer Phosphocellulose-Chromatographie eluiert (Abb. 31 und Daten nicht gezeigt), läßt es naheliegend erscheinen, daß die Interaktion mit Mediatoren dynamischer Natur sein könnte.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist es allerdings offen, ob p103/VaCID auch direkt mit VP16:H2 interagiert, und inwieweit der neuartige Transkriptionsfaktor für die Transaktivierungsfunktion von VP16 essentiell ist, oder ob Mediatoren auch ohne p103/VaCID an VP16 binden können. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden. Die gezeigten Daten bilden aber eine fundierte Basis für weitergehende Studien.

## 5. Diskussion

---

### 5.1. PAQ: eine neue Untereinheit humaner Mediatoren

Die Transkription proteincodierender Gene zu prä-mRNA in menschlichen Zellen ist durch eine nicht zu übertreffende Fülle an Cofaktoren charakterisiert, welche die enzymatische Aktivität von RNA-Polymerase II, dem für die Transkription von Klasse II-Genen verantwortlichen Proteinkomplex, regulieren. Eine wichtige Klasse von Cofaktoren stellen humane Mediatoren dar. Diese wurden, ähnlich zu ihrem Pendant in der Hefe *S. cerevisiae* (Myers und Kornberg, 2000), als zentrale Spieler im Prozess der Übermittlung regulatorischer Signale von Transkriptionsaktivatoren auf die prä-mRNA-Synthesemaschine, als klassische Coaktivatoren (Kaiser und Meisterernst, 1996) beschrieben (Lemon und Tjian, 2000; Malik und Roeder, 2000). Humane Mediatorkomplexe sind in ihrer Zusammensetzung zum Teil sehr heterogener Natur, besitzen jedoch eine Vielzahl gemeinsamer Untereinheiten (Malik *et al.*, 2000; Mittler *et al.*, 2001; Taatjes *et al.*, 2002).

Der Versuch Polypeptide zu identifizieren, die mit der Coaktivatorfunktion des positiven Cofaktors 2 (PC2) in Säulenfraktionen coeludieren, führte in dieser Arbeit schließlich zur Reinigung von PAQ (*PC2* assoziiertes *Q*-reiches Protein) und Klonierung der entsprechenden cDNA (Berti *et al.*, 2001). Basis dafür war die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors an eine Motivantikörper-Immunitätssäule (anti-Polyglutaminantikörper; Abschn. 4.2.2.), und die funktionelle Coelution von PAQ mit der PC2-Aktivität an einer GST-VP16-Säule (Abschn. 4.2.3.). PAQ konnte als neue, noch unbekannte, aber konstitutive Untereinheit humaner Mediatoren beschrieben werden (Mittler *et al.*, 2001), und weist Homologiebeziehungen zum Hefeprotein Gal11 (eine Mediatorkomponente) auf (Abschn. 4.4.2.). Damit war auch eine logische Verbindung zur PC2-Aktivität hergestellt worden, da gezeigt werden konnte, daß diese ursächlich an die Anwesenheit von humanen Mediatorproteinen geknüpft ist. Eine genaue Zusammensetzung des PC2-Mediatorkomplexes wurde von Malik *et al.* (2000) vorgeschlagen (Abschn. 8.6.), basierte aber auf einem hochgereinigten Mediatorkomplex, der *per se* keine Funktion in einem rekonstituierten *in-vitro*-Transkriptionssystem aufwies.

Das Protein selbst zeichnet sich durch einige charakteristische Eigenschaften aus. Zum einen besteht es zu einem fünftel aus Glutamin (Q)- und zu einem zehntel aus Prolinresten, was sich im Auftreten von vier prolinreichen Regionen und einer Domäne mit homopolymeren Sequenzabfolgen der Aminosäure Glutamin äußert (Abb. 18). Zum anderen scheint es jedenfalls zum Teil von der Bäckerhefe bis zum Menschen evolutionär konserviert zu sein. Dies ist insbesondere am N-Terminus von PAQ der Fall, was dafür spricht, daß dieser Sequenzabschnitt eine wichtige zelluläre Funktion ausüben muß. In der Tat enthält der aminoterminal Bereich ein Sequenzmotiv mit Homologie zur sogenannten KIX-Domäne von

CBP/p300, einer Interaktionsregion mit Aktivierungsdomänen von Transkriptionsfaktoren (Abschn. 4.3.2.). Mittels Vergleich der Primärsequenz bekannter KIX-Bindungspartner (c-Myb, CREB, SREBP1a, SREBP2 und *Cubitus interruptus*) und durch Phagendisplay konnte ein minimaler Consensus für die KIX-Interaktion ( $\Phi XX\Phi\Phi XX\Phi$ ; wobei  $\Phi$  eine hydrophobe Aminosäure sein muß) definiert werden (Frangioni *et al.*, 2000). Essentielle Aminosäuren in KIX für die Interaktion mit Liganden sind Y651, L653, L654, I658 und Q662. Diese sind teilweise in PAQ mehr (identisch) oder weniger (konservativer Austausch) stark konserviert, was möglicherweise auf eine veränderte Bindungsspezifität bezüglich von Aktivierungsdomänen hinweisen kann. Allerdings soll auch das PAQ-homologe Protein TIG-1 (Abraham und Solomon, 2000), welches sehr wahrscheinlich eine alternativ gespleißte Isoform von PAQ darstellt (siehe Abb. 21), direkt an SREBP1a binden (A. Näär, persönl. Mitteilung).

Wie bereits erwähnt, ist das Vorhandensein einer Poly(Q)-Region ein Charakteristikum von humanem und murinem PAQ. Obwohl auch das *S. cerevisiae* Protein Gal11 einen entsprechenden glutaminreichen Abschnitt aufweist, ist die Poly(Q)-Region im Vergleich zu den orthologen Proteinen aus *C. elegans* bzw. *D. melanogaster* nicht konserviert (Abb. 21). Dies kann entweder bedeuten, daß die Domäne mit den homopolymeren Glutaminwiederholungen für die generelle Mediatorfunktion im Fadenwurm bzw. in der Tauflye nicht wichtig ist, oder aber, daß andere noch nicht identifizierte Mediatorproteine in diesen Spezies, eine funktionell redundante Poly(Q)-Region besitzen. Im Gegensatz zu PAQ ist beim Drosophila-Orthologen von TRAP230 die glutaminreiche Region konserviert, wohingegen sie im orthologen Protein in Hefe (Srb8) fehlt. Statt dessen besitzt das Hefeprotein Med3 (neben Gal11) eine weitere Q-reiche Region. Obwohl in vielen Proteinen und auch besonders in Transkriptionsfaktoren (CBP, TBP, Brahma, Androgen-Rezeptor und Brn-2) vorhanden (Perutz, 1996), ist eine wirkliche Funktion dieses Motivs bisher nicht bekannt. Computeranalysen von Organismen mit bereits vollständig sequenzierten Genomen zeigen einerseits die Abwesenheit von homopolymeren Glutaminwiederholungen in thermophilen Organismen (Archaea und Eubakterien), andererseits ein massives Auftreten dieses Motivs in höheren Eukaryonten (Michelitsch und Weissman, 2000). Dies ist in Übereinstimmung mit der Tendenz von Polyglutaminwiederholungen *in vitro* und *in vivo* Aggregate auszubilden – was bei höheren Temperaturen natürlich beschleunigt wird (Kazantsev *et al.*, 2002; Masino *et al.*, 2002) – insbesondere wenn die Länge des Homopolymers die Zahl von 37 überschreitet (Perutz, 1999). Ist einmal die Bildung eines Aggregationskeims in Gang gekommen, ist die Länge des Poly(Q)-Abschnitts für die Einlagerung in das unlösliche Aggregat nicht mehr entscheidend (Kazantsev *et al.*, 1999), ein Vorgang, der sehr wahrscheinlich mit der Pathologie von Polyglutamin- bzw. CAG „repeat“-Krankheiten ursächlich zu tun hat (Übersichtartikel: Perutz, 1996).

Ein Paradebeispiel dafür ist der *Morbus Huntington* (Übersichtsartikel: Rubinsztein, 2002), eine autosomal-dominante Erbkrankheit, bei der durch eine Expansion von CAG Trinukleotidwiederholungen im Huntingtongen ein Polypeptid (Huntingtin: Htt) mit einer Länge von Polyglutaminwiederholungen im Bereich von  $n=37$  bis 70 generiert wird. Dies führt zu pathologischen Symptomen, wie Verlust der Bewegungskoordination, Demenz und psychiatrischer Auffälligkeit (Wesensveränderung), ein Krankheitsbild, das im deutschen Sprachraum auch als „Veitstanz“ bezeichnet wird. Der Krankheitsverlauf ist mit einem massiven Verlust an Neuronen im Gehirn verbunden, die sehr wahrscheinlich aufgrund der sich bildenden (im Lichtmikroskop sichtbaren) Proteinaggregate im Kern dieser Zellen zum Untergang verurteilt sind (Perutz und Windle, 2001). Huntingtin ist ein sehr großes Protein (350 aa), das proteolytisch in ein kurzes N-terminales und ein C-terminales Polypeptid gespalten werden kann. Die wirkliche biologische Funktion von Htt ist unbekannt, allerdings ist es ein essentielles Protein für die Embryonalentwicklung in der Maus. Htt und insbesondere seine proteolytischen Fragmente sind neben einer Lokalisation im Cytoplasma auch im Zellkern vorhanden, wo sie diffus lokalisiert, aber etwas angereichert in PML-Körpern, Nucleoli und anderen „*nuclear speckles*“ detektierbar sind (Kegel *et al.*, 2002). Für Htt wurde unter anderem eine Funktion in der Transkription vorgeschlagen, da es die Corepressoren CtBP, N-CoR und mSin3a, sowie den Aktivator p53 bindet. Diese Interaktionen werden durch die CAG-Expansion im Htt-Gen geschwächt, während parallel dazu die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, die Polyglutamin-Regionen besitzen, stark zunimmt. Insbesondere Gene mit CREs („*cAMP responsive elements*“), welche in Neuronen durch den cAMP-Signalweg reguliert werden (Somatostatin-, Proenkephalin- und Substanz P-Gen), scheinen davon betroffen zu sein. Eine direkte Interferenz mit der Funktion des Aktivators CREB („*CRE binding protein*“) konnte mehrfach gezeigt werden. Mutiertes Htt bindet unter anderem TAF<sub>II</sub>130, TBP und CBP/p300, was zum Auftreten dieser Transkriptionsfaktoren in den nukleären Aggregaten führt (McCampbell *et al.*, 2000; Shimohata *et al.*, 2000; Steffan *et al.*, 2000). Es wäre in Zukunft interessant herauszufinden, inwieweit humane Mediatoren auch in diesen Proteinaggregaten zu finden sind. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde über eine Reduktion der HttMt-induzierten Aggregatbildung in Zellen mittels Einsatz von Histondeacetylaseinhibitoren berichtet (McCampbell *et al.*, 2001). Kürzlich konnte auch eine Interferenz mit der Transaktivierung durch Sp1 (die auch TAF<sub>II</sub>130 als Cofaktor benötigt) gezeigt werden (Li *et al.*, 2002). Eine Deregulation der Transkription durch artifizielle Expression von Polyglutamin ( $n=75$ ) konnte zudem in Hefe beobachtet werden. Dabei zeigte die Änderung des Genexpressionsprofils starke Ähnlichkeit zu Effekten, die durch die Deletion von essentiellen Komponenten des SAGA-Komplexes (z.B. Spt3) induziert werden (Hughes *et al.*, 2001). Eine Kombination aus einer Spt3-Deletion und der Expression von Polyglutamin demonstrierte dabei einen starken Synergismus, der durch Histondeacetylaseinhibitoren revertiert werden konnte.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, daß zwischen dem PAQ-Orthologen Gal11 und SAGA in Hefe genetische Interaktionen existieren (Roberts und Winston, 1997). Könnte es also vielleicht eine transiente Bindung von SAGA an Mediator geben, die durch eine Polyglutaminexpansion verstärkt würde? In diesem Kontext wurde eine „*gain-of-function*“-Hypothese für Polyglutamin-Krankheiten bereits in der Literatur diskutiert (Rubinsztein, 2002).

Neben Chorea Huntington existieren mindestens noch zwei weitere neurodegenerative Erkrankungen, die ursächlich mit Polyglutaminabfolgen und Transkription zu tun haben. Zum einen die Kennedy-Krankheit (spinale und bulbuäre Muskelatrophie: SBMA), bei der eine CAG-Expansion im Androgen-Rezeptor für das Krankheitsbild verantwortlich ist (Perutz *et al.*, 1994). Zum anderen die spinocerebrale Ataxie Typ 17 (SCA17), bei der eine CAG/CAA-Expansion in TBP zu entsprechenden neurologischen Defekten führt (Fujigasaki *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2001).

Obwohl es sich also bei homopolymeren Glutaminabfolgen sehr wahrscheinlich um eine Art Protein-Protein-Interaktionsmodul handelt, das erst bei höheren Eukaryonten verstärkt auftritt, ist bisher sehr wenig über die Interaktionspartner dieses Moduls bekannt. Eine Suche nach potentiellen Bindungspartner für die Poly(Q)-Region des POU-Transkriptionsfaktors Brn-2 mit dem Hefe Zwei-Hybrid-System, führte zur Klonierung von fünf cDNAs. Die entsprechenden Proteine wurden PQBP („*poly-Q binding protein*“) 1-5 genannt, und hatten als Gemeinsamkeit das Vorliegen von Sequenzabschnitten, bei denen geladene bzw. polare Aminosäurereste stark überrepräsentiert sind (Imafuku *et al.*, 1998). Es wird spekuliert, daß es zur Ausbildung eines ausgedehnten Netzwerkes aus Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den geladenen bzw. polaren Seitenketten von PQBP-1 (die eine Art polaren „Zipper“ ausbilden) und dem Polyglutaminmodul kommen kann (Okazawa *et al.*, 2001; Waragai *et al.*, 1999). Die Strukturanalyse von GST-Q22 und GST-Q41 in (wässriger) Lösung offenbart allerdings eindeutig eine Zufallsknäuelstruktur für Polyglutaminabfolgen (Masino *et al.*, 2002). Nach einem eleganten Modell, das auf Befunden aus der CD-Spektroskopie und Röntgenstreudaten von Polyglutaminaggregaten basiert, könnten Polyglutaminabfolgen jedoch ab einer gewissen Kettenlänge in der Lage sein, intermolekulare  $\beta$ -Faltblattstrukturen (polare „Zipper“) durch die Knüpfung von Wasserstoffbrücken zwischen den Amidgruppen der Seitenketten und des Peptidrückgrates auszubilden (Perutz *et al.*, 1994), was letztlich zur Aggregation führen mag.

In *Drosophila* gehört ein Großteil der Proteine mit längeren Polyglutaminmodulen zur Familie der Transkriptionsfaktoren, die entwicklungs-genetische Prozesse steuern, insbesondere im Nervensystem (Perutz, 1996). Die Frage, ob PAQ eine ähnliche *in-vivo*-Funktion hat, kann zukünftig nur im Mausmodell beantwortet werden.

## 5.2. Die Rolle von Mediator als basaler Transkriptionsfaktor

Mediator wurde ursprünglich aufgrund von *in-vitro*-Daten in der Bäckerhefe als der zentrale Coaktivator dieser Spezies beschrieben (Flanagan *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1994). In den gleichen Zeitraum fiel die Entdeckung der USA-Aktivität im Säugersystem (Meisterernst *et al.*, 1991). Interessanterweise vergingen dann knapp zehn Jahre, bis zum einen erkannt wurde, daß die USA-Komponente PC2 ein humaner Mediatorkomplex ist (Malik *et al.*, 2000), und zum anderen Mediatoren neben ihrer Funktion als Coaktivator eine essentielle Rolle für die basale RNA-Polymerase II-Transkription spielen (Mittler *et al.*, 2001). Dies konnte kürzlich auch durch Arbeiten im Labor von Dr. R.G. Roeder bestätigt werden (Baek *et al.*, 2002). Eine essentielle Rolle von Mediator in der Transkription deutete sich indes schon durch genomweite Expressionsstudien in *S. cerevisiae* an (Holstege *et al.*, 1998), da eine temperatursensitive Mutante von Srb4 zu einem nahezu vollständigen Verlust der Expression von Klasse II-Genen führte. Andere TS-Mutanten hingegen (z.B. Med6 und Srb7) weisen einen weit weniger drastischen Effekt auf (Abschn. 1.3.1.). Dies signalisiert, daß nur ein ganz bestimmter Teil des Hefe-Mediators die basale Funktion vermittelt.

Die Funktionsweise von Mediator als genereller Transkriptionsfaktor wurde lange Zeit sozusagen „übersehen“, da der Cofaktorkomplex nur in gereinigten rekonstituierten *in-vitro*-Transkriptionssystemen oder im Kontext von Chromatin-Systemen, bei denen die basale Transkription nicht gemessen werden kann, analysiert wurde. Erst im Zusammenspiel mit anderen, noch unbekanntem Faktoren des „groben“ Kernextraktsystems, war es möglich diese Funktion *in vitro* zu messen. Der limitierende Schritt war dabei die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen PAQ, der es erlaubt humane Mediatoren spezifisch und nahezu quantitativ aus einem Kernextrakt zu entfernen (Mittler *et al.*, 2001).

Die sich aufdrängende Frage, warum Mediatoraktivitäten für die Transkription von Klasse II-Genen so wichtig sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr beantwortet werden. Eine naheliegende Hypothese ist die Postulierung eines oder mehrerer „Gegenspieler“ von Mediator, welche die RNA-Polymerase II direkt oder indirekt inhibieren. Eine weitere Möglichkeit wäre eine unterschiedliche Modifikation von RNA-Polymerase II im Mediator-freien versus „normalen“ Kernextrakt, die zur Inhibition des Enzyms führt. Dagegen spricht, daß über zwei verschiedene Immunaффinitätssäulen in einem Schritt gereinigte RNA-Polymerase II – sowohl aus Kernextrakt als auch aus Mediator-depletiertem Kernextrakt – in einem gereinigten *in-vitro*-Transkriptionssystem voll aktiv ist (Daten nicht gezeigt). Alternativ könnten auch Pseudochromatineffekte im groben System eine Rolle spielen, da in Kernextrakten natürlich auch Histone und HMG-Proteine vorkommen, die möglicherweise eine Chromatin-ähnliche Struktur aufbauen könnten (Gruss *et al.*, 1990). Die Zugabe von Kompetitor-DNA zu einem HeLa-Kernextrakt sollte diesen Effekt allerdings schwächen und das Transkriptionssystem wenigstens teilweise Mediator-unabhängig machen, was allerdings nicht der Fall ist (Daten nicht gezeigt).

Deswegen bleibt die Antagonisten-Hypothese bisher das beste Arbeitsmodell. Über die „Primer-Extension“-Analyse konnte gezeigt werden, daß sich der Mediatoreffekt nicht auf der Ebene der Elongation der Transkription abspielt (G. Mittler, unveröffentlicht), so daß die basale Funktion von Mediator bei der Initiation bzw. frühen Elongation („*promoter escape*“) greifen muß. Aufgrund genetischer und biochemischer Daten aus *S. cerevisiae* kommen dafür folgende potentielle „Gegenspieler“ in Frage. Der negative Cofaktor NC2 (Xie *et al.*, 2000), der genetische Interaktionen mit Srb4 und Sin4 aufweist (Lee *et al.*, 1998; Lemaire *et al.*, 2000), der CCR4-NOT-Komplex (Collart und Struhl, 1994), der ebenfalls eine temperatursensitive Srb4-Mutante (*Srb4-138*) supprimieren kann (Lee *et al.*, 1998), sowie der Corepressor Tup1-Cyc8/Ssn6 (Smith und Johnson, 2000), für den zudem biochemisch eine negative Regulation von Mediator gezeigt werden konnte (Gromoller und Lehming, 2000a; Papamichos-Chronakis *et al.*, 2000; Zaman *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde auch über eine physikalische Interaktion des Srb8-11-Subkomplexes mit Komponenten des NOT-Komplexes berichtet (Liu *et al.*, 2001a).

Weder eine Depletion des Mediator-freien Kernextrakts für NC2 (NC2 $\alpha$ -Antikörper) noch für den humanen NOT-Komplex (CALIF-Antikörper; Albert *et al.*, 2000) war in der Lage, die *in-vitro*-Transkription Mediator-unabhängig zu machen (G. Mittler, unveröffentlicht). Möglicherweise sind aber auch mehrere molekulare Mechanismen im Kernextrakt gleichzeitig durch Mediator reguliert, was bei einem Multiproteinkomplex nicht ungewöhnlich wäre, so daß man alle Antagonisten gleichzeitig ausschalten müsste.

Eine Untersuchung von homologen Proteinen der Tup1/Groucho-Familie im Bezug auf die basale Mediatorfunktion im humanen System wurde bisher nicht unternommen. Allerdings existieren genetische Interaktionen zwischen Unc37/Groucho und Mediator in *C. elegans* (Zhang und Emmons, 2002). Erwähnt werden sollte an dieser Stelle, daß das Gen für den Transkriptionsfaktor HIRA (Magnaghi *et al.*, 1998), einem zu Tup1 homologen Protein, ebenfalls auf dem DiGeorge-Locus zu finden ist (Abb. 19). Möglicherweise existiert also eine funktionelle Interaktion zwischen PAQ und HIRA.

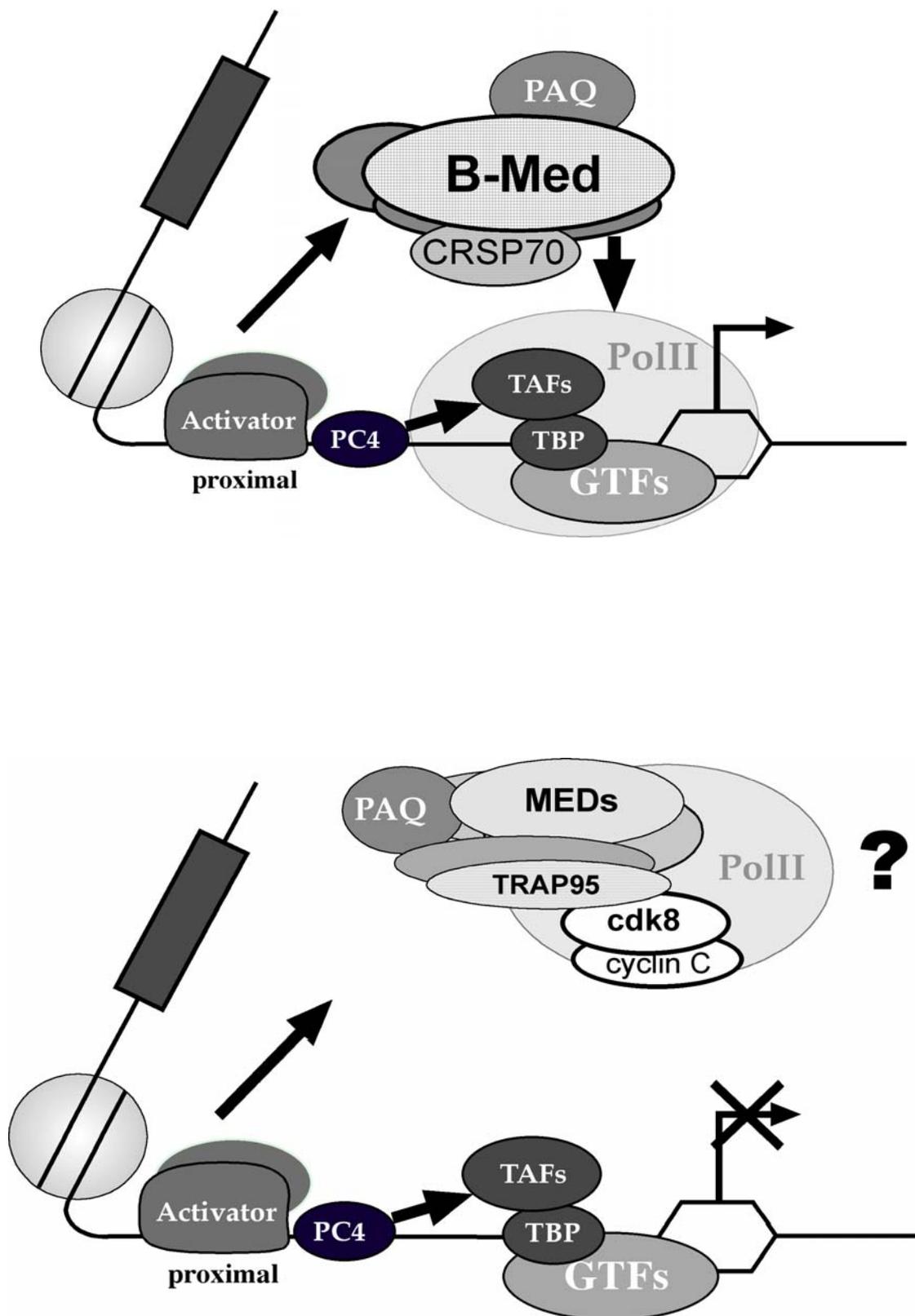
Die in dieser Arbeit vorgestellte Depletionsprozedur für humane Mediatoren aus Extrakten von Zellkernen, entfernt die Komponenten des hSrb8-Subkomplexes (Cdk8, Cyclin C, TRAP230) nicht quantitativ (Abb. 25). Gleichzeitig ist eine negative Funktion von Cdk8-Cyclin C für die *in-vitro*-Transkription in der Bäckerhefe und in Säugern beschrieben worden (Akoulitchev *et al.*, 2000; Hengartner *et al.*, 1998). Während in Hefe ein Modell favorisiert wurde, bei dem die Phosphorylierung der CTD von RNA-Polymerase II durch Srb10-Srb11 vor deren Einbau in den Präinitiationskomplex die Transkription inhibiert (Hengartner *et al.*, 1998), soll der negative Effekt von Cdk8-Cyclin C bei Säugern durch eine Phosphorylierung von Cyclin H (Inaktivierung von TFIIH) bzw. PC4 (Inaktivierung) realisiert werden (Akoulitchev *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 1999).

Da der Cdk8-Effekt, zumindest in Säugern, spezifisch für die aktivierte Transkription sein soll, ist es fraglich, ob das Kinase-Cyclin-Paar ursächlich etwas mit der basalen Mediatorfunktion zu tun hat, kann aber zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz ist TFIID ein attraktives Zielmolekül für die Regulation durch Mediatoren. Es ist beispielsweise schon lange bekannt, daß Mediator die Phosphorylierung der CTD (an Ser5) von RNA-Polymerase II durch Cdk7-Cyclin H enorm verstärkt (Abschn. 1.3.1.). Dabei ist es aber meiner Meinung nach nicht klar, ob die Ser5-Phosphorylierung der CTD wirklich etwas mit der Transkription *per se* zu tun hat, oder aber ein Signal für die prä-mRNA-Prozessierungsmaschine (z.B. „capping“) ist (Übersichtsartikel: Maniatis und Reed, 2002). Arbeiten in unserem Labor geben deutliche Hinweise auf einen Synergismus zwischen Mediator und rekombinatem (Fukuda *et al.*, 2001) TFIID in einem gereinigten *in-vitro*-Transkriptionssystem, der allerdings von der XPB(p89)-Helikase- und nicht von der Kinaseaktivität von Cdk7-Cyclin H abhängt (G. Mittler, unveröffentlicht). Für eine funktionelle Interaktion zwischen Mediator und TFIID spricht zudem die Tatsache, daß Mediator zusammen mit TFIIA, TFIID, TFIIIE und TFIID als Gerüst am Promotor zurückbleiben kann, wenn die Polymerase diesen bereits verlassen hat, und so als Andockstelle für eine weitere Initiationsrunde dienen mag (Yudkovsky *et al.*, 2000). Da im Kernextrakt natürlich beide genannten TFIID-Funktionen eine wichtige Rolle spielen könnten, muß in Zukunft untersucht werden, inwieweit die Regulation von TFIID durch Mediator essentiell für die RNA-Polymerase II-Transkription ist.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß es wahrscheinlich noch großer Anstrengungen bedarf, die basale Mediatorfunktion bis ins molekulare Detail aufzuklären. Die Entdeckung derselben (Mittler *et al.*, 2001) hat aber den Grundstein dafür gelegt, einen wichtigen Schritt in der Regulation von Klasse II-Genen in Zukunft besser zu verstehen. Da Mediator mit RNA-Polymerase II über mehrere Kontaktpunkte interagieren kann (Asturias *et al.*, 1999), sollte als nächstes die Frage beantwortet werden, inwieweit die Polymerase ohne Mediator in einem Kernextrakt überhaupt noch an den Promotor binden kann.

### 5.3. Zwei unterschiedliche Formen humaner Mediatoren

Die Plethora an unterschiedlichen humanen Mediatorkomplexen, die inzwischen in der Literatur zu finden sind (Malik und Roeder, 2000), zeigt die Heterogenität in der Polypeptidzusammensetzung dieser Klasse von Cofaktoren, und ist wahrscheinlich ein Hinweis auf eine große Dynamik, was die Assoziation bzw. Dissoziation einzelner Komponenten anbelangt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun eine Abstraktion dieses Problems dahingehend durchgeführt, daß nur nach dem Gesichtspunkt unterschieden wurde, ob ein Komplex die basale Transkriptionsfunktion vermitteln kann, oder nicht.



**Abb. 35:** Zwei funktionell und strukturell unterschiedliche Formen humaner Mediator Komplexe. Während B-Med ein essentieller Faktor für die basale Transkriptionsaktivität von RNA-Polymerase II ist, muß eine Funktion für Med erst noch gefunden werden.

Funktionell und strukturell konnten zwei unterschiedliche Mediatoren postuliert werden (Abb. 35), die B-Med (basaler Mediator) und Med (Mediator) genannt wurden (Mittler *et al.*, 2001), so daß das Problem auf zwei Zustandsformen reduziert war (Abschn. 4.5.3.). Zur Zustandsform B-Med gehören aufgrund der verwendeten Reinigungsschemata sehr wahrscheinlich CRSP (Ryu und Tjian, 1999) und PC2 (Malik *et al.*, 2000), wohingegen NAT (Sun *et al.*, 1998) und SMCC die Zustandsform Med einnehmen. Als stringentes Kriterium für B-Med wurde dabei die Anwesenheit des Proteins CRSP70 und die Abwesenheit bzw. substöchiometrische Präsenz von Cdk8 angesetzt. Nur B-Med ist in der Lage die essentielle basale Funktion von Mediator im Kernextrakt *in-vitro*-Transkriptionssystem zu ersetzen, nicht aber Med (Mittler *et al.*, 2001). Da PAQ Bestandteil beider Komplexe ist (Abb. 35) und die Trennung von Med und B-Med in dieser Arbeit durch klassische Säulenchromatographie durchgeführt wurde, die mit Sicherheit keine vollständige Abtrennung von Med aus der B-Med-Präparation erlaubte, war eine Definition von B-Med auf der Basis aller enthaltener Polypeptide nicht möglich. Dies muß zukünftig durch Immunaффinitätschromatographie an einem  $\alpha$ -CRSP70-Antikörper realisiert werden. Es deutete sich allerdings an, daß B-Med sehr wahrscheinlich frei von Cdk8, Cyclin C, TRAP230 und TRAP240 ist, Proteine die möglicherweise ein Submodul im humanen Mediator bilden (siehe Abschn. 5.5.). Außerdem war das Fehlen von TRAP95 offensichtlich (Abb. 29). Dies wäre in Übereinstimmung mit Resultaten aus dem Labor von Dr. R. Tjian, wo gezeigt werden konnte, daß der Mediatorkomplex ARC eine Mischung aus CRSP und ARC-L darstellt, und nur CRSP (enthält CRSP70, es fehlen Cdk8, Cyclin C, TRAP240 und TRAP230) nicht aber ARC-L in dem verwendeten Chromatin-System aktiv ist (Taatjes *et al.*, 2002). ARC-L erfüllt dabei alle Kriterien von Med. Neben ARC wurde auch TRAP über eine Affinitätssäule gereinigt, die eine Aktivierungsdomäne (AF2 des Thyroidhormonrezeptors) als Ligand verwendet. Kongruent mit den neuesten Resultaten bzgl. ARC, der unter anderem über GST-VP16 Säulen gereinigt wurde, konnte (auch) in dieser Arbeit demonstriert werden, daß die Aktivierungsdomäne von VP16 Med und B-Med gleichzeitig bindet (Abb. 30). Es kann nun spekuliert werden, inwieweit der TRAP-Komplex nicht auch eine Mischung beider Zustandsformen darstellt.

Obwohl die funktionelle Unterscheidung zwischen Med und B-Med klar ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gesagt werden, inwieweit das Vorhandensein bzw. das Fehlen einzelner Untereinheiten die unterschiedliche Aktivität verursacht. CRSP70, die B-Med spezifische Komponente, besitzt in ihrem N-terminalen Bereich Homologiebeziehungen zum N-Terminus des Elongationsfaktors TFIIS, ein Sequenzabschnitt der wiederum eine Interaktionsdomäne mit RNA-Polymerase II darstellt (Booth *et al.*, 2000). Ein zu CRSP70 orthologes Protein in *S. cerevisiae* scheint aber nicht zu existieren, wenngleich die basale Mediatorfunktion zwischen Hefe und Säugern konserviert ist. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Anwesenheit der Proteine Cdk8, Cyclin C, TRAP230, TRAP240 und TRAP95

die basale Funktion repräsentiert. Allerdings gibt es auch dafür bislang keine experimentellen Hinweise.

Allgemein stellt sich die Frage nach der zellulären Funktion der Zustandsform Med, für die bisher keine wirkliche *in-vitro*-Funktion existiert. Da es so aussieht, als ob (saure) Aktivierungsdomänen Med und B-Med rekrutieren können (Abb. 30), könnte es auch sein, daß Med eine spezifische Funktion an Enhancerelementen ausübt, die *in vitro* bislang nicht gemessen werden kann. Med-RNA-Polymerase II-Präparationen können gereinigte RNA-Polymerase II in einem rekonstituierten *in-vitro*-Transkriptionssystem (unter Verwendung superspiralisierter Reporter-DNA) voll ersetzen. Allerdings ist die Funktion der Med-gebundenen Polymerase in diesem artifiziellen System ATP-abhängig, ganz im Gegensatz zum „core“-Enzym (G. Mittler, unveröffentlicht). Könnte also der Enhancer-gebundene Med-Komplex die Rolle haben, RNA-Polymerase II an Gene zu rekrutieren, bevor diese dann auf den Promotor übertragen wird?

Denkbar ist derweil auch eine völlig andere Hypothese, und zwar, daß die beiden Formen rasch ineinander umgewandelt werden können. Somit könnte ein Teil oder der komplette Initiationskomplex inklusive Med in der *in-vivo*-Situation bereits an vielen Genen vorhanden sein, lange bevor diese transkribiert werden. Dies würde ein sehr schnelles Anschalten eines Gens als Antwort auf ein Signal ermöglichen, wenn dabei nur wenige Untereinheiten des Mediators ausgetauscht werden müssten. Beispielsweise könnten Repressoren bzw. Corepressoren die Zustandsform Med begünstigen, und nach Eintreffen eines „positiven“ Signals abdissoziieren, wobei sich sogleich die Zustandsform B-Med bildet. Für dieses Modell gibt es bislang keine stichhaltigen Beweise. Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente, kurz CHIP genannt (Orlando, 2000), konnten bis dato aber zeigen, daß *in vivo* Mediator-Komponenten und TBP (bzw. TFIID), meist schon vor der Bindung von RNA-Polymerase II und dem Start der Transkription, an Promotoren gebunden sind (Cosma *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001b; Soutoglou und Talianidis, 2002). Einen ersten Hinweis darauf, daß Mediator-Komplexe an Genen *in vivo* schrittweise bzw. modulartig aufgebaut werden könnten, findet man in folgender Publikation (Burakov *et al.*, 2002). Dort wurde darüber berichtet, daß der Östrogenrezeptor-Alpha (ER $\alpha$ ) zuerst seinen direkten Bindungspartner TRAP220 rekrutiert, bevor die Mediator-Komponenten hRgr1 und DRIP130 am Promotor detektiert werden können.

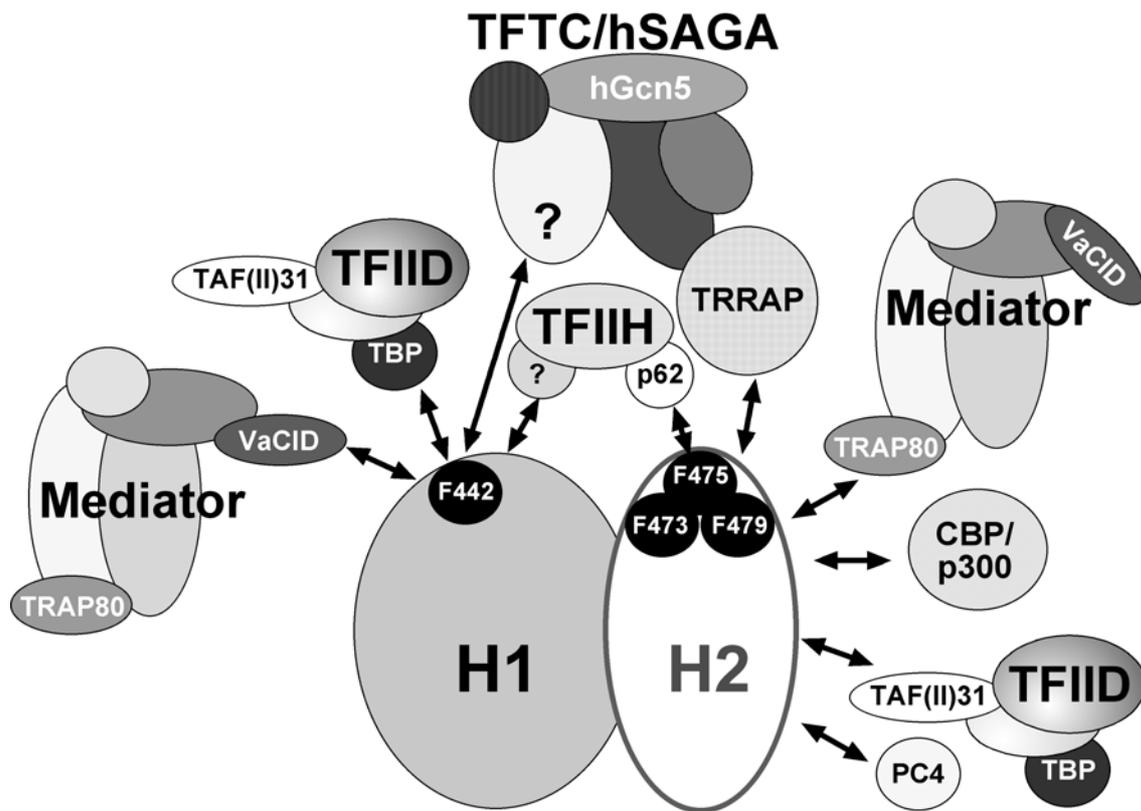
Als Fazit läßt sich also festhalten, daß Mediator in Zellen möglicherweise eine sehr dynamische Zusammensetzung aufweist, die dann unter Umständen auch genspezifisch seine Funktion diktiert. Dies bedingt gleichzeitig die Annahme eines stabilen „Kerns“, der variable Untereinheiten binden kann (Abschn. 5.5.). Die abstrakte Einteilung in zwei funktionelle Zustandsformen (Mittler *et al.*, 2001; Taatjes *et al.*, 2002) war in diesem Zusammenhang also eine solide Basis für weiterführende Studien, welche die Aufklärung genereller Mechanismen der eigentlichen Funktionsweise von Mediator, die noch völlig unbekannt ist, zum Ziel haben.

## 5.4. Die Aktivierungsdomäne von VP16

Um die Interaktion von humanen Mediatoren mit der VP16 Aktivierungsdomäne zu charakterisieren und mit dem anderer bereits bekannter Transkriptionsfaktoren zu vergleichen, wurde in dieser Arbeit das Bindungsverhalten von GTFs sowie von Cofaktoren an die Subdomänen H1 und H2 von VP16 im Kontext zellulärer Extrakte aus HeLa-Kernen untersucht. Als Spezifitätskontrolle kamen dabei Derivate von H1 bzw. H2 als Liganden zum Einsatz, welche Punktmutationen aufweisen, die das jeweilige Protein *in vivo* inaktivieren (Regier *et al.*, 1993). Nimmt man an, daß im Kernextrakt alle Polypeptide in einem nahezu physiologischen Verhältnis zueinander vorliegen, zeigt das Resultat (Abb. 30) Wechselwirkungen auf, die *in vivo* relevant sein könnten. Dabei konnten zum Großteil bekannte Interaktionen bestätigt und ihre Bindungsspezifität bzgl. H1 und H2 geklärt werden (falls nicht schon bekannt). Eine Zusammenfassung aller bestätigter Interaktionen und Verweise auf daran beteiligte direkte Bindungspartner (falls bekannt) finden sich in der Legende von Abb. 36.

Neu war dabei im wesentlichen die spezifische Bindung eines TFTC-ähnlichen Komplexes (Wieczorek *et al.*, 1998), dem humanen Orthologen des *S. cerevisiae* SAGA-Komplexes (Grant *et al.*, 1997), an die Subdomänen H1 und H2. Über eine Bindung des mit TFTC verwandten Komplexes STAGA an VP16 konnte ebenfalls berichtet werden (Martinez *et al.*, 2001). Während SAGA in Hefe nur schwach an VP16:H1 bindet (Utley *et al.*, 1998), ist im Säugersystem eine deutliche Bindung eines TFTC-ähnlichen Komplexes an die Subdomäne H1 zu erkennen (Abb. 30). In der Bäckerhefe konnte auch eine direkte Wechselwirkung von H2 und Tra-1, dem Orthologen von TRRAP, gezeigt werden (Brown *et al.*, 2001), so daß davon auszugehen ist, daß auch TRRAP an VP16:H2 bindet (Abb. 36). Somit bleibt offen, wer der direkte Interaktionspartner in TFTC für VP16:H1 ist, oder ob TFTC über einen anderen H1-gebundenen Faktor an diese Subdomäne rekrutiert wird.

Besonders interessant für die vorliegende Arbeit war die Analyse des Bindungsverhaltens von Mediatoruntereinheiten. Mediatoren binden spezifisch an beide Subdomänen, wobei weder die komplette Aktivierungsdomäne von VP16, noch die Subregionen H1 bzw. H2 die beiden Zustandsformen Med/ARC-L und B-Med/CRSP (Abschn. 5.3.) unterscheiden können (Abb. 30 und Taatjes *et al.*, 2002), was wiederum bedeutet, daß die direkten Bindungspartner Komponenten beider Mediatorkomplexe sein müssen. Dies trifft auf TRAP80 zu, das direkt mit VP16 wechselwirken kann, nicht aber mit VP16:H1 (Gu *et al.*, 1999) und sowohl in Med als auch in B-Med nachgewiesen werden kann (Mittler *et al.*, 2001). Das Pendant für TRAP80 bzgl. H1 ist bisher nicht bekannt. Allerdings sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit (Abschn. 4.6.2.) für eine direkte Interaktion von VP16:H1 mit der neuen humanen Mediatoruntereinheit p103/VaCID (G. Mittler, unveröffentlicht), auch wenn diese mit rekombinantem Protein noch bestätigt werden muß.



**Abb. 36:** Funktionelle Interaktionen der Aktivierungsdomäne des *Herpes simplex* Transaktivators VP16. Die Aktivierungsdomäne ist in Form ihrer beiden Subdomänen VP16:H1 (H1) und VP16:H2 (H2) dargestellt. Für die Interaktionen kritische Aminosäurereste in H1 bzw. H2 sind hervorgehoben (F442, F473, F475, F479). Direkte Wechselwirkungen sind in Form eines Doppelpfeils illustriert, und beruhen auf Daten, die entweder im Säugersystem oder in der Bäckerhefe gewonnen wurden (siehe auch Text). Für folgende Faktoren konnte eine direkte Interaktion gezeigt werden: CBP (Ikeda *et al.*, 2002), PC4 (Kretschmar *et al.*, 1994a), TAF<sub>II</sub>31 (Goodrich *et al.*, 1993; Uesugi *et al.*, 1997), TBP (Ingles *et al.*, 1991), p62/TFIIH (Xiao *et al.*, 1994), Tra 1 (Hefe-Ortholog von TRRAP, (Brown *et al.*, 2001)) und TRAP80 (Gu *et al.*, 1999). Über eine Bindung von TFIIF (Rap74) und RNA-Polymerase II an VP16 wurde berichtet (Näar *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1994), inwieweit es sich dabei um direkte Wechselwirkungen handelt muß noch gezeigt werden. Evidenz für eine Bindung von Mediator an VP16:H1 kommt aus dieser Arbeit (siehe Text).

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß die VP16 Aktivierungsdomäne mehr als eine Untereinheit in humanen Mediatoren kontaktiert, was die Affinität der Wechselwirkung enorm verstärken würde. Daten aus *S. cerevisiae* legen den Schluß nahe, daß VP16:H1 in dieser Spezies über die Bindung des Gal11-Moduls funktioniert, und Gal11 dabei eines der Zielmoleküle für die Bindung sein könnte (Lee *et al.*, 1999b). Da VP16:H1 evolutionär zwischen einzelnen Herpesviren (z.B. Pferde-HSV, *Varicella zoster* Virus) nicht konserviert ist (Grapes und O'Hare, 2000), kann es sein, daß auch die Bindungspartner für H1 evolutionär nicht konserviert sind, was die Interaktion mit p103/VaCID erklären würde, das kein homologes Protein in der Bäckerhefe besitzt.

Der Vergleich mit Hefe ist im Falle von VP16:H1 auch schwierig, da diese Domäne in *S. cerevisiae* weder *in vivo* noch *in vitro* ausreichend charakterisiert ist.

Allgemein ist eine Klärung der Funktion bzw. das Auffinden der Bindungspartner für die beiden Domänen VWA und CID von p103/VaCID mit Sicherheit essentiell für das Verständnis der Rolle von Mediator im Aktivierungsmechanismus von VP16. Vorläufige Daten in unserem Labor (G. Mittler, unveröffentlicht) deuten indes darauf hin, daß eine transiente Expression der VWA-Domäne einen dominant negativen Effekt auf das Aktivierungspotential von VP16:H1 in humanen Tumorzellen hat. Da die VWA-Domäne eine evolutionär konservierte (Eukaryonten, Archaeen, Eubakterien) Protein-Protein-Interaktionsdomäne zu sein scheint, könnte es sein, daß sie VP16:H1 oder aber andere Mediatoruntereinheiten direkt bindet. Manche VWA-Domänen, z.B. die Integrin-I-Domäne in CR3 bzw. LFA-1, binden ihre Liganden dabei abhängig von zweiwertigen Kationen, wobei eine allosterische Umwandlung von einer niedrigaffinen Wechselwirkung (in der Anwesenheit von  $Mn^{2+}$ ) versus einer hochaffinen Interaktion (bei Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ ) *in vitro* unterschieden werden kann (Lee *et al.*, 1995a; Lee *et al.*, 1995b). Es sind auch Liganden-abhängige Konformationsänderungen beschrieben (Bsp.:Integrin CD11b), wobei der Ligand sehr wahrscheinlich eine autoinhibitorische Interaktion zwischen der VWA-Domäne und dem C-Terminus von CD11b überkommt (Xiong *et al.*, 2000). Es wäre deshalb interessant in Zukunft herauszufinden, ob ein allosterisches Bindungsverhalten auch für die VWA-Domäne von p103/VaCID beobachtet werden kann.

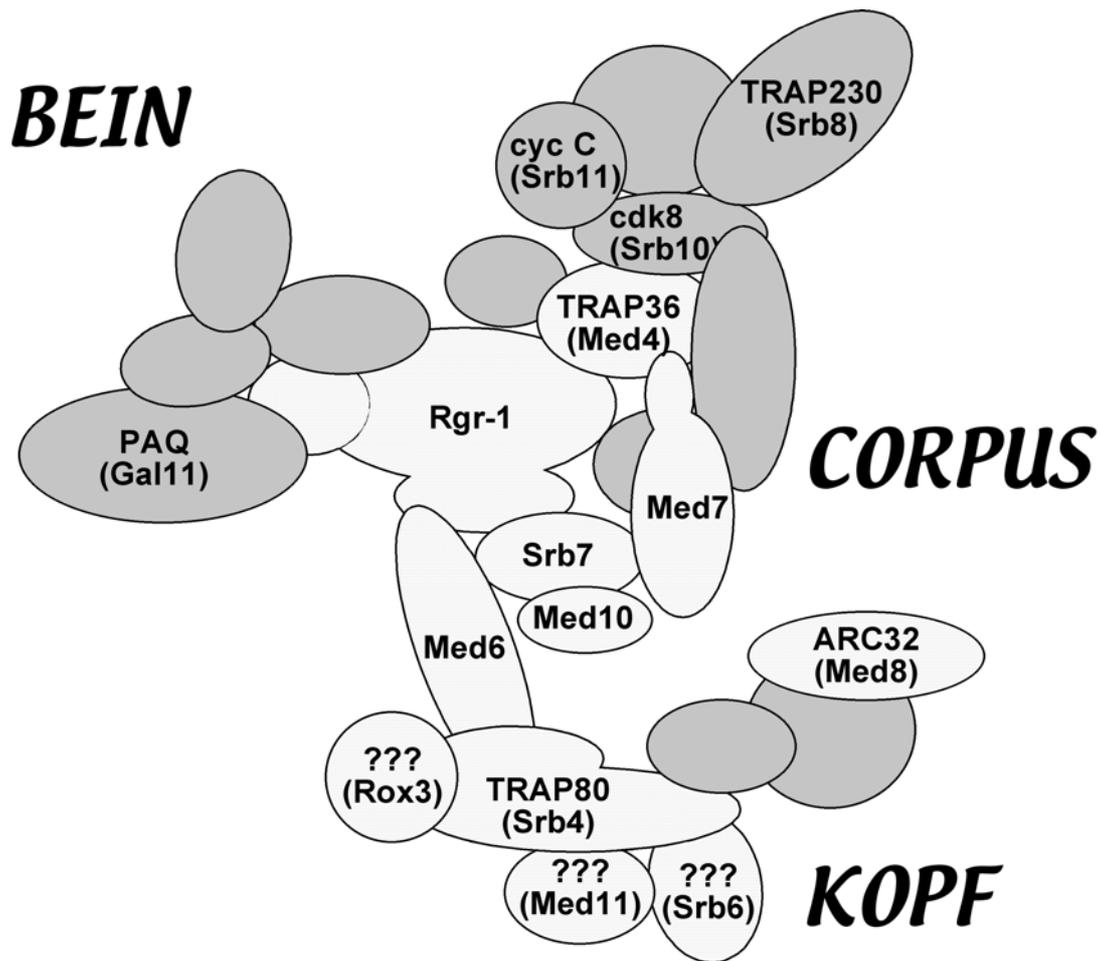
Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß trotz zwanzigjähriger intensiver Forschung an der Transaktivierungsdomäne von VP16, die Funktionsweise dieses Modellsystems noch nicht völlig verstanden ist, und auf die Aufklärung aller direkten Interaktionen bzw. das Finden weiterer Bindungspartner warten muß. Darüber hinaus muß man herausfinden, welche der Interaktionen *in vivo* kritisch sind, und inwieweit Synergismen in der Bindung bzw. Funktion der potentiellen Zielmoleküle vorhanden sind. Aus dem verwendeten biochemischen Ansatz ist zudem nicht ersichtlich, ob *in vivo* gleichzeitig mehrere Transkriptionsfaktoren an VP16 binden können oder nicht. Beispielsweise konnte für den Östrogenrezeptor-Alpha kürzlich ein sequentielles Bindungsmuster für Mediatoren und die Cofaktoren SRC-1 bzw. ACTR (beide Mitglieder der p160-Familie) beschrieben werden (Burakov *et al.*, 2002). Völlig unklar ist auch, wie Transkriptionsfaktoren nachdem sie an die VP16-AD gebunden haben, von dieser wieder abdissoziieren. Gibt es vielleicht posttranslationale Modifikationen, welche diesen Prozess steuern, wie z.B. im Falle von CBP/p300 und CREB, bei dem eine Methylierung eines Argininrestes in der KIX-Domäne der Acetyltransferasen zu einer Inhibition der Bindung an CREB (KID-Domäne) führt (Übersichtsartikel: Gamble und Freedman, 2002).

Alternativ könnte natürlich auch der Ubiquitin-Proteasomen-Weg dabei eine Rolle spielen, was zu einem direkten proteolytischen Abbau von Cofaktoren führen würde. In der Tat gibt es Hinweise dafür, daß die Mediatoruntereinheit hMed8/Arc32 mit Komponenten der Ubiquitinierungsmaschine komplexiert sein kann, und so eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität an diesen zentralen Cofaktor rekrutiert (Ejkova und Tansey, 2002). Experimentelle Daten aus der Bäckerhefe zeigen zudem, daß auch die Proteolyse des Aktivators selbst eine Rolle im Transaktivierungsmechanismus von VP16 spielen kann (Molinari *et al.*, 1999; Salghetti *et al.*, 2001).

## 5.5. Ein evolutionär konservierter stabiler Kern in Mediatoren

In dem nun folgenden Abschnitt soll versucht werden, viele der in den vorangegangenen Kapiteln isoliert dargestellten experimentellen Befunde bzw. Arbeitshypothesen, auf der Basis eines grundlegenden Modells zu diskutieren. Dabei sollen, wenn möglich, Lösungsansätze für noch offene Fragen ausgearbeitet werden.

Eine offensichtliche Unklarheit beruht auf der Heterogenität der humanen Mediatorkomplexe und dem Postulat zweier unterschiedlicher Zustandsformen, die Med und B-Med genannt wurden (Abschn. 5.3.). Obwohl zentrale Mediatoreigenschaften, wie die basale Transkriptionsfunktion und die Wirkung als Coaktivator, zwischen *S. cerevisiae* und dem Säugersystem evolutionär konserviert sind (Baek *et al.*, 2002), scheint die Heterogenität des Hefe-Mediators bei weitem nicht so ausgeprägt zu sein. Man muß dabei allerdings bedenken, daß es sich bei der Bäckerhefe im Gegensatz zum Menschen um einen unizellulären Organismus handelt, der evolutionär an seine Umwelt sehr gut adaptiert zu sein scheint, was sich in einem kompakten Genom mit ca. 6000 Genen, die zudem sehr oft Intron-frei sind, manifestiert (Dujon, 1996). Die Unterschiede lassen sich wohl am besten durch die Annahme eines stabilen „Mediatorkerns“, der alle grundlegenden Funktionen besitzt und vermitteln kann, erklären. Um diesen „core“-Mediator, bestehend aus dem Rgr1- und Srb4-Subkomplex (Abschn. 1.3.1.) könnte man nun organismus- sowie zelltypspezifische Untereinheiten anlagern, was eine Maximierung der Regulationsmöglichkeiten zur Folge hätte. Nimmt man nun das Modell des Hefe-Mediators (Abb. 7) als Ausgangspunkt, und „markiert“ dort alle Untereinheiten, die *in vivo* absolut essentiell sind, so stellt man fest (Analyse mittels PSI- und PHI-BLAST), daß die meisten essentiellen Untereinheiten im Menschen bezüglich ihrer Primärstruktur wenn auch schwach aber doch konserviert sind (Abb. 37; siehe auch Gustafsson und Samuelsson, 2001). Das Fehlen von humanen Orthologen für Rox3, Srb6 und Med11 könnte sehr wahrscheinlich daran liegen, daß noch nicht alle humanen Mediatoruntereinheiten bekannt sind.



**Abb. 37:** Ein Kernstück des Mediators ist von der Bäckerhefe bis zum Menschen konserviert. Die strukturelle Einteilung in „Kopf“, „Corpus“ und „Bein“ erfolgte gemäß der Nomenklatur in Taatjes *et al.*, 2002. Untereinheiten des Hefe-Mediators, die *in vivo* unter logarithmischen Wachstumsbedingungen essentiell sind, sind grau gestreift illustriert. Viele dieser in *S. cerevisiae* essentiellen Untereinheiten sind in ihrer Primärstruktur auch im humanen System konserviert. Falls die Nomenklatur zwischen Bäckerhefe und *Homo sapiens* unterschiedlich ist, sind die Bezeichnungen für das Hefeprotein in Klammern angegeben. Zudem sind drei der vier Komponenten des Srb8-11-Subkomplexes des Hefe-Mediators im Menschen - wenigstens teilweise - konserviert (TRAP230, Cdk8, Cyclin C). Auch Gal11, ein zentraler Bestandteil des Aktivatorbindungsmoduls im Hefe-Mediator, ist evolutionär konserviert (PAQ).

Im Mediator der afrikanischen Bierhefe *S. pombe* konnten bislang Orthologe zu allen essentiellen Komponenten des Mediators der Bäckerhefe – bis auf die Med11-Untereinheit – gefunden werden (Spahr *et al.*, 2001). Darüber hinaus sind Orthologe zu den konservierten humanen Proteine auch in den Genomen von *D. melanogaster* und *C. elegans* zu finden (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß möglicherweise Interaktionsoberflächen mit RNA-Polymerase II und anderen generellen Transkriptionsfaktoren, zumindest teilweise konserviert sein könnten. Mit Sicherheit ist der strukturelle Aufbau des hypothetischen „core“-Mediators evolutionär konserviert.

Dafür spricht unter anderem, daß der humane und der Hefe-Mediator in der EM Gemeinsamkeiten in der globalen Struktur aufweisen (Dotson *et al.*, 2000).

Nicht nur essentielle Gene von Mediatoruntereinheiten, die für das Wachstum von Hefe unter idealen Bedingungen (logarithmische Vermehrung) benötigt werden, sind im Menschen konserviert, sondern auch drei der vier Proteine des Srb8-11-Subkomplexes (Abb. 37), darunter das Kinase-Cyclin-Paar Cdk8-Cyclin C. In der Bäckerhefe ist auch dieses Modul des Mediators sehr wahrscheinlich essentiell, und zwar dann, wenn die Hefe für längere Zeit (mehrere Wochen) in der stationären Phase „verharren“ muß (Chang *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2001). Deshalb ist es nicht ungewöhnlich, daß diese wichtige Regulationseinheit auch bei Säugern hochkonserviert ist. Bemerkenswerterweise scheint Cdk8-Cyclin C auch in humanen Zellen, das Zellwachstum über eine Phosphorylierung der TFIID-Untereinheit Cyclin H zu kontrollieren (Akoulitchev *et al.*, 2000). In Anbetracht der Tatsache, daß TRAP230 und TRAP240 bei einer Immunpräzipitation (IP) mit einem  $\alpha$ -Cdk8-Antikörper copräzipitieren, nicht aber bei einer IP mit einem  $\alpha$ -CRSP70-Antikörper (Taatjes *et al.*, 2002), spricht viel für die Annahme, daß Cdk8, Cyclin C, TRAP230 und TRAP240 im humanen Mediator ein Submodul bilden, ähnlich dem Srb8-11-Subkomplex im Mediator der Bäckerhefe (auch wenn keine Sequenzhomologie zwischen Srb9 und TRAP240 besteht).

Während der Mediator der Spaltheife *S. pombe* kein Gal11-homologes Protein besitzt, ist dieser zentrale Bestandteil des Aktivatorbindungsmoduls des *S. cerevisiae* Mediators in höheren Organismen, wie Säugern (PAQ) und der Taufliege (dARC105) konserviert (Abb. 22 und Park *et al.*, 2001a). Auch im Genom der beiden höheren Pilze *Candida albicans* und *Kluyveromyces lactis* findet man jeweils ein zu Gal11 homologes Protein (Daten nicht gezeigt), ganz in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß höhere Pilze im Vergleich zur Bäckerhefe zweimal so viele Proteine besitzen, die ortholog zu menschlichen Proteinen sind (Zeng *et al.*, 2001).

Wo befindet sich nun aber der Teil des Mediators, der die basale Transkriptionsfunktion vermittelt? Man kann davon ausgehen, daß diese Funktion sehr wahrscheinlich im „core“-Mediator zu finden sein muß. Tatsächlich lassen sich aus Zellen der Bäckerhefe zwei Formen von Mediatorkomplexen biochemisch isolieren. Eine mit RNA-Polymerase II assoziierte Form, die alle bekannten Untereinheiten inklusive des Srb8-11-Moduls enthält (Pol II-Med genannt), und eine Polymerase-freie Form (Med-c genannt), die aus dem Srb4-Subkomplex und den Komponenten des Rgr1-Subkomplexes, jedoch ohne Rgr1, besteht (Liu *et al.*, 2001d). Die beiden Komplexe wurden bisher leider nicht hinsichtlich der basalen Mediatorfunktion untersucht. Pol II-Med ist allerdings in einem VP16-aktivierten *in-vitro*-Transkriptionssystem wesentlich aktiver als Med-c, was am Fehlen des Gal11-Moduls in Med-c liegen mag.

Bei den Versuchen Subkomplexe des Hefe-Mediators aus rekombinanten Proteinen zu rekonstituieren, konnte indes eindeutig gezeigt werden, daß der Srb4-Subkomplex alleine die essentielle basale Aktivität des Mediators ersetzen kann (Kang *et al.*, 2001). Der Srb4-Subkomplex ist dabei aber nicht in der Lage die Phosphorylierung der CTD von RNA-Polymerase II durch TFIID zu stimulieren, eine Mediatoreigenschaft die zudem speziesspezifisch zu sein scheint, da der Mediator aus *S. pombe* nicht in Kombination mit TFIID und der CTD von *S. cerevisiae* (das selbe gilt auch umgekehrt) funktionell aktiv ist (Spahr *et al.*, 2000).

Es wird daher in Zukunft kritisch sein, ähnliche Experimente im humanen System durchzuführen, um die verschiedenen Mediatorfunktionen im molekularen Detail verstehen zu können. Auf diese Weise sollte man dann auch in der Lage sein die funktionellen Unterschiede zwischen Med und B-Med eindeutig strukturellen Unterschieden zuzuordnen. Die kürzlich gemachte Entdeckung, daß humane Mediatoren in Abhängigkeit verschiedener Aktivierungsdomänen in unterschiedlichen Konformeren vorliegen können (Übersichtsartikel: Meisterernst, 2002), macht zudem deutlich, daß auch allosterische Effekte von großer Bedeutung sein können. Möglicherweise haben höhere Organismen die Fähigkeit entwickelt, verschiedene Zustandsformen von Mediator durch die Bindung fakultativ assoziierter Proteine zu stabilisieren. Kandidaten dafür sind alle Untereinheiten, die man nur in den Genomen von *Drosophila* sowie Säugern und anderen Vertebraten, nicht aber in *C. elegans* finden kann (VaCID, CRSP70, TRAP100, TRAP25, CRSP34/TRAP37, TRAP95 und DRIP92). Betrachtet man den Mediator als zentralen Schalter der Regulation von Klasse II-Genen, der ähnlich der CPU („*central processing unit*“) eines Computers eine Vielzahl nahezu gleichzeitig eintreffender verschiedener Signale integrieren muß, ergibt sich aus der Annahme allosterischer Effekte eine Vervielfachung der potentiell möglichen Schaltzustände.

## 6. Zusammenfassung

---

Die Transkription von proteincodierenden Genen wird in Eukaryonten durch RNA-Polymerase II und die generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) unter Ausbildung eines 2 MDa großen Proteinkomplexes (Präinitiationskomplex) an den Promotoren von Klasse II-Genen vermittelt. Eine Regulation der Aktivität dieser Transkriptionsmaschine (basale Maschine) erfolgt durch Aktivator- und Repressorproteine, die meist sequenzspezifisch an regulatorische DNA-Sequenzen von Klasse II-Gene binden. Arbeiten von Meisterernst und Roeder (1991) im humanen System sowie Flanagan und Kornberg (1991) in *S. cerevisiae* konnten eindeutig belegen, daß für die Funktion von Aktivatoren nicht nur die Interaktion derselben mit der basalen Maschine, sondern auch die Wechselwirkung mit akzessorischen Proteinen, den sogenannten Cofaktoren, essentiell ist. Diese fungieren als eine Art Transmitter für regulatorische Signale, welche in letzter Konsequenz den Aufbau des Präinitiationskomplexes stimulieren bzw. die Aktivität der basalen Maschine positiv beeinflussen. Sowohl die funktionelle Charakterisierung als auch das Auffinden dieser Cofaktoren läßt sich in einem zellfreien *in-vitro*-Transkriptionssystem unter Verwendung von Modellgenen und Modellaktivatoren bewerkstelligen. Dies führte zu Beginn der neunziger Jahre zur Entdeckung der USA („*Upstream factor stimulatory activity*“)-Fraktion in Säugern und der biochemischen Reinigung eines Multiproteinkomplexes in Hefe, der Mediator genannt wurde. Die USA-Fraktion selbst enthält eine Reihe von positiven und negativen Cofaktoren (PCs und NCs), von denen einige in unserem Labor gereinigt und kloniert werden konnten. Ausgehend von USA wurde PC2 als eine chromatographische Fraktion beschrieben, welche in einem gereinigten, rekonstituierten *in-vitro*-Transkriptionssystem (bestehend aus den GTFs und RNA-Polymerase II) sowohl die basale als auch die durch Aktivatoren regulierte Transkriptionsaktivität stimuliert.

Ziel dieser Arbeit war es solche Polypeptide zu identifizieren, die mit der PC2-Aktivität funktionell korreliert und assoziiert sind. Außerdem sollte die systematische Untersuchung von Interaktionspartnern des Transaktivators VP16 aus dem *Herpes simplex* Virus zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise von Aktivierungsdomänen beitragen.

Mit Hilfe von biochemischen Affinitätssystemen, die auf der Verwendung der Aktivierungsdomäne von VP16 als Ligand bzw. dem Einsatz eines sogenannten motivspezifischen Antikörpers (anti-Polyglutamin) basierten, konnte ein neues Protein – PAQ (PC2-assoziiertes Q-reiches Protein) – identifiziert, gereinigt, und seine cDNA kloniert werden. Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen PAQ erlaubte die immunchemische Untersuchung dieses Faktors, der – mit Ausnahme der Nucleoli, den Orten der Biogenese von Ribosomen – ubiquitär im Zellkern lokalisiert ist. Immunaffinitätschromatographie- sowie Gelfiltrationsexperimente konnten eindeutig belegen, daß PAQ als konstitutiver Teil eines Multiproteinkomplexes vorliegt, dessen Untereinheiten zum Teil homolog zu Komponenten des bereits erwähnten Mediatorkomplexes der Bäckerhefe sind. Darüber hinaus war es

möglich mittels Bioinformatikanalysen PAQ als menschliches Ortholog des Mediatorproteins Gal11p aus *S. cerevisiae* zu identifizieren. Damit konnte erstmals gezeigt werden, daß neben den bereits bekannten Cofaktoren, auch ein humaner Mediatorkomplex Teil von USA und PC2 ist.

Neben dem in seiner Zusammensetzung genau definierten gereinigten *in-vitro*-Transkriptionssystem bieten Kernextrakte aus humanen Tumorzelllinien die Möglichkeit, Cofaktoren im Kontext aller anderen nukleären Proteine *in vitro* zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine Art „biochemisches Knockout-Verfahren“ etabliert, bei dem durch den Einsatz eines monoklonalen anti-PAQ-Antikörpers humane Mediatorkomplexe nahezu quantitativ aus Kernextrakten depletiert werden konnten. Damit konnte zum ersten Mal die Funktionsweise von PC2-Fraktionen und damit humanen Mediatoren im Zusammenspiel mit allen anderen Kernproteinen untersucht werden. Dies führte schließlich zu dem überraschenden Ergebnis, daß Mediator in diesem der physiologischen Situation näher kommenden Testsystem nicht nur eine Rolle als Coaktivator, sondern auch als essentieller basaler Transkriptionsfaktor – ähnlich den bereits bekannten GTFs – für die RNA-Polymerase II-Transkription spielt, denn die Depletion von PAQ-Mediator hatte ein fast vollständiges Abschalten der Transkription von Klasse II-Genen zur Folge. Weitere Untersuchungen deuteten auf eine extreme Heterogenität in der Zusammensetzung humaner Mediatoren hin, weshalb im weiteren Verlauf geklärt werden sollte, ob alle oder nur ein spezifischer Mediatorkomplex als essentieller basaler Faktor im Kernextraktssystem seine Wirkung entfaltet. In der Tat waren nur PC2-Fraktionen und ein ganz bestimmter humaner Mediatorkomplex (B-Med), der aus USA bzw. der PC2-Fraktion über eine Kombination von klassischer Säulenchromatographie und Immunaффinitätschromatographie (anti-PAQ-Antikörper) gereinigt werden konnte, in der Lage die basale Transkriptionsfunktion zu vermitteln. B-Med unterschied sich nicht nur funktionell sondern auch strukturell von einer zweiten Zustandsform des humanen Mediators (Med genannt), die im Gegensatz zu USA nicht in der Hochsalzfraktion (0.85 M KCl) einer Phosphocellulose-Säule eluiert, sondern ausgehend von der 0.5 M KCl-Fraktion isoliert werden konnte. Med zeichnet sich dabei insbesondere durch das Vorhandensein eines 95 kDa-Proteins aus, das in B-Med fehlt, während im Gegenzug B-Med exklusiv ein 70 kDa-Protein als Untereinheit besitzt. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß in Säugerzellen außer den bekannten GTFs zusätzlich B-Med als genereller Transkriptionsfaktor für die RNA-Polymerase II fungiert.

Aufgrund der Reinigungsdaten von PAQ (siehe oben) war bereits gezeigt, daß die VP16-Aktivierungsdomäne (VP16-AD) mit humanen Mediatoren interagieren kann. Strukturell und funktionell läßt sich die VP16-AD in die zwischen den einzelnen Herpesviren evolutionär konservierte Subdomäne H2 und die *Herpes simplex*-spezifische Subregion H1 unterteilen. Deshalb sollte unter anderem das Bindungsverhalten von humanen Mediatorkomplexen an H1 und H2 untersucht werden.

Die *in-vitro*-Bindungsstudien konnten eindeutig belegen, daß sowohl H1 als auch H2 *spezifisch* humane Mediatoren rekrutieren, beide Subdomänen allerdings nicht zwischen den beiden Zustandsformen B-Med und Med unterscheiden können. Als Spezifitätskontrolle kamen bei diesem Verfahren H1- bzw. H2-Derivate (H1Mt, H2Mt) zum Einsatz, die Punktmutationen aufweisen, welche die Funktion der beiden Aktivierungsdomänen in Säugerzellen ausschalten. Bestätigt werden konnten dabei die bereits bekannten Interaktionen von GTFs mit H1 und H2 (TFIID, TFIIF, TFIIB) sowie der kompletten VP16-AD (TFIIB). Auch die spezifische Bindung der Histonacetyltransferasen CBP und p300 an die Subdomäne H2, die vor kurzem von unserer Arbeitsgruppe publiziert wurde, konnte reproduziert werden. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal ein spezifisches Bindungsverhalten des Cofaktorkomplexes TFC (,,*TBP-free TAF containing complex*“) an beide Subdomänen der VP16-AD demonstriert werden. Die funktionelle Relevanz dieser Beobachtung wurde *in vitro* und *in vivo* bestätigt.

Während das komplette Wirkungsspektrum der Subdomäne H2 nur in einem *in-vitro*-System mit in Chromatin verpackten Reportergenen in Abhängigkeit von CBP/p300 und Acetyl-CoA gemessen werden kann, ist H1 im Kernextraktssystem mit „nackter“ DNA vollständig aktiv. Das Kontrollprotein H1Mt hingegen weist keinerlei Funktion auf. Da die H1-Funktion mit Fraktionen, welche die bereits evaluierten Interaktoren enthalten, *in vitro* nicht rekonstituiert werden konnte, sollte der Versuch unternommen werden, weitere noch unbekannte Proteine, die direkt mit H1 interagieren, biochemisch zu identifizieren. Dabei gelang die Reinigung und Klonierung eines neuen Polypeptids mit einem apparenten Molekulargewicht von 103 kDa. Das Protein enthält an seinem N-Terminus eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne (Von-Willebrand-Faktor A-Domäne: VWA), die man auch bei Proteinen der Blutgerinnungskaskade und des Komplementsystems, sowie bei Integrinen finden kann. Ein weiteres Charakteristikum ist das Auftreten einer bislang nicht beschriebenen aber in höheren Tieren evolutionär konservierten Domäne, die mit CID („*conserved interesting domain*“) bezeichnet wurde. Deshalb bekam das Protein den vorläufigen Namen VaCID („*VP16-associated protein with conserved interesting domain*“). Eine abschließende Funktionsanalyse für VaCID konnte im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Allerdings spricht die Tatsache, daß VaCID als eine substöchiometrische Komponente von Mediatoren in Kernextrakten humaner Tumorzelllinien auftritt, für eine wichtige Rolle des Proteins im Aktivierungsweg von H1, da es die Interaktion zwischen Mediatoren und H1 erst ermöglicht.

Somit konnten in dieser Arbeit zwei neue Komponenten humaner Mediatorkomplexe beschrieben werden: PAQ, das Orthologe zu Gal11p (Hefe-Mediator) als konstitutive Untereinheit, sowie VaCID als fakultative evolutionär nicht konservierte Komponente, welche die Bindung von Mediatoren an die Subdomäne H1 der VP16-AD vermitteln kann.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Aasland, R., Gibson, T.J. und Stewart, A.F.** (1995) The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 56-59.
- Aasland, R. und Stewart, A.F.** (1995) The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3168-3174.
- Aasland, R., Stewart, A.F. und Gibson, T.** (1996) The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 87-88.
- Abraham, S. und Solomon, W.B.** (2000) A novel glutamine-rich putative transcriptional adaptor protein (TIG-1), preferentially expressed in placental and bone-marrow tissues. *Gene* **255**, 389-400.
- Akhtar, A., Zink, D. und Becker, P.** (2000) Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* **407**, 405-409.
- Akoulitchev, S., Chuikov, S. und Reinberg, D.** (2000) TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* **407**, 102-106.
- Akoulitchev, S., Makela, T.P., Weinberg, R.A. und Reinberg, D.** (1995) Requirement for TFIID kinase activity in transcription by RNA polymerase II. *Nature* **377**, 557-560.
- Albert, T.K., Lemaire, M., van Berkum, N.L., Gentz, R., Collart, M.A. und Timmers, H.T.** (2000) Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic Acids Res.* **28**, 809-817.
- Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L. und Cote, J.** (1999) NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J.* **18**, 5108-5119.
- Althaus, F.R., Hofferer, L., Kleczkowska, H.E., Malanga, M., Naegeli, H., Panzeter, P.L. und Realini, C.A.** (1994) Histone shuttling by poly ADP-ribosylation. *Mol. Cell. Biochem.* **138**, 53-59.
- Asturias, F.J., Jiang, Y.W., Myers, L.C., Gustafsson, C.M. und Kornberg, R.D.** (1999) Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science* **283**, 985-987.
- Ayer, D.E.** (1999) Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol.* **9**, 193-198.
- Baarends, W.M., Hoogerbrugge, J.W., Roest, H.P., Ooms, M., Vreeburg, J., Hoeijmakers, J.H. und Grootegoed, J.A.** (1999) Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* **207**, 322-333.
- Baek, H.J., Malik, S., Qin, J. und Roeder, R.G.** (2002) Requirement of TRAP/mediator for both activator-independent and activator-dependent transcription in conjunction with TFIID-associated TAF(II)s. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2842-2852.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. und Kouzarides, T.** (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-124.
- Baxevanis, A.D.** (2001) The Molecular Biology Database Collection: an updated compilation of biological database resources. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1-10.
- Baxevanis, A.D.** (2002) The Molecular Biology Database Collection: 2002 update. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1-12.
- Bell, A.C., West, A.G. und Felsenfeld, G.** (2001) Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in eukaryotes. *Science* **291**, 447-450.

- Bell, B. und Tora, L.** (1999) Regulation of gene expression by multiple forms of TFIID and other novel TAFII-containing complexes. *Exp. Cell Res.* **246**, 11-19.
- Benedit, P., Paciucci, R., Thomson, T.M., Valeri, M., Nadal, M., Caceres, C., de Torres, I., Estivill, X., Lozano, J.J., Morote, J. und Reventos, J.** (2001) PTOV1, a novel protein overexpressed in prostate cancer containing a new class of protein homology blocks. *Oncogene* **20**, 1455-1464.
- Berti, L., Mittler, G., Przemek, G.K., Stelzer, G., Gunzler, B., Amati, F., Conti, E., Dallapiccola, B., Hrabe de Angelis, M., Novelli, G. und Meisterernst, M.** (2001) Isolation and characterization of a novel gene from the DiGeorge chromosomal region that encodes for a mediator subunit. *Genomics* **74**, 320-332.
- Bhoite, L.T., Yu, Y. und Stillman, D.J.** (2001) The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. *Genes Dev.* **15**, 2457-2469.
- Bickmore, W.A. und Sutherland, H.G.** (2002) NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: Addressing protein localization within the nucleus. *EMBO J* **21**, 1248-1254.
- Booth, V., Koth, C.M., Edwards, A.M. und Arrowsmith, C.H.** (2000) Structure of a conserved domain common to the transcription factors TFIIIS, elongin A, and CRSP70. *J. Biol. Chem.* **275**, 31266-31268.
- Borggreffe, T., Davis, R., Bareket-Samish, A. und Kornberg, R.D.** (2001) Quantitation of the RNA polymerase II transcription machinery in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**, 47150-47153.
- Botta, A., Amati, F. und Novelli, G.** (2001) Causes of the phenotype-genotype dissociation in DiGeorge syndrome: clues from mouse models. *Trends Genet.* **17**, 551-554.
- Boube, M., Faucher, C., Joulia, L., Cribbs, D.L. und Bourbon, H.M.** (2000) Drosophila homologs of transcriptional mediator complex subunits are required for adult cell and segment identity specification. *Genes Dev.* **14**, 2906-2917.
- Boulikas, T.** (1991) Relation between carcinogenesis, chromatin structure and poly(ADP-ribosylation). *Anticancer Res.* **11**, 489-527.
- Boyer, T.G., Martin, M.E., Lees, E., Ricciardi, R.P. und Berk, A.J.** (1999) Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature* **399**, 276-279.
- Bradley, K.A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R.J. und Young, J.A.** (2001) Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* **414**, 225-229.
- Brandsen, J., Werten, S., van der Vliet, P.C., Meisterernst, M., Kroon, J. und Gros, P.** (1997) C-terminal domain of transcription cofactor PC4 reveals dimeric ssDNA binding site. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 900-903.
- Brou, C., Kuhn, A., Staub, A., Chaudhary, S., Grummt, I., Davidson, I. und Tora, L.** (1993) Sequence-specific transactivators counteract topoisomerase II-mediated inhibition of in vitro transcription by RNA polymerases I and II. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4011-4018.
- Brown, C.E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S.C., Carrozza, M.J., Tan, S. und Workman, J.L.** (2001) Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science* **292**, 2333-2337.
- Buck, M., Gallegos, M.T., Studholme, D.J., Guo, Y. und Gralla, J.D.** (2000) The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J. Bacteriol.* **182**, 4129-4136.
- Buermeyer, A.B., Strasheim, L.A., McMahon, S.L. und Farnham, P.J.** (1995) Identification of cis-acting elements that can obviate a requirement for the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **270**, 6798-6807.
- Bultman, S., Gebuhr, T., Yee, D., La Mantia, C., Nicholson, J., Gilliam, A., Randazzo, F., Metzger, D., Chambon, P., Crabtree, G. und Magnuson, T.** (2000) A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol. Cell* **6**, 1287-1295.

- Burakov, D., Crofts, L.A., Chang, C.P. und Freedman, L.P.** (2002) Reciprocal Recruitment of DRIP/Mediator and p160 Coactivator Complexes in Vivo by Estrogen Receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 14359-14362.
- Casadaban, M.J. und Cohen, S.N.** (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**, 179-207.
- Castano, E., Gross, P., Wang, Z., Roeder, R.G. und Oelgeschlager, T.** (2000) The C-terminal domain-phosphorylated IIO form of RNA polymerase II is associated with the transcription repressor NC2 (Dr1/DRAP1) and is required for transcription activation in human nuclear extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 7184-7189.
- Cervellera, M.N. und Sala, A.** (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J. Biol. Chem.* **275**, 10692-10696.
- Chan, H.M. und La Thangue, N.B.** (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell Sci.* **114**, 2363-2373.
- Chang, M., French-Cornay, D., Fan, H.Y., Klein, H., Denis, C.L. und Jaehning, J.A.** (1999) A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1056-1067.
- Chang, M. und Jaehning, J.A.** (1997) A multiplicity of mediators: alternative forms of transcription complexes communicate with transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4861-4865.
- Chang, W.H. und Kornberg, R.D.** (2000) Electron crystal structure of the transcription factor and DNA repair complex, core TFIID. *Cell* **102**, 609-613.
- Chang, Y.W., Howard, S.C., Budovskaya, Y.V., Rine, J. und Herman, P.K.** (2001) The rye mutants identify a role for Ssn/Srb proteins of the RNA polymerase II holoenzyme during stationary phase entry in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**, 17-26.
- Chao, D.M., Gadbois, E.L., Murray, P.J., Anderson, S.F., Sonu, M.S., Parvin, J.D. und Young, R.A.** (1996) A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* **380**, 82-85.
- Chaves, R.S., Herrero, P. und Moreno, F.** (1999) Med8, a subunit of the mediator CTD complex of RNA polymerase II, directly binds to regulatory elements of SUC2 and HXK2 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 345-350.
- Cheung, P., Allis, C.D. und Sassone-Corsi, P.** (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**, 263-271.
- Cho, H., Kim, T.K., Mancebo, H., Lane, W.S., Flores, O. und Reinberg, D.** (1999) A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev.* **13**, 1540-1552.
- Cho, H., Maldonado, E. und Reinberg, D.** (1997) Affinity purification of a human RNA polymerase II complex using monoclonal antibodies against transcription factor IIF. *J. Biol. Chem.* **272**, 11495-11502.
- Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y. und Reinberg, D.** (1998) A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5355-5363.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Cokol, M., Nair, R. und Rost, B.** (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.* **1**, 411-415.
- Collart, M.A. und Struhl, K.** (1994) NOT1(CDC39), NOT2(CDC36), NOT3, and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. *Genes Dev.* **8**, 525-537.

- Collins, I., Weber, A. und Levens, D.** (2001) Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8437-8451.
- Conaway, J.W., Shilatifard, A., Dvir, A. und Conaway, R.C.** (2000) Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 375-380.
- Cosma, M.P., Panizza, S. und Nasmyth, K.** (2001) Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. *Mol. Cell* **7**, 1213-1220.
- Courey, A.J. und Jia, S.** (2001) Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev.* **15**, 2786-2796.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R. und Kornberg, R.D.** (2000) Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* **288**, 640-649.
- Crosio, C., Fimia, G.M., Loury, R., Kimura, M., Okano, Y., Zhou, H., Sen, S., Allis, C.D. und Sassone-Corsi, P.** (2002) Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 874-885.
- Dal Peraro, M., Alber, F. und Carloni, P.** (2001) Ser133 phosphate-KIX interactions in the CREB-CBP complex: an ab initio molecular dynamics study. *Eur. Biophys. J.* **30**, 75-81.
- Dallas, P.B., Pacchione, S., Wilsker, D., Bowrin, V., Kobayashi, R. und Moran, E.** (2000) The human SWI-SNF complex protein p270 is an ARID family member with non-sequence-specific DNA binding activity. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3137-3146.
- Dantoni, J.C., Wurtz, J.M., Poch, O., Moras, D. und Tora, L.** (1999) The TBP-like factor: an alternative transcription factor in metazoa? *Trends Biochem. Sci.* **24**, 335-339.
- De Decker, H.P. und Lawrenson, J.B.** (2001) The 22q11.2 deletion: from diversity to a single gene theory. *Genet. Med.* **3**, 2-5.
- Del Sal, G., Manfioletti, G. und Schneider, C.** (1988) A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9878.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. und Roeder, R.G.** (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475-1489.
- Dotson, M.R., Yuan, C.X., Roeder, R.G., Myers, L.C., Gustafsson, C.M., Jiang, Y.W., Li, Y., Kornberg, R.D. und Asturias, F.J.** (2000) Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 14307-14310.
- Douziech, M., Forget, D., Greenblatt, J. und Coulombe, B.** (1999) Topological localization of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II in the initiation complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 19868-19873.
- Dujon, B.** (1996) The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet.* **12**, 263-270.
- Dvir, A., Conaway, J.W. und Conaway, R.C.** (2001) Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 209-214.
- Dynlacht, B.D., Hoey, T. und Tjian, R.** (1991) Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* **66**, 563-576.
- Eastman, Q. und Grosschedl, R.** (1999) Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 233-240.
- Eckert, R.L. und Green, H.** (1986) Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell* **46**, 583-589.
- Edwards, Y.J. und Perkins, S.J.** (1995) The protein fold of the von Willebrand factor type A domain is predicted to be similar to the open twisted beta-sheet flanked by alpha-helices found in human ras-p21. *FEBS Lett.* **358**, 283-286.

- Edwards, Y.J. und Perkins, S.J.** (1996) Assessment of protein fold predictions from sequence information: the predicted alpha/beta doubly wound fold of the von Willebrand factor type A domain is similar to its crystal structure. *J. Mol. Biol.* **260**, 277-285.
- Ejkova, E. und Tansey, W.P.** (2002) Old dogs and new tricks: Meeting on mechanisms of eukaryotic transcription. *EMBO Rep.* **3**, 219-223.
- Emsley, J., Cruz, M., Handin, R. und Liddington, R.** (1998) Crystal structure of the von Willebrand Factor A1 domain and implications for the binding of platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* **273**, 10396-10401.
- Epstein, J.A.** (2001) Developing models of DiGeorge syndrome. *Trends Genet.* **17**, 13-17.
- Ernst, P., Wang, J., Huang, M., Goodman, R.H. und Korsmeyer, S.J.** (2001) MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2249-2258.
- Farrell, M.J., Stadt, H., Wallis, K.T., Scambler, P., Hixon, R.L., Wolfe, R., Leatherbury, L. und Kirby, M.L.** (1999) HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is required for cardiac outflow tract septation. *Circ. Res.* **84**, 127-135.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**, 266-267.
- Ferguson, H.A., Kugel, J.F. und Goodrich, J.A.** (2001) Kinetic and mechanistic analysis of the RNA polymerase II transcription reaction at the human interleukin-2 promoter. *J. Mol. Biol.* **314**, 993-1006.
- Fernandez, L.A., Winkler, M. und Grosschedl, R.** (2001) Matrix attachment region-dependent function of the immunoglobulin mu enhancer involves histone acetylation at a distance without changes in enhancer occupancy. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 196-208.
- Fiedler, U. und Marc Timmers, H.T.** (2000) Peeling by binding or twisting by cranking: models for promoter opening and transcription initiation by RNA polymerase II. *Bioessays* **22**, 316-326.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. und Mello, C.C.** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Flanagan, P.M., Kelleher, R.J., 3rd, Sayre, M.H., Tschochner, H. und Kornberg, R.D.** (1991) A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature* **350**, 436-438.
- Fondell, J.D., Ge, H. und Roeder, R.G.** (1996) Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8329-8333.
- Fong, Y.W. und Zhou, Q.** (2001) Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* **414**, 929-933.
- Francastel, C., Schubeler, D., Martin, D.I. und Groudine, M.** (2000) Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**, 137-143.
- Frangioni, J.V., LaRiccia, L.M., Cantley, L.C. und Montminy, M.R.** (2000) Minimal activators that bind to the KIX domain of p300/CBP identified by phage display screening. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1080-1085.
- Fried, M. und Crothers, D.M.** (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6505-6525.
- Fujigasaki, H., Martin, J.J., De Deyn, P.P., Camuzat, A., Deffond, D., Stevanin, G., Dermaut, B., Van Broeckhoven, C., Durr, A. und Brice, A.** (2001) CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes autosomal dominant cerebellar ataxia. *Brain* **124**, 1939-1947.
- Fukuda, A., Yamauchi, J., Wu, S.Y., Chiang, C.M., Muramatsu, M. und Hisatake, K.** (2001) Reconstitution of recombinant TFIIH that can mediate activator-dependent transcription. *Genes Cells* **6**, 707-719.
- Fyodorov, D.V. und Kadonaga, J.T.** (2001) The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription. *Cell* **106**, 523-525.

- Gamble, M.J. und Freedman, L.P.** (2002) A coactivator code for transcription. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 165-167.
- Gangloff, Y.G., Romier, C., Thuault, S., Werten, S. und Davidson, I.** (2001) The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 250-257.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. und Superti-Furga, G.** (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147.
- Ge, H. und Roeder, R.G.** (1994a) The high mobility group protein HMG1 can reversibly inhibit class II gene transcription by interaction with the TATA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 17136-17140.
- Ge, H. und Roeder, R.G.** (1994b) Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes. *Cell* **78**, 513-523.
- Ge, H., Si, Y. und Roeder, R.G.** (1998a) Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *EMBO J.* **17**, 6723-6729.
- Ge, H., Si, Y. und Wolffe, A.P.** (1998b) A novel transcriptional coactivator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2. *Mol. Cell* **2**, 751-759.
- Gill, S.C. und von Hippel, P.H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gim, B.S., Park, J.M., Yoon, J.H., Kang, C. und Kim, Y.J.** (2001) Drosophila Med6 is required for elevated expression of a large but distinct set of developmentally regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5242-5255.
- Giniger, E. und Ptashne, M.** (1987) Transcription in yeast activated by a putative amphipathic alpha helix linked to a DNA binding unit. *Nature* **330**, 670-672.
- Gold, M.O., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Rice, A.P. und Herrmann, C.H.** (1996) Viral transactivators E1A and VP16 interact with a large complex that is associated with CTD kinase activity and contains CDK8. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3771-3777.
- Goodrich, J.A., Hoey, T., Thut, C.J., Admon, A. und Tjian, R.** (1993) Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell* **75**, 519-530.
- Goppelt, A., Stelzer, G., Lottspeich, F. und Meisterernst, M.** (1996) A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. *EMBO J.* **15**, 3105-3116.
- Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L. und Workman, J.L.** (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* **11**, 1640-1650.
- Grapes, M. und O'Hare, P.** (2000) Differences in determinants required for complex formation and transactivation in related VP16 proteins. *J. Virol.* **74**, 10112-10121.
- Gromoller, A. und Lehming, N.** (2000a) Srb7p is a physical and physiological target of Tup1p. *EMBO J.* **19**, 6845-6852.
- Gromoller, A. und Lehming, N.** (2000b) Srb7p is essential for the activation of a subset of genes. *FEBS Lett.* **484**, 48-54.

- Grozinger, C.M., Hassig, C.A. und Schreiber, S.L.** (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4868-4873.
- Gruss, C., Gutierrez, C., Burhans, W.C., DePamphilis, M.L., Koller, T. und Sogo, J.M.** (1990) Nucleosome assembly in mammalian cell extracts before and after DNA replication. *EMBO J.* **9**, 2911-2922.
- Gu, W., Malik, S., Ito, M., Yuan, C.X., Fondell, J.D., Zhang, X., Martinez, E., Qin, J. und Roeder, R.G.** (1999) A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Mol. Cell* **3**, 97-108.
- Guris, D.L., Fantes, J., Tara, D., Druker, B.J. und Imamoto, A.** (2001) Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat. Genet.* **27**, 293-298.
- Guschin, D. und Wolffe, A.P.** (1999) SWItched-on mobility. *Curr. Biol.* **9**, 742-746.
- Gustafsson, C.M., Myers, L.C., Beve, J., Spahr, H., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Kornberg, R.D.** (1998) Identification of new mediator subunits in the RNA polymerase II holoenzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 30851-30854.
- Gustafsson, C.M. und Samuelsson, T.** (2001) Mediator--a universal complex in transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* **41**, 1-8.
- Halle, J.P., Haus-Seuffert, P., Woltering, C., Stelzer, G. und Meisterernst, M.** (1997) A conserved tissue-specific structure at a human T-cell receptor beta-chain core promoter. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4220-4229.
- Halle, J.P., Stelzer, G., Goppelt, A. und Meisterernst, M.** (1995) Activation of transcription by recombinant upstream stimulatory factor 1 is mediated by a novel positive cofactor. *J. Biol. Chem.* **270**, 21307-21311.
- Hampsey, M.** (1998) Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 465-503.
- Hampsey, M. und Reinberg, D.** (1999) RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 132-139.
- Han, S.J., Lee, J.S., Kang, J.S. und Kim, Y.J.** (2001) Med9/Cse2 and Gal11 modules are required for transcriptional repression of distinct group of genes. *J. Biol. Chem.* **276**, 37020-37026.
- Han, S.J., Lee, Y.C., Gim, B.S., Ryu, G.H., Park, S.J., Lane, W.S. und Kim, Y.J.** (1999) Activator-specific requirement of yeast mediator proteins for RNA polymerase II transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 979-988.
- Hanahan, D.** (1985) *Techniques for transformation of E. coli*. IRL press at Oxford University press, Oxford, U.K.
- Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F.R.** (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**, 63-113.
- Harlow, E. und Lane, D.** (1999) *Using antibodies: a laboratory manual*. CSHL press, Cold Spring Harbor, New York.
- Harrison, S.C.** (1991) A Structural Taxonomy of DNA-Binding Domains. *Nature* **353**, 715-719.
- Hassa, P.O., Covic, M., Hasan, S., Imhof, R. und Hottiger, M.O.** (2001) The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J. Biol. Chem.* **276**, 45588-45597.
- Hassan, A.H., Neely, K.E. und Workman, J.L.** (2001) Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* **104**, 817-827.
- Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.M., Wilson, C.J., Koh, S.S. und Young, R.A.** (1998) Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin- dependent kinases. *Mol. Cell* **2**, 43-53.

- Henkel, T., Ling, P.D., Hayward, S.D. und Peterson, M.G.** (1994) Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* **265**, 92-95.
- Hirose, Y. und Manley, J.L.** (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* **14**, 1415-1429.
- Hoffmann, A. und Roeder, R.G.** (1991) Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6337-6338.
- Holloway, A.F., Occhiodoro, F., Mittler, G., Meisterernst, M. und Shannon, M.F.** (2000) Functional interaction between the HIV transactivator Tat and the transcriptional coactivator PC4 in T cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 21668-21677.
- Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S. und Young, R.A.** (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**, 717-728.
- Hölzel, M., Kohlhuber, F., Schlosser, I., Holz, D., Luscher, B. und Eick, D.** (2001) Myc/Max/Mad regulate the frequency but not the duration of productive cell cycles. *EMBO Rep.* **2**, 1125-1132.
- Howard, S.C., Chang, Y.W., Budovskaya, Y.V. und Herman, P.K.** (2001) The Ras/PKA signaling pathway of *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a functional interaction with the Sin4p complex of the RNA polymerase II holoenzyme. *Genetics* **159**, 77-89.
- Hsieh, M., Tintut, Y. und Gralla, J.D.** (1994) Functional roles for the glutamines within the glutamine-rich region of the transcription factor sigma 54. *J. Biol. Chem.* **269**, 373-378.
- Hughes, R.E., Lo, R.S., Davis, C., Strand, A.D., Neal, C.L., Olson, J.M. und Fields, S.** (2001) Altered transcription in yeast expressing expanded polyglutamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 13201-13206.
- Huizinga, E.G., Martijn van der Plas, R., Kroon, J., Sixma, J.J. und Gros, P.** (1997) Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure* **5**, 1147-1156.
- Ido, E. und Hayami, M.** (1997) Construction of T-tailed vectors derived from a pUC plasmid: a rapid system for direct cloning of unmodified PCR products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1766-1767.
- Ikeda, K., Halle, J.P., Stelzer, G., Meisterernst, M. und Kawakami, K.** (1998) Involvement of negative cofactor NC2 in active repression by zinc finger-homeodomain transcription factor AREB6. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 10-18.
- Ikeda, K., Steger, D.J., Eberharter, A. und Workman, J.L.** (1999) Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 855-863.
- Ikeda, K., Stuehler, T. und Meisterernst, M.** (2002) The H1 and H2 regions of the activation domain of herpes simplex virion protein 16 stimulate transcription through distinct molecular mechanisms. *Genes Cells* **7**, 49-58.
- Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J. und Nakatani, Y.** (2000) Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* **102**, 463-473.
- Imafuku, I., Waragai, M., Takeuchi, S., Kanazawa, I., Kawabata, M., Mouradian, M.M. und Okazawa, H.** (1998) Polar amino acid-rich sequences bind to polyglutamine tracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 16-20.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaerberlein, M. und Guarente, L.** (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800.
- Ingles, C.J., Shales, M., Cress, W.D., Triezenberg, S.J. und Greenblatt, J.** (1991) Reduced binding of TFIID to transcriptionally compromised mutants of VP16. *Nature* **351**, 588-590.

- Ito, M., Yuan, C.X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J.D., Yamamura, S., Fu, Z.Y., Zhang, X., Qin, J. und Roeder, R.G.** (1999) Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol. Cell* **3**, 361-370.
- Jenkins, B.D., Pullen, C.B. und Darimont, B.D.** (2001) Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 122-126.
- Jenkins, P.V., Pasi, K.J. und Perkins, S.J.** (1998) Molecular modeling of ligand and mutation sites of the type A domains of human von Willebrand factor and their relevance to von Willebrand's disease. *Blood* **91**, 2032-2044.
- Jenuwein, T.** (2001) Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol.* **11**, 266-273.
- Jenuwein, T. und Allis, C.D.** (2001) Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
- Jeong, C.J., Yang, S.H., Xie, Y., Zhang, L., Johnston, S.A. und Kodadek, T.** (2001) Evidence that Gal11 protein is a target of the Gal4 activation domain in the mediator. *Biochemistry* **40**, 9421-9427.
- Jerome, L.A. und Papaioannou, V.E.** (2001) DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat. Genet.* **27**, 286-291.
- Jiang, Y.W., Veschambre, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Conaway, J.W., Conaway, R.C. und Kornberg, R.D.** (1998) Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 8538-8543.
- Jones, D.T. und Swindells, M.B.** (2002) Getting the most from PSI-BLAST. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 161-164.
- Kadener, S., Cramer, P., Nogues, G., Cazalla, D., de la Mata, M., Fededa, J.P., Werbajh, S.E., Srebrow, A. und Kornblihtt, A.R.** (2001) Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *EMBO J.* **20**, 5759-5768.
- Kaiser, K. und Meisterernst, M.** (1996) The human general co-factors. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 342-345.
- Kaiser, K., Stelzer, G. und Meisterernst, M.** (1995) The coactivator p15 (PC4) initiates transcriptional activation during TFIIA-TFIID-promoter complex formation. *EMBO J.* **14**, 3520-3527.
- Kamada, K., Shu, F., Chen, H., Malik, S., Stelzer, G., Roeder, R.G., Meisterernst, M. und Burley, S.K.** (2001) Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. *Cell* **106**, 71-81.
- Kang, J.S., Kim, S.H., Hwang, M.S., Han, S.J., Lee, Y.C. und Kim, Y.J.** (2001) The structural and functional organization of the yeast mediator complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 42003-42010.
- Kannan, P. und Tainsky, M.A.** (1999) Coactivator PC4 mediates AP-2 transcriptional activity and suppresses ras-induced transformation dependent on AP-2 transcriptional interference. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 899-908.
- Kannan, P., Yu, Y., Wankhade, S. und Tainsky, M.A.** (1999) PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res.* **27**, 866-874.
- Karn, J.** (1999) Tackling Tat. *J. Mol. Biol.* **293**, 235-254.
- Kazantsev, A., Preisinger, E., Dranovsky, A., Goldgaber, D. und Housman, D.** (1999) Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11404-11409.
- Kazantsev, A., Walker, H.A., Slepko, N., Bear, J.E., Preisinger, E., Steffan, J.S., Zhu, Y.Z., Gertler, F.B., Housman, D.E., Marsh, J.L. und Thompson, L.M.** (2002) A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. *Nat. Genet.* **30**, 367-376.
- Kee, B.L., Arias, J. und Montminy, M.R.** (1996) Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J. Biol. Chem.* **271**, 2373-2375.

- Kegel, K.B., Meloni, A.R., Yi, Y., Kim, Y.J., Doyle, E., Cuiffo, B.G., Sapp, E., Wang, Y., Qin, Z.H., Chen, J.D., Nevins, J.R., Aronin, N. und DiFiglia, M. (2002) Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 7466-7476.
- Kennison, J.A. und Tamkun, J.W. (1988) Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 8136-8140.
- Khochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C. und Seigneurin-Berny, D. (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 162-166.
- Kim, J.B. und Sharp, P.A. (2001) Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 12317-12323.
- Kim, T.K., Ebright, R.H. und Reinberg, D. (2000) Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIIH. *Science* **288**, 1418-1422.
- Kim, Y.-J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayer, M.H. und Kornberg, R.D. (1994) A Multiprotein Mediator of Transcriptional Activation and its Interaction with the C-Terminal Repeat Domain of RNA Polymerase II. *Cell* **77**, 599-608.
- Kingston, R.E. und Narlikar, G.J. (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* **13**, 2339-2352.
- Klochender-yeivin, A., Muchardt, C. und Yaniv, M. (2002) SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 73-79.
- Koh, S.S., Ansari, A.Z., Ptashne, M. und Young, R.A. (1998) An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell* **1**, 895-904.
- Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* **351**, 289-305.
- Komarnitsky, P., Cho, E.J. und Buratowski, S. (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.* **14**, 2452-2460.
- Krebs, J.E., Fry, C.J., Samuels, M.L. und Peterson, C.L. (2000) Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell* **102**, 587-598.
- Kretschmar, M., Kaiser, K., Lottspeich, F. und Meisterernst, M. (1994a) A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators. *Cell* **78**, 525-534.
- Kretschmar, M., Meisterernst, M. und Roeder, R.G. (1993) Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 11508-11512.
- Kretschmar, M., Stelzer, G., Roeder, R.G. und Meisterernst, M. (1994b) RNA Polymerase II cofactor PC2 facilitates activation of transcription by GAL4-AH in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3927-3937.
- Kugel, J.F. und Goodrich, J.A. (2000) A kinetic model for the early steps of RNA synthesis by human RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **275**, 40483-40491.
- Kwon, J.Y., Kim-Ha, J., Lee, B.J. und Lee, J. (2001) The MED-7 transcriptional mediator encoded by let-49 is required for gonad and germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* **508**, 305-308.
- Kwon, J.Y. und Lee, J. (2001) Biological significance of a universally conserved transcription mediator in metazoan developmental signaling pathways. *Development* **128**, 3095-3104.
- Kwon, J.Y., Park, J.M., Gim, B.S., Han, S.J., Lee, J. und Kim, Y.J. (1999) *Caenorhabditis elegans* mediator complexes are required for developmental-specific transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14990-14995.

- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landt, O., Grunert, H.P. und Hahn, U.** (1990) A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* **96**, 125-128.
- Längst, G. und Becker, P.B.** (2001) Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J. Cell Sci.* **114**, 2561-2568.
- Lee, D. und Lis, J.T.** (1998) Transcriptional activation independent of TFIIF kinase and the RNA polymerase II mediator in vivo. *Nature* **393**, 389-392.
- Lee, D.K., Kim, S. und Lis, J.T.** (1999a) Different upstream transcriptional activators have distinct coactivator requirements. *Genes Dev.* **13**, 2934-2939.
- Lee, H., Mok, K.H., Muhandiram, R., Park, K.H., Suk, J.E., Kim, D.H., Chang, J., Sung, Y.C., Choi, K.Y. und Han, K.H.** (2000) Local structural elements in the mostly unstructured transcriptional activation domain of human p53. *J. Biol. Chem.* **275**, 29426-29432.
- Lee, J.O., Bankston, L.A., Arnaout, M.A. und Liddington, R.C.** (1995a) Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* **3**, 1333-1340.
- Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A. und Liddington, R.** (1995b) Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **80**, 631-638.
- Lee, K.C. und Lee Kraus, W.** (2001) Nuclear receptors, coactivators and chromatin: new approaches, new insights. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 191-197.
- Lee, T.I., Wyrick, J.J., Koh, S.S., Jennings, E.G., Gadbois, E.L. und Young, R.A.** (1998) Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4455-4462.
- Lee, T.I. und Young, R.A.** (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 77-137.
- Lee, Y.C., Min, S., Gim, B.S. und Kim, Y.J.** (1997) A transcriptional mediator protein that is required for activation of many RNA polymerase II promoters and is conserved from yeast to humans. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4622-4632.
- Lee, Y.C., Park, J.M., Min, S., Han, S.J. und Kim, Y.J.** (1999b) An activator binding module of yeast RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2967-2976.
- Leipe, D.D. und Landsman, D.** (1997) Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolyamine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3693-3697.
- Lemaire, M., Xie, J., Meisterernst, M. und Collart, M.A.** (2000) The NC2 repressor is dispensable in yeast mutated for the Sin4p component of the holoenzyme and plays roles similar to Mot1p in vivo. *Mol. Microbiol.* **36**, 163-173.
- Lemon, B., Inouye, C., King, D.S. und Tjian, R.** (2001) Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription. *Nature* **414**, 924-928.
- Lemon, B. und Tjian, R.** (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* **14**, 2551-2569.
- Leo, C. und Chen, J.D.** (2000) The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* **245**, 1-11.
- Li, S.H., Cheng, A.L., Zhou, H., Lam, S., Rao, M., Li, H. und Li, X.J.** (2002) Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1277-1287.
- Li, Y., Bjorklund, S., Jiang, Y.W., Kim, Y.J., Lane, W.S., Stillman, D.J. und Kornberg, R.D.** (1995) Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10864-10868.

- Li, Y. und Kornberg, R.D.** (1994) Interplay of positive and negative effectors in function of the C- terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 2362-2366.
- Lin, Y.-S., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D. und Green, M.R.** (1991) Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature* **353**, 569-571.
- Lindsay, E.A., Vitelli, F., Su, H., Morishima, M., Huynh, T., Pramparo, T., Jurecic, V., Ogunrinu, G., Sutherland, H.F., Scambler, P.J., Bradley, A. und Baldini, A.** (2001) Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* **410**, 97-101.
- Liu, H.Y., Chiang, Y.C., Pan, J., Chen, J., Salvatore, C., Audino, D.C., Badarinarayana, V., Palaniswamy, V., Anderson, B. und Denis, C.L.** (2001a) Characterization of CAF4 and CAF16 reveals a functional connection between the CCR4-NOT complex and a subset of SRB proteins of the RNA polymerase II holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **276**, 7541-7548.
- Liu, J., Akoulitchev, S., Weber, A., Ge, H., Chuikov, S., Libutti, D., Wang, X.W., Conaway, J.W., Harris, C.C., Conaway, R.C., Reinberg, D. und Levens, D.** (2001b) Defective interplay of activators and repressors with TFIH in xeroderma pigmentosum. *Cell* **104**, 353-363.
- Liu, R., Liu, H., Chen, X., Kirby, M., Brown, P.O. und Zhao, K.** (2001c) Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell* **106**, 309-318.
- Liu, Y., Gong, W., Huang, C.C., Herr, W. und Cheng, X.** (1999) Crystal structure of the conserved core of the herpes simplex virus transcriptional regulatory protein VP16. *Genes Dev.* **13**, 1692-1703.
- Liu, Y., Ranish, J.A., Aebersold, R. und Hahn, S.** (2001d) Yeast nuclear extract contains two major forms of RNA polymerase II mediator complexes. *J. Biol. Chem.* **276**, 7169-7175.
- Lo, W.S., Duggan, L., Tolga, N.C., Emre, Belotserkovskaya, R., Lane, W.S., Shiekhhattar, R. und Berger, S.L.** (2001) Snf1 - a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* **293**, 1142-1146.
- Lorch, Y., Beve, J., Gustafsson, C.M., Myers, L.C. und Kornberg, R.D.** (2000) Mediator-nucleosome interaction. *Mol. Cell* **6**, 197-201.
- Lorch, Y., Zhang, M. und Kornberg, R.D.** (2001) RSC unravels the nucleosome. *Mol. Cell* **7**, 89-95.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. und Richmond, T.J.** (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- Luger, K. und Richmond, T.J.** (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 140-146.
- Magnaghi, P., Roberts, C., Lorain, S., Lipinski, M. und Scambler, P.J.** (1998) HIRA, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional co-repressors, interacts with Pax3. *Nat. Genet.* **20**, 74-77.
- Maldonado, E., Shiekhhattar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C.W., Linn, S. und Reinberg, D.** (1996) A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* **381**, 86-89.
- Malik, S., Gu, W., Wu, W., Qin, J. und Roeder, R.G.** (2000) The USA-derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol. Cell* **5**, 753-760.
- Malik, S. und Roeder, R.G.** (2000) Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 277-283.
- Maniatis, T. und Reed, R.** (2002) An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**, 499-506.
- Mannervik, M., Nibu, Y., Zhang, H. und Levine, M.** (1999) Transcriptional coregulators in development. *Science* **284**, 606-609.

- Marmorstein, R. und Roth, S.Y.** (2001) Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 155-161.
- Martin, D.I.** (2001) Transcriptional enhancers--on/off gene regulation as an adaptation to silencing in higher eukaryotic nuclei. *Trends Genet.* **17**, 444-448.
- Martinez, E., Palhan, V.B., Tjernberg, A., Lymar, E.S., Gamper, A.M., Kundu, T.K., Chait, B.T. und Roeder, R.G.** (2001) Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6782-6795.
- Masino, L., Kelly, G., Leonard, K., Trottier, Y. und Pastore, A.** (2002) Solution structure of polyglutamine tracts in GST-polyglutamine fusion proteins. *FEBS Lett.* **513**, 267-272.
- Matsui, T., Segall, J., Weil, P.A. und Roeder, R.G.** (1980) Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **255**, 11992-11996.
- McBride, A.E. und Silver, P.A.** (2001) State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* **106**, 5-8.
- McCampbell, A., Taye, A.A., Whitty, L., Penney, E., Steffan, J.S. und Fischbeck, K.H.** (2001) Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 15179-15184.
- McCampbell, A., Taylor, J.P., Taye, A.A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G. und Fischbeck, K.H.** (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2197-2202.
- McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D. und Cole, M.D.** (1998) The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* **94**, 363-374.
- McPherson, J.D., Marra, M., Hillier, L., Waterston, R.H., Chinwalla, A., Wallis, J., Sekhon, M., Wylie, K., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Fulton, R., Kucaba, T.A., Wagner-McPherson, C., Barbazuk, W.B., Gregory, S.G., Humphray, S.J., French, L., Evans, R.S., Bethel, G., Whittaker, A., Holden, J.L., McCann, O.T., Dunham, A., Soderlund, C., Scott, C.E., Bentley, D.R., Schuler, G., Chen, H.C., Jang, W., Green, E.D., Idol, J.R., Maduro, V.V., Montgomery, K.T., Lee, E., Miller, A., Emerling, S., Kucherlapati, Gibbs, R., Scherer, S., Gorrell, J.H., Sodergren, E., Clerc-Blankenburg, K., Tabor, P., Naylor, S., Garcia, D., de Jong, P.J., Catanese, J.J., Nowak, N., Osoegawa, K., Qin, S., Rowen, L., Madan, A., Dors, M., Hood, L., Trask, B., Friedman, C., Massa, H., Cheung, V.G., Kirsch, I.R., Reid, T., Yonescu, R., Weissenbach, J., Bruls, T., Heilig, R., Branscomb, E., Olsen, A., Doggett, N., Cheng, J.F., Hawkins, T., Myers, R.M., Shang, J., Ramirez, L., Schmutz, J., Velasquez, O., Dixon, K., Stone, N.E., Cox, D.R., Haussler, D., Kent, W.J., Furey, T., Rogic, S., Kennedy, S., Jones, S., Rosenthal, A., Wen, G., Schilhabel, M., Gloeckner, G., Nyakatura, G., Siebert, R., Schlegelberger, B., Korenberg, J., Chen, X.N., Fujiyama, A., Hattori, M., Toyoda, A., Yada, T., Park, H.S., Sakaki, Y., Shimizu, N., Asakawa, S., Kawasaki, K., Sasaki, T., Shintani, A., Shimizu, A., Shibuya, K., Kudoh, J., Minoshima, S., Ramser, J., Seranski, P., Hoff, C., Poustka, A., Reinhardt, R. und Lehrach, H.** (2001) A physical map of the human genome. *Nature* **409**, 934-941.
- Meininghaus, M. und Eick, D.** (1999) Requirement of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II for the transcriptional activation of chromosomal c-fos and hsp70A genes. *FEBS Lett.* **446**, 173-176.
- Meisterernst, M.** (2002) Transcription. Mediator meets morpheus. *Science* **295**, 984-985.
- Meisterernst, M. und Roeder, R.G.** (1991) Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. *Cell* **67**, 557-567.

- Meisterernst, M., Roy, A.L., Lieu, H.M. und Roeder, R.G.** (1991) Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell* **66**, 981-993.
- Meisterernst, M., Stelzer, G. und Roeder, R.G.** (1997) Poly(ADP-ribose) polymerase enhances activator-dependent transcription in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 2261-2265.
- Merienne, K., Pannetier, S., Harel-Bellan, A. und Sassone-Corsi, P.** (2001) Mitogen-regulated RSK2-CBP interaction controls their kinase and acetylase activities. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7089-7096.
- Merino, A., Madden, K.R., Lane, W.S., Champoux, J.J. und Reinberg, D.** (1993) DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature* **365**, 227-232.
- Merscher, S., Funke, B., Epstein, J.A., Heyer, J., Puech, A., Lu, M.M., Xavier, R.J., Demay, M.B., Russell, R.G., Factor, S., Tokooya, K., Jore, B.S., Lopez, M., Pandita, R.K., Lia, M., Carrion, D., Xu, H., Schorle, H., Kobler, J.B., Scambler, P., Wynshaw-Boris, A., Skoultschi, A.I., Morrow, B.E. und Kucherlapati, R.** (2001) TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* **104**, 619-629.
- Michelitsch, M.D. und Weissman, J.S.** (2000) A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 11910-11915.
- Miroux, B. und Walker, J.E.** (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289-298.
- Mitsiou, D.J. und Stunnenberg, H.G.** (2000) TAC, a TBP-sans-TAFs complex containing the unprocessed TFIIAalpha precursor and the TFIIAgamma subunit. *Mol. Cell* **6**, 527-537.
- Mittler, G., Kremmer, E., Timmers, H.T. und Meisterernst, M.** (2001) Novel critical role of a human Mediator complex for basal RNA polymerase II transcription. *EMBO Rep.* **2**, 808-813.
- Miyamoto, T., Kakizawa, T. und Hashizume, K.** (1999) Inhibition of nuclear receptor signalling by poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2644-2649.
- Molinari, E., Gilman, M. und Natesan, S.** (1999) Proteasome-mediated degradation of transcriptional activators correlates with activation domain potency in vivo. *EMBO J.* **18**, 6439-6447.
- Mondal, N. und Parvin, J.D.** (2001) DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature* **413**, 435-438.
- Mueller, C.L. und Jaehning, J.A.** (2002) Ctr9, Rtf1, and Leo1 are components of the Paf1/RNA polymerase II complex. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1971-1980.
- Muller, C. und Leutz, A.** (2001) Chromatin remodeling in development and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 167-174.
- Muller, F., Lakatos, L., Dantonel, J., Strahle, U. und Tora, L.** (2001) TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in zebrafish. *Curr. Biol.* **11**, 282-287.
- Myer, V.E. und Young, R.A.** (1998) RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J. Biol. Chem.* **273**, 27757-27760.
- Myers, L.C., Gustafsson, C.M., Bushnell, D.A., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Kornberg, R.D.** (1998) The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* **12**, 45-54.
- Myers, L.C., Gustafsson, C.M., Hayashibara, K.C., Brown, P.O. und Kornberg, R.D.** (1999) Mediator protein mutations that selectively abolish activated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 67-72.
- Myers, L.C. und Kornberg, R.D.** (2000) Mediator of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 729-749.

- Näär, A.M., Beurang, P.A., Robinson, K.M., Oliner, J.D., Avizonis, D., Scheek, S., Zwicker, J., Kadonaga, J.T. und Tjian, R. (1998) Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev.* **12**, 3020-3031.
- Näär, A.M., Beurang, P.A., Zhou, S., Abraham, S., Solomon, W. und Tjian, R. (1999) Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature* **398**, 828-832.
- Näär, A.M., Lemon, B.D. und Tjian, R. (2001) Transcriptional coactivator complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 475-501.
- Nakamura, K., Jeong, S.Y., Uchihara, T., Anno, M., Nagashima, K., Nagashima, T., Ikeda, S., Tsuji, S. und Kanazawa, I. (2001) SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1441-1448.
- Nasrin, N., Ogg, S., Cahill, C.M., Biggs, W., Nui, S., Dore, J., Calvo, D., Shi, Y., Ruvkun, G. und Alexander-Bridges, M.C. (2000) DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 10412-10417.
- Neely, K.E., Hassan, A.H., Brown, C.E., Howe, L. und Workman, J.L. (2002) Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1615-1625.
- Nemes, Z., Marekov, L.N. und Steinert, P.M. (1999) Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. Binding to membranes directs residue specificity. *J. Biol. Chem.* **274**, 11013-11021.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Nicot, C., Mahieux, R., Pise-Masison, C., Brady, J., Gessain, A., Yamaoka, S. und Franchini, G. (2001) Human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax represses c-Myb-dependent transcription through activation of the NF-kappaB pathway and modulation of coactivator usage. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7391-7402.
- Nie, Z., Xue, Y., Yang, D., Zhou, S., Deroo, B.J., Archer, T.K. und Wang, W. (2000) A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8879-8888.
- Nilsson, L., Tiensuu, T. und Tuck, S. (2000) *Caenorhabditis elegans* lin-25: a study of its role in multiple cell fate specification events involving Ras and the identification and characterization of evolutionarily conserved domains. *Genetics* **156**, 1083-1096.
- Nishizawa, M. (2001) Negative regulation of transcription by the yeast global transcription factors, Gal11 and Sin4. *Yeast* **18**, 1099-1110.
- Novelli, G., Amati, F. und Dallapiccola, B. (2000) Individual haploinsufficient loci and the complex phenotype of DiGeorge syndrome. *Mol. Med. Today* **6**, 10-11.
- Novina, C.D. und Roy, A.L. (1996) Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet.* **12**, 351-355.
- Ogbourne, S. und Antalis, T.M. (1998) Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.* **331**, 1-14.
- Okazawa, H., Sudol, M. und Rich, T. (2001) PQBP-1 (Np/PQ): a polyglutamine tract-binding and nuclear inclusion-forming protein. *Brain Res. Bull.* **56**, 273-280.

- Olivier, M., Aggarwal, A., Allen, J., Almendras, A.A., Bajorek, E.S., Beasley, E.M., Brady, S.D., Bushard, J.M., Bustos, V.I., Chu, A., Chung, T.R., De Witte, A., Denys, M.E., Dominguez, R., Fang, N.Y., Foster, B.D., Freudenberg, R.W., Hadley, D., Hamilton, L.R., Jeffrey, T.J., Kelly, L., Lazzeroni, L., Levy, M.R., Lewis, S.C., Liu, X., Lopez, F.J., Louie, B., Marquis, J.P., Martinez, R.A., Matsuura, M.K., Misherghi, N.S., Norton, J.A., Olshen, A., Perkins, S.M., Perou, A.J., Piercy, C., Piercy, M., Qin, F., Reif, T., Sheppard, K., Shokoohi, V., Smick, G.A., Sun, W.L., Stewart, E.A., Fernando, J., Tejada, Tran, N.M., Trejo, T., Vo, N.T., Yan, S.C., Zierten, D.L., Zhao, S., Sachidanandam, R., Trask, B.J., Myers, R.M. und Cox, D.R. (2001) A high-resolution radiation hybrid map of the human genome draft sequence. *Science* **291**, 1298-1302.
- Orlando, V. (2000) Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 99-104.
- Orphanides, G. und Reinberg, D. (2000) RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* **407**, 471-475.
- Oswald, F., Tauber, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., Liptay, S. und Schmid, R.M. (2001) p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7761-7774.
- Pabo, C.O. und Sauer, R.T. (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1053-1095.
- Papamichos-Chronakis, M., Conlan, R.S., Gounalaki, N., Copf, T. und Tzamarias, D. (2000) Hrs1/Med3 is a Cyc8-Tup1 corepressor target in the RNA polymerase II holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 8397-8403.
- Park, J.M., Gim, B.S., Kim, J.M., Yoon, J.H., Kim, H.S., Kang, J.G. und Kim, Y.J. (2001a) Drosophila Mediator complex is broadly utilized by diverse gene-specific transcription factors at different types of core promoters. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2312-2323.
- Park, J.M., Werner, J., Kim, J.M., Lis, J.T. und Kim, Y.J. (2001b) Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock. *Mol. Cell* **8**, 9-19.
- Parker, D., Ferreri, K., Nakajima, T., LaMorte, V.J., Evans, R., Koerber, S.C., Hoeger, C. und Montminy, M.R. (1996) Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 694-703.
- Parker, D., Jhala, U.S., Radhakrishnan, I., Yaffe, M.B., Reyes, C., Shulman, A.I., Cantley, L.C., Wright, P.E. und Montminy, M. (1998) Analysis of an activator:coactivator complex reveals an essential role for secondary structure in transcriptional activation. *Mol. Cell* **2**, 353-359.
- Parker, D., Rivera, M., Zor, T., Henrion-Caude, A., Radhakrishnan, I., Kumar, A., Shapiro, L.H., Wright, P.E., Montminy, M. und Brindle, P.K. (1999) Role of secondary structure in discrimination between constitutive and inducible activators. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5601-5607.
- Pereira, L.A., van der Knaap, J.A., van den Boom, V., van den Heuvel, F.A. und Timmers, H.T. (2001) TAF(II)170 interacts with the concave surface of TATA-binding protein to inhibit its DNA binding activity. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7523-7534.
- Perutz, M.F. (1996) Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 848-858.
- Perutz, M.F. (1999) Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 58-63.
- Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M. und Finch, J.T. (1994) Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5355-5358.

- Perutz, M.F. und Windle, A.H.** (2001) Cause of neural death in neurodegenerative diseases attributable to expansion of glutamine repeats. *Nature* **412**, 143-144.
- Peterson, C.L.** (2000) ATP-dependent chromatin remodeling: going mobile. *FEBS Lett.* **476**, 68-72.
- Pham, A.D. und Sauer, F.** (2000) Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* **289**, 2357-2360.
- Ping, Y.H. und Rana, T.M.** (2001) DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation. *J. Biol. Chem.* **276**, 12951-12958.
- Pognonec, P., Kato, H., Sumimoto, H., Kretzschmar, M. und Roeder, R.G.** (1991) A quick procedure for purification of functional recombinant proteins over-expressed in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6650.
- Pope, B. und Kent, H.M.** (1996) High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 536-537.
- Preston, C.M. und McFarlane, M.** (1998) Cytodifferentiating agents affect the replication of herpes simplex virus type 1 in the absence of functional VP16. *Virology* **249**, 418-426.
- Price, D.H.** (2000) P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2629-2634.
- Proudfoot, N.** (2000) Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 290-293.
- Proudfoot, N.J.** (2001) Genetic dangers in poly(A) signals. *EMBO Rep.* **2**, 891-892.
- Proudfoot, N.J., Furger, A. und Dye, M.J.** (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**, 501-512.
- Ptashne, M. und Gann, A.A.** (1990) Activators and targets. *Nature* **346**, 329-331.
- Quinn, J., Fyrberg, A.M., Ganster, R.W., Schmidt, M.C. und Peterson, C.L.** (1996) DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex. *Nature* **379**, 844-847.
- Rachez, C. und Freedman, L.P.** (2001) Mediator complexes and transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 274-280.
- Rachez, C., Lemon, B.D., Suldan, Z., Bromleigh, V., Gamble, M., Naar, A.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Freedman, L.P.** (1999) Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* **398**, 824-828.
- Rachez, C., Suldan, Z., Ward, J., Chang, C.P., Burakov, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Freedman, L.P.** (1998) A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* **12**, 1787-1800.
- Radhakrishnan, I., Perez-Alvarado, G.C., Parker, D., Dyson, H.J., Montminy, M.R. und Wright, P.E.** (1997) Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions. *Cell* **91**, 741-752.
- Ranish, J.A., Yudkovsky, N. und Hahn, S.** (1999) Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIB. *Genes Dev.* **13**, 49-63.
- Regier, J.L., Shen, F. und Triezenberg, S.J.** (1993) Pattern of aromatic and hydrophobic amino acids critical for one of two subdomains of the VP16 transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 883-887.

- Reinberg, D., Orphanides, G., Ebricht, R., Akoulitchev, S., Carcamo, J., Cho, H., Cortes, P., Drapkin, R., Flores, O., Ha, I., Inostroza, J.A., Kim, S., Kim, T.K., Kumar, P., Lagrange, T., LeRoy, G., Lu, H., Ma, D.M., Maldonado, E., Merino, A., Mermelstein, F., Olave, I., Sheldon, M., Shiekhatar, R., Zawel, L. und et al.** (1998) The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**, 83-103.
- Rice, J.C. und Allis, C.D.** (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 263-273.
- Riou, P., Bex, F. und Gazzolo, L.** (2000) The human T cell leukemia/lymphotropic virus type 1 Tax protein represses MyoD-dependent transcription by inhibiting MyoD-binding to the KIX domain of p300. A potential mechanism for Tax-mediated repression of the transcriptional activity of basic helix-loop-helix factors. *J. Biol. Chem.* **275**, 10551-10560.
- Roberts, S.M. und Winston, F.** (1997) Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/Mediator complexes. *Genetics* **147**, 451-465.
- Roeder, R.G.** (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 327-335.
- Roeder, R.G. und Rutter, W.J.** (1969) Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* **224**, 234-237.
- Ross, D.A. und Kadesch, T.** (2001) The notch intracellular domain can function as a coactivator for LEF-1. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7537-7544.
- Roth, S.Y., Denu, J.M. und Allis, C.D.** (2001) Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81-120.
- Rubinsztein, D.C.** (2002) Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet.* **18**, 202-209.
- Ryu, S. und Tjian, R.** (1999) Purification of transcription cofactor complex CRSP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7137-7142.
- Ryu, S., Zhou, S., Ladurner, A.G. und Tjian, R.** (1999) The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* **397**, 446-450.
- Sadler, J.E.** (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 395-424.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sakurai, H. und Fukasawa, T.** (1998) Functional correlation among Gal11, transcription factor (TF) IIE, and TFIIE in *Saccharomyces cerevisiae*. Gal11 and TFIIE cooperatively enhance TFIIE-mediated phosphorylation of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain sequences. *J. Biol. Chem.* **273**, 9534-9538.
- Salghetti, S.E., Caudy, A.A., Chenoweth, J.G. und Tansey, W.P.** (2001) Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* **293**, 1651-1653.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanders, S.L. und Weil, P.A.** (2000) Identification of two novel TAF subunits of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* TFIID complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 13895-13900.
- Sauer, F., Fondell, J.D., Ohkuma, Y., Roeder, R.G. und Jackle, H.** (1995) Control of transcription by Kruppel through interactions with TFIIB and TFIIE beta. *Nature* **375**, 162-164.
- Sawadogo, M. und Roeder, R.G.** (1985) Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: Analysis by a rapid and quantitative in vitro assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 4349-4398.

- Scambler, P.J.** (2000) The 22q11 deletion syndromes. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2421-2426.
- Schang, L.M., Hwang, G.J., Dynlacht, B.D., Speicher, D.W., Bantly, A., Schaffer, P.A., Shilatifard, A., Ge, H. und Shiekhattar, R.** (2000) Human PC4 is a substrate-specific inhibitor of RNA polymerase II phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 6071-6074.
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U.H. und Eick, D.** (2001) The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res.* **29**, 397-406.
- Schuler, G.D.** (1997) Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J. Mol. Med.* **75**, 694-698.
- Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemercier, C., Garin, J., Rousseaux, S. und Khochbin, S.** (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8035-8044.
- Shaywitz, A.J., Dove, S.L., Kornhauser, J.M., Hochschild, A. und Greenberg, M.E.** (2000) Magnitude of the CREB-dependent transcriptional response is determined by the strength of the interaction between the kinase-inducible domain of CREB and the KIX domain of CREB-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 9409-9422.
- Sheffield, P., Garrard, S. und Derewenda, Z.** (1999) Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. *Protein Expr. Purif.* **15**, 34-39.
- Shi, X., Chang, M., Wolf, A.J., Chang, C.H., Frazer-Abel, A.A., Wade, P.A., Burton, Z.F. und Jaehning, J.A.** (1997) Cdc73p and Paf1p are found in a novel RNA polymerase II-containing complex distinct from the Srbp-containing holoenzyme. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1160-1169.
- Shimohata, T., Nakajima, T., Yamada, M., Uchida, C., Onodera, O., Naruse, S., Kimura, T., Koide, R., Nozaki, K., Sano, Y., Ishiguro, H., Sakoe, K., Ooshima, T., Sato, A., Ikeuchi, T., Oyake, M., Sato, T., Aoyagi, Y., Hozumi, I., Nagatsu, T., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Goto, J., Kanazawa, I., Davidson, I., Tanese, N., Takahashi, H. und Tsuji, S.** (2000) Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nat. Genet.* **26**, 29-36.
- Silverman, N. und Maniatis, T.** (2001) NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* **15**, 2321-2342.
- Singh, N. und Han, M.** (1995) sur-2, a novel gene, functions late in the let-60 ras-mediated signaling pathway during *Caenorhabditis elegans* vulval induction. *Genes Dev.* **9**, 2251-2265.
- Slatko, B.E.** (1994) Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol. Biol.* **31**, 35-45.
- Smiley, J.R. und Duncan, J.** (1997) Truncation of the C-terminal acidic transcriptional activation domain of herpes simplex virus VP16 produces a phenotype similar to that of the in1814 linker insertion mutation. *J. Virol.* **71**, 6191-6193.
- Smith, J.** (1999) T-box genes: what they do and how they do it. *Trends Genet.* **15**, 154-158.
- Smith, R.L. und Johnson, A.D.** (2000) Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 325-330.
- Solari, F. und Ahringer, J.** (2000) NURD-complex genes antagonise Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **10**, 223-226.
- Soutoglou, E. und Talianidis, I.** (2002) Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* **295**, 1901-1904.
- Spahr, H., Beve, J., Larsson, T., Bergstrom, J., Karlsson, K.A. und Gustafsson, C.M.** (2000) Purification and characterization of RNA polymerase II holoenzyme from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **275**, 1351-1356.

- Spahr, H., Samuelsen, C.O., Baraznenok, V., Ernest, I., Huylebroeck, D., Remacle, J.E., Samuelsson, T., Kieselbach, T., Holmberg, S. und Gustafsson, C.M.** (2001) Analysis of *Schizosaccharomyces pombe* mediator reveals a set of essential subunits conserved between yeast and metazoan cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 11985-11990.
- Spencer, V.A. und Davie, J.R.** (1999) Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* **240**, 1-12.
- Stafford, G.A. und Morse, R.H.** (2001) GCN5 dependence of chromatin remodeling and transcriptional activation by the GAL4 and VP16 activation domains in budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4568-4578.
- Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E. und Thompson, L.M.** (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6763-6768.
- Stelzer, G., Goppelt, A., Lottspeich, F. und Meisterernst, M.** (1994) Repression of Basal Transcription by HMG2 Is Counteracted by TFIIH-Associated Factors in an ATP-Dependent Process. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4712-4721.
- Stillier, J.W. und Hall, B.D.** (2002) Evolution of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6091-6096.
- Stillier, J.W., McConaughy, B.L. und Hall, B.D.** (2000) Evolutionary complementation for polymerase II CTD function. *Yeast* **16**, 57-64.
- Strahl, B.D. und Allis, C.D.** (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Struhl, K.** (2001) Gene regulation. A paradigm for precision. *Science* **293**, 1054-1055.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Sudarsanam, P. und Winston, F.** (2000) The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet.* **16**, 345-351.
- Sumi-Ichinose, C., Ichinose, H., Metzger, D. und Chambon, P.** (1997) SNF2beta-BRG1 is essential for the viability of F9 murine embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5976-5986.
- Sun, X., Zhang, Y., Cho, H., Rickert, P., Lees, E., Lane, W. und Reinberg, D.** (1998) NAT, a human complex containing Srb polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription. *Mol. Cell* **2**, 213-222.
- Taatjes, D.J., Naar, A.M., Andel, F., 3rd, Nogales, E. und Tjian, R.** (2002) Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* **295**, 1058-1062.
- Tal-Singer, R., Pichyangkura, R., Chung, E., Lasner, T.M., Randazzo, B.P., Trojanowski, J.Q., Fraser, N.W. und Triezenberg, S.J.** (1999) The transcriptional activation domain of VP16 is required for efficient infection and establishment of latency by HSV-1 in the murine peripheral and central nervous systems. *Virology* **259**, 20-33.
- Tan, P.B. und Kim, S.K.** (1999) Signaling specificity: the RTK/RAS/MAP kinase pathway in metazoans. *Trends Genet.* **15**, 145-149.
- Thomas, J.O. und Kornberg, R.D.** (1975) An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 2626-2630.
- Thompson, J.D., Plewniak, F. und Poch, O.** (1999) A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2682-2690.

- Treisman, J.** (2001) Drosophila homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development* **128**, 603-615.
- Treisman, J.E.** (1999) A conserved blueprint for the eye? *Bioessays* **21**, 843-850.
- Trumpp, A., Refaeli, Y., Oskarsson, T., Gasser, S., Murphy, M., Martin, G.R. und Bishop, J.M.** (2001) c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature* **414**, 768-773.
- Uesugi, M., Nyanguile, O., Lu, H., Levine, A.J. und Verdine, G.L.** (1997) Induced alpha helix in the VP16 activation domain upon binding to a human TAF. *Science* **277**, 1310-1313.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. und Rothberg, J.M.** (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-627.
- Usuka, J., Zhu, W. und Brendel, V.** (2000) Optimal spliced alignment of homologous cDNA to a genomic DNA template. *Bioinformatics* **16**, 203-211.
- Utlely, R.T., Ikeda, K., Grant, P.A., Cote, J., Steger, D.J., Eberharter, A., John, S. und Workman, J.L.** (1998) Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* **394**, 498-502.
- van Lohuizen, M.** (1999) The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 355-361.
- Varga-Weisz, P.D. und Becker, P.B.** (1998) Chromatin-remodeling factors: machines that regulate? *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 346-353.
- Veenstra, G.J., Weeks, D.L. und Wolffe, A.P.** (2000) Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in *Xenopus*. *Science* **290**, 2312-2315.
- Vermeulen, W., Rademakers, S., Jaspers, N.G., Appeldoorn, E., Raams, A., Klein, B., Kleijer, W.J., Hansen, L.K. und Hoeijmakers, J.H.** (2001) A temperature-sensitive disorder in basal transcription and DNA repair in humans. *Nat. Genet.* **27**, 299-303.
- Verrijzer, C.P. und Tjian, R.** (1996) TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 338-342.
- Vignali, M., Hassan, A.H., Neely, K.E. und Workman, J.L.** (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1899-1910.
- Wade, P.A. und Wolffe, A.P.** (1999) Transcriptional regulation: SWItching circuitry. *Curr. Biol.* **9**, 221-224.
- Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P. und Zhang, Y.** (2001) Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol. Cell* **8**, 1207-1217.
- Waragai, M., Lammers, C.H., Takeuchi, S., Imafuku, I., Udagawa, Y., Kanazawa, I., Kawabata, M., Mouradian, M.M. und Okazawa, H.** (1999) PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 977-987.
- Weil, P.A., Luse, D.S., Segall, J. und Roeder, R.G.** (1979) Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* **18**, 469-484.
- Werten, S., Stelzer, G., Goppelt, A., Langen, F.M., Gros, P., Timmers, H.T., Van der Vliet, P.C. und Meisterernst, M.** (1998) Interaction of PC4 with melted DNA inhibits transcription. *EMBO J.* **17**, 5103-5111.

- West, M.L. und Corden, J.L.** (1995) Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations. *Genetics* **140**, 1223-1233.
- Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X. und Tora, L.** (1998) Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* **393**, 187-191.
- Wiemann, S., Weil, B., Wellenreuther, R., Gassenhuber, J., Glassl, S., Ansorge, W., Bocher, M., Blocker, H., Bauersachs, S., Blum, H., Lauber, J., Dusterhofs, A., Beyer, A., Kohrer, K., Strack, N., Mewes, H.W., Ottenwalder, B., Obermaier, B., Tampe, J., Heubner, D., Wambutt, R., Korn, B., Klein, M. und Poustka, A.** (2001) Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs. *Genome Res.* **11**, 422-435.
- Winkler, G.S., Vermeulen, W., Coin, F., Egly, J.M., Hoeijmakers, J.H. und Weeda, G.** (1998) Affinity purification of human DNA repair/transcription factor TFIIH using epitope-tagged xeroderma pigmentosum B protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 1092-1098.
- Wu, J. und Grunstein, M.** (2000) 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 619-623.
- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C.J. und et al.** (1994) Binding of basal transcription factor TFIIH to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7013-7024.
- Xie, J., Collart, M., Lemaire, M., Stelzer, G. und Meisterernst, M.** (2000) A single point mutation in TFIIA suppresses NC2 requirement in vivo. *EMBO J.* **19**, 672-682.
- Xiong, J.P., Li, R., Essafi, M., Stehle, T. und Arnaout, M.A.** (2000) An isoleucine-based allosteric switch controls affinity and shape shifting in integrin CD11b A-domain. *J. Biol. Chem.* **275**, 38762-38767.
- Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B.M., Montminy, M. und Evans, R.M.** (2001) A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* **294**, 2507-2511.
- Xue, Y., Canman, J.C., Lee, C.S., Nie, Z., Yang, D., Moreno, G.T., Young, M.K., Salmon, E.D. und Wang, W.** (2000) The human SWI/SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13015-13020.
- Yamagishi, H., Garg, V., Matsuoka, R., Thomas, T. und Srivastava, D.** (1999) A molecular pathway revealing a genetic basis for human cardiac and craniofacial defects. *Science* **283**, 1158-1161.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J. und Handa, H.** (1999) NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* **97**, 41-51.
- Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., McMahon, S.B., Cole, M.D., Tora, L., Takahashi, N. und Kato, S.** (2002) Nuclear Receptor Function Requires a TFIIIC-Type Histone Acetyl Transferase Complex. *Mol. Cell* **9**, 553-562.
- Yang, T., Davis, R.J. und Chow, C.W.** (2001) Requirement of two NFATc4 transactivation domains for CBP potentiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 39569-39576.
- Yang, X.M.** (1992) Optimization of a cultivation process for recombinant protein production by *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **23**, 271-289.
- Yu, Y., Eriksson, P. und Stillman, D.J.** (2000) Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2350-2357.
- Yuan, C.X., Ito, M., Fondell, J.D., Fu, Z.Y. und Roeder, R.G.** (1998) The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7939-7944.

- Yudkovsky, N., Logie, C., Hahn, S. und Peterson, C.L.** (1999) Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev.* **13**, 2369-2374.
- Yudkovsky, N., Ranish, J.A. und Hahn, S.** (2000) A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* **408**, 225-229.
- Zaman, Z., Ansari, A.Z., Koh, S.S., Young, R. und Ptashne, M.** (2001) Interaction of a transcriptional repressor with the RNA polymerase II holoenzyme plays a crucial role in repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 2550-2554.
- Zeng, Q., Morales, A.J. und Cottarel, G.** (2001) Fungi and humans: closer than you think. *Trends Genet.* **17**, 682-684.
- Zhang, H. und Emmons, S.W.** (2000) A *C. elegans* mediator protein confers regulatory selectivity on lineage-specific expression of a transcription factor gene. *Genes Dev.* **14**, 2161-2172.
- Zhang, H. und Emmons, S.W.** (2001) The novel *C. elegans* gene *sop-3* modulates Wnt signaling to regulate Hox gene expression. *Development* **128**, 767-777.
- Zhang, H. und Emmons, S.W.** (2002) *Caenorhabditis elegans* *unc-37/groucho* Interacts Genetically With Components of the Transcriptional Mediator Complex. *Genetics* **160**, 799-803.
- Zhang, W., Nisbet, J.W., Albrecht, B., Ding, W., Kashanchi, F., Bartoe, J.T. und Lairmore, M.D.** (2001) Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) regulates gene transcription by binding CREB binding protein/p300. *J. Virol.* **75**, 9885-9895.
- Zhang, Y. und Reinberg, D.** (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**, 2343-2360.
- Zhou, M., Halanski, M.A., Radonovich, M.F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D.H. und Brady, J.N.** (2000) Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol* **20**, 5077-5086.
- Zhu, H., Joliot, V. und Prywes, R.** (1994) Role of transcription factor TFIIF in serum response factor-activated transcription. *J. Biol. Chem.* **269**, 3489-3497.
- Zilahi, E., Miklos, I. und Sipiczki, M.** (2000) The *Schizosaccharomyces pombe* *sep15+* gene encodes a protein homologous to the Med8 subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional mediator complex. *Curr. Genet.* **38**, 227-232.
- Zlatanova, J. und van Holde, K.** (1998) Binding to four-way junction DNA: a common property of architectural proteins? *FASEB J.* **12**, 421-431.

## 8. Anhang

### 8.1. TAF-enthaltende Komplexe: die TFIID- und SAGA-Familie

Komplexe	mit TBP		ohne TBP			
	yTFIID	hTFIID	ySAGA	hTFTC	hPCAF	hSTAGA
HAT, Bromodomäne	yTAF <sub>II</sub> 145 (130)	hTAF <sub>II</sub> 250	-	-	-	-
	TSM1	hTAF <sub>II</sub> 150	-	hTAF <sub>II</sub> 150	ND	ND
HFD	yTAF <sub>II</sub> 48	hTAF <sub>II</sub> 135	-	hTAF <sub>II</sub> 135	-	-
WD40 "repeats"	yTAF <sub>II</sub> 90	hTAF <sub>II</sub> 100	yTAF <sub>II</sub> 90	hTAF <sub>II</sub> 100	-	-
<u>HFD</u> (H4)	yTAF <sub>II</sub> 60	hTAF <sub>II</sub> 80(70)	yTAF <sub>II</sub> 60	hTAF <sub>II</sub> 80	-	-
	yTAF <sub>II</sub> 67	hTAF <sub>II</sub> 55	-	hTAF <sub>II</sub> 55?	ND	ND
HFD	yTAF <sub>II</sub> 65	Taube Nuß/ Prodos ?	-	Taube Nuß/ Prodos ?	ND	ND
HFD	yTAF <sub>II</sub> 47	hTAF <sub>II</sub> 140/BIP2	-	ND	ND	ND
<u>HFD</u> (H3)	yTAF <sub>II</sub> 17 (20)	hTAF <sub>II</sub> 31(32)	yTAF <sub>II</sub> 17	hTAF <sub>II</sub> 31	hTAF <sub>II</sub> 31	hTAF <sub>II</sub> 31
HFD	yTAF <sub>II</sub> 25	hTAF <sub>II</sub> 30	yTAF <sub>II</sub> 25	hTAF <sub>II</sub> 30	hTAF <sub>II</sub> 30	hTAF <sub>II</sub> 30
<u>HFD</u>	yTAF <sub>II</sub> 40	hTAF <sub>II</sub> 28	-	-	ND	ND
HFD	yTAF <sub>II</sub> 68 (61)	hTAF <sub>II</sub> 20(15)	yTAF <sub>II</sub> 68	hTAF <sub>II</sub> 20	hTAF <sub>II</sub> 20	hTAF <sub>II</sub> 20
<u>HFD</u> (H4)	yTAF <sub>II</sub> 19(FUN81)	hTAF <sub>II</sub> 18	-	-	ND	-
	yTBP	hTBP	-	-	-	-
HAT, Bromodomäne			yGCN5	hGCN5-L	PCAF	hGCN5-L
HFD			yADA1	ND	ND	hADA1
			yADA2	-	hADA2	ND
			yADA3	hADA3	hADA3	hADA3
HFD			ySPT3	hSPT3	hSPT3	hSPT3
HFD, Bromodomäne			ySPT7	hSPT7-like	ND	hSPT7-like
			ySPT8	ND	ND	ND
			ySPT20	ND	ND	ND
			ND	PAF65 $\alpha$	PAF65 $\alpha$	PAF65 $\alpha$
WD40 "repeats"			ND	PAF65 $\beta$	PAF65 $\beta$	PAF65 $\beta$
			yTra1	TRRAP	TRRAP	TRRAP
$\beta$ -Propeller-Struktur			ND	SAP130	SAP130	SAP130
				KIA0017	KIA0017	KIA0017
			yMed4*			
			ySin4*	hMed6*		
				hMed7*		

**Tab. 9:** Die TFIID- und SAGA-Familie TAF<sub>II</sub>-enthaltender Komplexe. Die jeweiligen Hefe(y)- bzw. humanen(h) Untereinheiten sind angegeben, wenn bekannt. HFD ("*histone fold domain*"); HAT (Histonacetyltransferase); ND (nicht getestet); \* nicht publiziert; die Information über SAGA kommt von P. Grant (University of Virginia Medical School, Charlottesville, VA), über TFTC von L. Tora (IGBMC, Illkirch/Strasbourg).

## 8.2. Mediatorkomplexe

### 8.2.1. Der Hefe-Mediator: Funktion und Homologiebeziehungen der Untereinheiten

Untereinheit der Bäckerhefe	Humane Untereinheit	Essentielles Gen	Subkomplex/Modul	Funktion
Rgr1	CRSP150, ARC150, DRIP150, TRAP170	ja	Rgr1-Subkomplex	Gerüst, positiv und negativ (Glucose-Repression, z.B., von <i>SUC2</i> ), Tup1p-Zielmolekül
Med4	TRAP36, DRIP36, ARC36	ja	Rgr1-Subkomplex; Med9 Modul	negativ
Med7	CRSP33, hMed7, ARC34, DRIP34	ja	Rgr1-Subcomplex; Med10-Modul	Gerüst
Srb7	hSrb7	ja	Rgr1-Subkomplex; Med10-Modul	Tup1p-Zielmolekül; Gerüst; wird für die Transkription von ca. 30% aller Hefegene benötigt
Med10/Nut2	hMed10, hNut2	ja	Rgr1-Subkomplex; Med10-Modul	positiv
Med6	DRIP33, ARC33, hMed6	ja	Srb4-Subkomplex	positiv; essentiell für Aktivierung; wird für die Transkription von ca. 10% aller Hefegene benötigt
Srb4	TRAP80, DRIP77, ARC77, CRSP77,	ja	Srb4-Subkomplex	positiv; Gal4p-Interaktion; wird für die Transkription von über 90% aller Hefegene benötigt
Med8	ARC32	ja	Srb4-Subkomplex	DNA-bindend (UAS & DRS); „Forkhead“-DNA-Bindungsdomäne; Verbindung zum Ubiquitin-Signalweg
Rox3	???	ja	Srb4-Subkomplex	RNA-Polymerase II-Interaktion? Regulation der Stressantwort
Med11	???	ja	Srb4-Subkomplex	positiv
Srb6	???	ja	Srb4-Subkomplex	positiv

Untereinheit der Bäckerhefe	Humane Untereinheit	Essentielles Gen	Subkomplex/Modul	Funktion
Gal11	PAQ	nein	Rgr1-Subkomplex; Gal11-Modul; PAF-Komplex	überwiegend positiv aber auch negativ TFIIE-Interaktion
Med3/Hrs1/Pgd3	???	nein	Rgr1-Subkomplex; Gal11-Modul	positiv und negativ, Gal4p-Bindung; Gcn4p-Bindung; Tup1p-Zielmolekül; Suppressor von temperatursensitiver Mutante in mitochondrialer RNA-Polymerase
Med2	???	nein	Rgr1-Subkomplex; Gal11-modul	nötig für Funktion von Aktivatoren
Sin4	???	nein	Rgr1-Subkomplex; Gal11-Modul	positiv & negativ, potentielle SAGA- Untereinheit
Med9/Cse2	???	nein	Rgr1-Subkomplex; Med9-Modul	negativ; bLeuZIP-Domäne
Med1	???	nein	Rgr1-Subkomplex; Med9-Modul	positiv; negativ reguliert von Srb10/11
Srb10	Cdk8	nein	Srb8-11-Komplex	überwiegend negativ aber auch positiv
Srb11	Cyclin C	nein	Srb8-11-Komplex	überwiegend negativ aber auch positiv
Srb8	TRAP230	nein	Srb8-11-Komplex	negativ
Srb9	???	nein	Srb8-11-Komplex	negativ
Srb2	???	nein	Srb4-Subkomplex	positiv; wichtig für Stabilität des Mediators und PIC- Bildung ( <i>in vitro</i> )
Srb5	???	nein	Srb4-Subkomplex	positiv; wichtig für Initiation und Stabilität des Mediators ( <i>in vitro</i> )

Untereinheit der Bäckerhefe	Humane Untereinheit	Essentielles Gen	Subkomplex/Modul	Funktion
Nut1		nein	Srb8-11-Komplex?	negative Regulation des <i>HO</i> -Gens; HAT-Aktivität
Bdf1	p96/Ring3-ähnliche Kinase (Maus-Mediator)	nein	?	Kinase; homolog zur Kinasefunktion von humanem TAF <sub>II</sub> 250
Soh1	hSoh1 (TRAP/SMCC)	nein	?	Suppressor von <i>hpr1Δ1</i> (Hyperrekombinationsphänotyp)

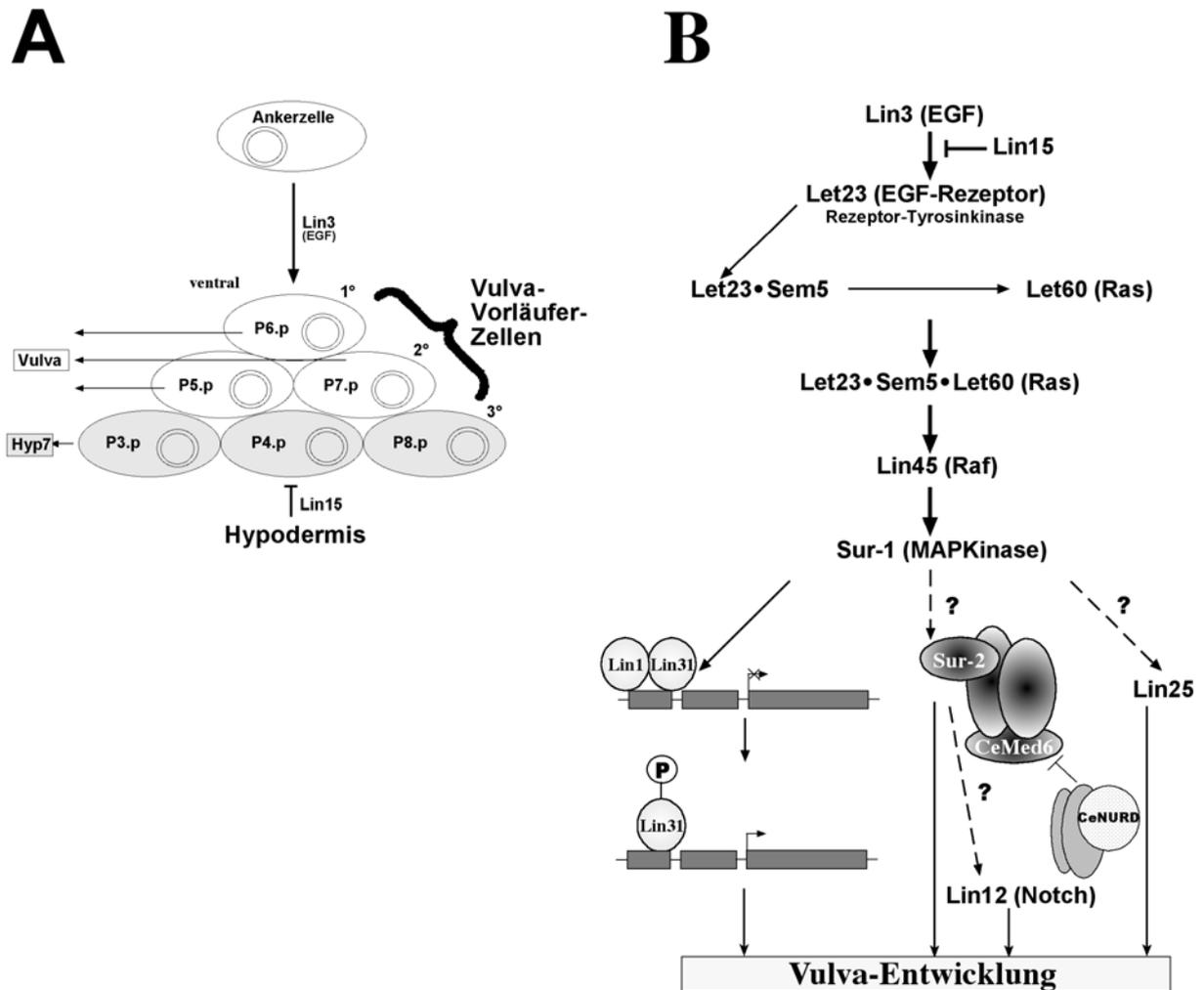
**Tab. 10:** Funktion der Untereinheiten des Mediator Komplexes aus *S. cerevisiae* und Homologiebeziehungen zu humanen Mediatoren. Die Charakterisierung als essentielles bzw. nicht-essentielles Gen beruht auf genetischen Daten, die unter idealen vegetativen Wachstumsbedingungen in der Logphase der Bäckerhefe gewonnen wurden. Orthologe bzw. homologe Proteine aus dem Menschen oder der Maus sind aufgeführt, wenn bekannt. Die (potentiellen) Funktionen wurden aufgrund molekulargenetischer Untersuchungen postuliert.

### 8.2.2. Der Mediator der Tauf liege: Zugriffsnummern für die NCBI-Datenbank

dARC105/PCQAP (CG4184); dTRAP26/TRFP (CG18267), dARC32/MED8 (CG13867); dTRAP95 (CG5465); dDRIP130/SUR-2 (CG3695); dRGR1 (CG12031); dTRAP36/MED4 (CG8609); dTRAP100 (CG7999); dCDK8 (CG10572); dMED10/NUT2 (CG5057); dTRAP230/SRB8 (CG8491); *pap*/dTRAP240 (CG9936); dTRAP220 (CG7162); dTRAP18/SOH1 (CG1057); dTRAP37/CRSP34 (CG1245); dMED6 (CG9473); dMED7 (CG6529); dCYC\_C/SRB11 (CG7281); dTRAP80/SRB4 (CG7957); dARC42 (CG4703); dARC92/VaCID (CG12254); dARC70 (CG1793); dCRSP70 (CG8117); dSRB7 (CG17397); dDRIP97 (CG12254), *p28b* (T12679).

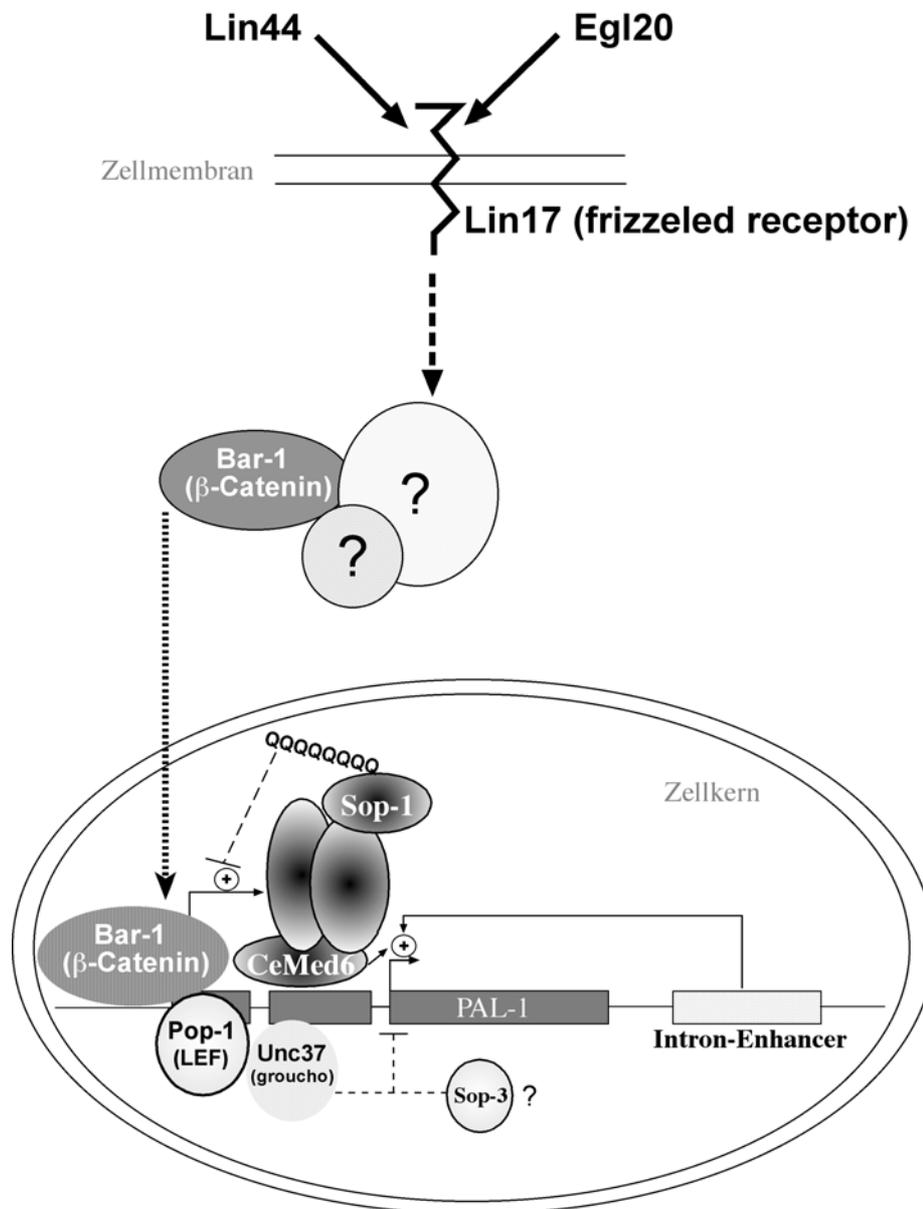
## 8.3. Mediator und Signaltransduktion

### 8.3.1. Der Ras-Signalweg und Mediator



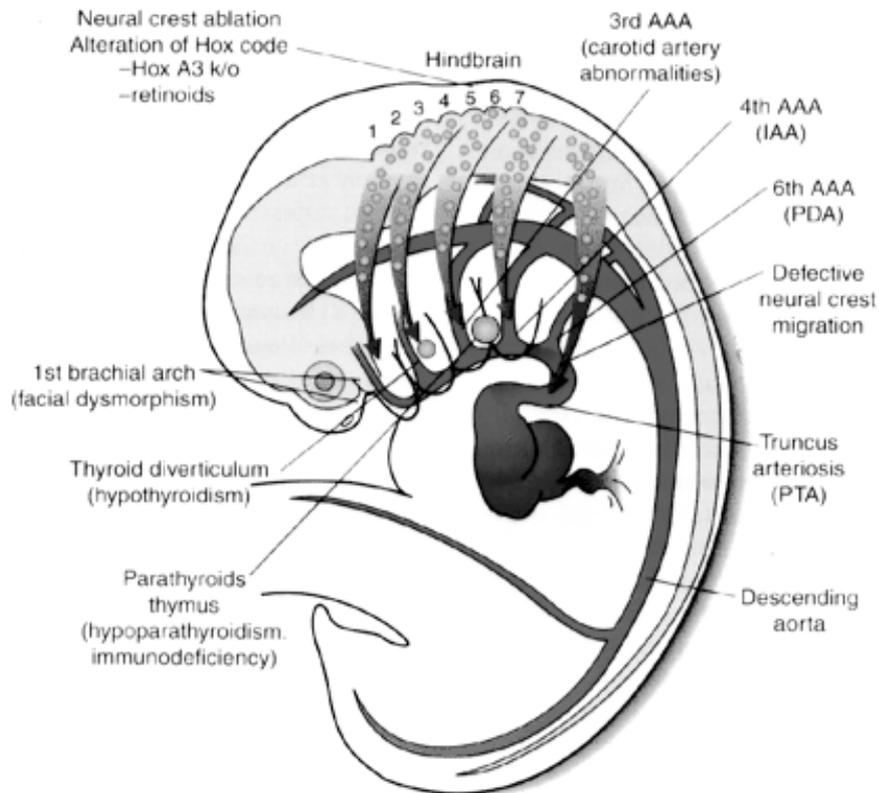
**Abb. 38:** Die Ausbildung der Vulva bei *C. elegans* wird über den Ras-Signalweg gesteuert. (A) Ankerzellen aus den sich entwickelnden Gonaden sezernieren Lin3 („epidermal growth factor“), in Folge dessen sich die ventral gelegenen Zellen P6.p, P5.p und P7.p zur Vulva entwickeln. Ein inhibitorisches Signal der Hypodermis (Lin15: Let23-Antagonist) steuert die Entwicklung der 3°-Zellen zum hypodermalen Syncytium 7 (Hyp7). Bei konstitutivem Ras entwickeln sich auch die 3°-Zellen zur Vulva (Multivulvaphänotyp). Bei einer fehlenden Ras-Signalkaskade wird keine Vulva gebildet. (B) Sur-1 steuert die Vulvaentwicklung, direkt über Phosphorylierung des „HNF3/Forkhead-helix-wing-helix“-Transkriptionsfaktors Lin31, was zur Dissoziation des inhibitorischen Faktors Lin1 (Ets-Familie) führt. Genetische Interaktionen zeigen, daß Sur-2 stromabwärts von Sur-1 liegt, und direkt bzw. über Lin12 (Notch) an der Vulvaentwicklung beteiligt ist. Zusätzlich wird das Protein Lin25 für die korrekte Entwicklung benötigt. Weitere genetische Interaktionen weisen dem CeNURD-Komplex (Abschn. 1.4.) eine potentiell inhibitorische Rolle bei der Vulvaentwicklung zu (Solari und Ahringer, 2000).

### 8.3.2. Der Wng/Wnt-Signalweg und Mediator



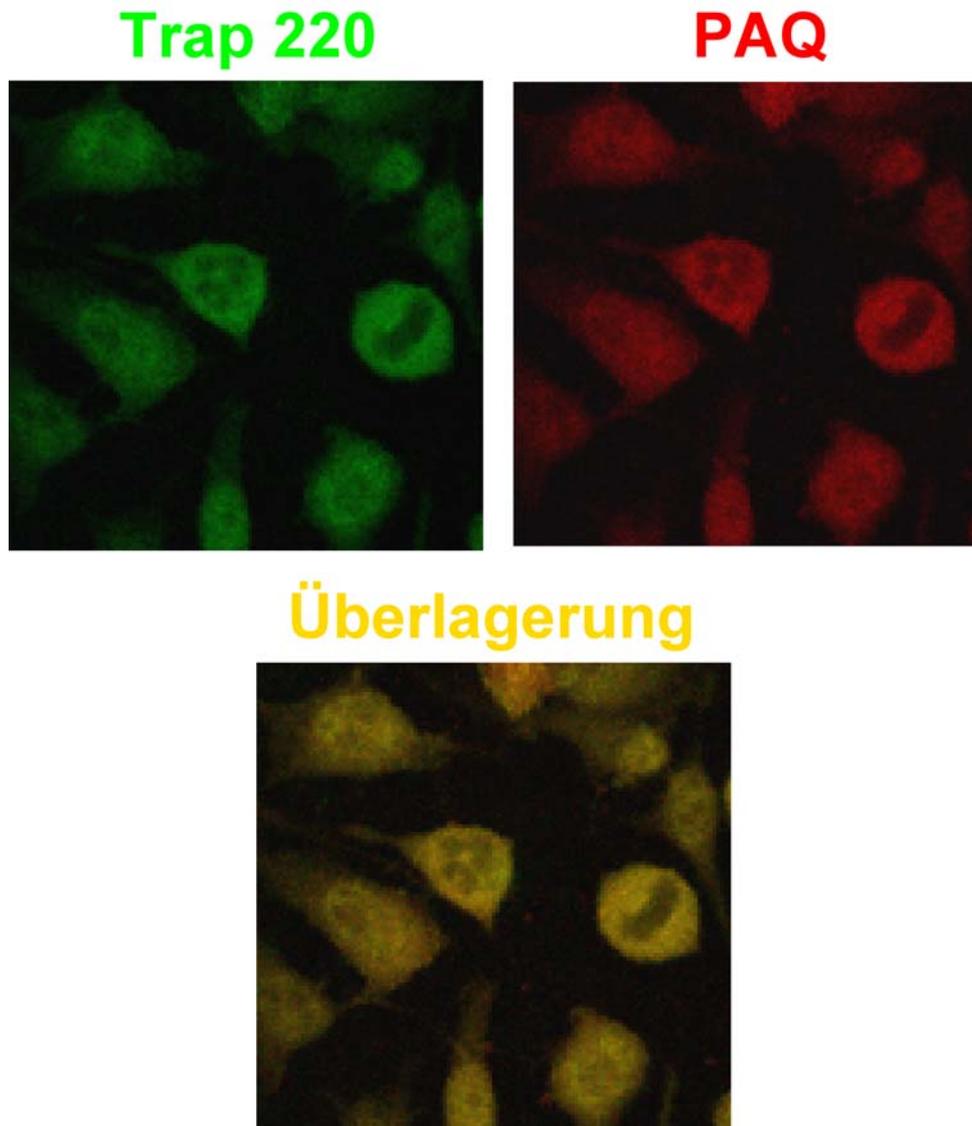
**Abb. 39:** Die Regulation des PAL-1-Gens in *C. elegans* wird linienspezifisch reguliert. Der Homöodomäne-Transkriptionsfaktor Pal-1 (*caudal*-Ortholog) steuert über eine Regulation des Hox-Gens MAB-5 (*antennapedia*-Paralog), welches seinerseits stromaufwärts vom Hox-Gen EGL-5 (*abdominal B*-Paralog) und LIN32 (bHLH-Protein, *atonal*-Paralog) liegt, die Entwicklung von männlichen „rays“ aus postembryonalen Ectodermzellen (V6-Paar). Ein Ausfall der Pal (*posterior alae*)-Funktion nur in diesen Zellen – das Gen ist für die Embryonalentwicklung essentiell - führt zur Bildung von „alae“ anstatt „rays“ im Fadenwurm. Der Intron-Enhancer ist für die Expression von PAL-1 in postembryonalen Ectodermzellen essentiell. Ein Funktionsverlust des Enhancers kann durch Mutationen, welche eine Mutation der C-terminalen glutaminreichen (Q) Domäne von Sop-1/CeTrap230 bewirken, suppremiert werden, da nun ein alternativer Weg PAL-1 anzuschalten, die Wnt/Wng-Signalkaskade, benutzt wird. Genetische Interaktionen zeigen, daß Unc37 (Groucho-Ortholog) und Sop-3 (Homologe bis dato unbekannt) negative Faktoren für die PAL-1-Regulation sind. Weitere genetische Daten demonstrieren, daß die positive Wirkung von Bar-1/Ceβ-Catenin abhängig von der CeMed6-Funktion ist, was bedeutet, daß Mediator PAL-1 sowohl positiv als auch negativ regulieren kann.

## 8.4. Migration von Neuralleistenzellen im humanen Embryo



**Abb. 40:** Die Migration von Neuralleistenzellen ist am Aufbau derjenigen Strukturen beteiligt, welche beim DiGeorge-Syndrom betroffen sind (Nach (Scambler, 2000)). Das Schema zeigt einen humanen Embryo vier bis sechs Wochen nach der Einnistung in die Plazenta. AAA: „arch arteries“, PDA: „persistent ductus arteriosus“, IAA: „interrupted aortic arch“, k/o: „knock-out“. Die Wanderung der Zellen ist durch schwarze Pfeile illustriert, und geht vom Hinterhirn („hindbrain“) aus.

## 8.5. Colokalisation von PAQ und TRAP220



**Abb. 41:** Immunfluoreszenzuntersuchung der Colokalisation von PAQ und TRAP220 mittels konfokaler Lasermikroskopie (G. Stelzer). Der Antikörper gegen TRAP220 war ein kommerziell erhältlicher polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Abschn. 2.12.). Zum Nachweis von PAQ wurde der Monoklon 6C9 eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch einen sekundären FITC-markierten anti-Kaninchen-Antikörper bzw. einen Cy3-konjugierten anti-Ratte-Antikörper.

## 8.6. Der PC2-Komplex nach Malik *et al.*

Folgende Untereinheiten konnten nachgewiesen werden:

TRAP220 (+/-)

hRgr1

p150a (DRIP130 ?)

TRAP100(+/-)

TRAP95

TRAP80

p78 (CRSP70?)

TRAP37/CRSP34: AF230382 (NCBI Genbank Zugriffsnummer)

TRAP36/28b (+/-): AF230381

hMed6 (+/-)

hMed7

hTRFP

TRAP25: AAL89787 (NCBI Genbank Zugriffsnummer)

p22 (unbekannt)

hSrb7

hSoh1

hMed10/hNut2

p12 (unbekannt)

Einige Untereinheiten sind als variable Komponenten (+/-) zu betrachten. Eine Evidenz für das Vorliegen von DRIP130 und CRSP70 beruht nur auf dem Migrationsverhalten in der SDS-PAGE. Referenzen finden sich in (Baek *et al.*, 2002; Malik *et al.*, 2000; Malik und Roeder, 2000).

## 8.7. Aminosäure- und cDNA-Sequenz von p103/VaCID

```

          10          19          28          37          46          55
5' G GCT GCG GCT GCA GTG GTG GTG GCG GGT ACC GCA CGG GGT ATG GTC CCC GGG TCC
                                     M V P G S

          64          73          82          91          100          109
GAG GGC CCG GCC CGC GCC GGG AGC GTG GTG GCC GAC GTG GTG TTT GTG ATT GAG
E G P A R A G S V V A D V V F V I E

          118          127          136          145          154          163
GGT ACG GCC AAC CTG GGA CCC TAC TTC GAG GGG CTC CGC AAG CAC TAC CTG CTC
G T A N L G P Y F E G L R K H Y L L

          172          181          190          199          208          217
CCG GCC ATC GAG TAT TTT AAT GGT GGT CCT CCT GCT GAG ACG GAC TTC GGG GGA
P A I E Y F N G G P P A E T D F G G

          226          235          244          253          262          271
GAC TAT GGG GGG ACC CAG TAC AGC CTC GTG GTG TTC AAC ACA GTG GAC TGC GCT
D Y G G T Q Y S L V V F N T V D C A

          280          289          298          307          316          325
CCC GAG TCC TAC GTA CAA TGT CAC GCT CCC ACC AGC AGC GCC TAT GAG TTT GTC
P E S Y V Q C H A P T S S A Y E F V

          334          343          352          361          370          379
ACC TGG CTC GAT GGC ATT AAG TTC ATG GGC GGG GGT GGT GAG AGC TGC AGC CTC
T W L D G I K F M G G G G E S C S L

          388          397          406          415          424          433
ATC GCG GAA GGA CTC AGC ACA GCC TTG CAG CTG TTT GAT GAC TTC AAG AAG ATG
I A E G L S T A L Q L F D D F K K M

          442          451          460          469          478          487
CGC GAG CAG ATT GGC CAG ACG CAC CGG GTC TGC CTC CTC ATC TGC AAC TCA CCC
R E Q I G Q T H R V C L L I C N S P

          496          505          514          523          532          541
CCA TAC TTG TTG CCT GCT GTT GAG AGC ACC ACG TAC TCT GGA TGC ACA ACT GAG
P Y L L P A V E S T T Y S G C T T E

          550          559          568          577          586          595
AAT CTT GTG CAG CAG ATT GGG GAG CGG GGG ATC CAC TTC TCC ATT GTG TCT CCC
N L V Q Q I G E R G I H F S I V S P

          604          613          622          631          640          649
CGG AAG CTG CCT GCG CTT CGG CTT CTG TTT GAG AAG GCA GCC CCC CCG GCC TTG
R K L P A L R L L F E K A A P P A L

          658          667          676          685          694          703
CTG GAG CCG CTG CAG CCT CCG ACA GAT GTG AGC CAG GAC CCG AGG CAC ATG GTG
L E P L Q P P T D V S Q D P R H M V

```

---

712	721	730	739	748	757
CTG GTT CCG GGA CTC GTG CTG CCT GTT GGG GGT GGC TCA GCC CTA GGC CCC CTC					
L V R G L V L P V G G G S A L G P L					
766	775	784	793	802	811
CAG TCA AAG CAG CCA GTC CCC CTG CCT CCC GCC GCA CCC TCA GGT GCC ACT CTC					
Q S K Q P V P L P P A A P S G A T L					
820	829	838	847	856	865
TCA GCA GCC CCC CAG CAG CCT CTG CCC CCC GTC CCC CCG CAG TAC CAG GTT CCC					
S A A P Q Q P L P P V P P Q Y Q V P					
874	883	892	901	910	919
GGG AAC CTG AGT GCA GCT CAG GTG GCC GCG CAG AAT GCA GTG GAG GCT GCC AAG					
G N L S A A Q V A A Q N A V E A A K					
928	937	946	955	964	973
AAC CAG AAG GCT GGG CTG GGC CCT CGC TTC TCG CCC ATC ACC CCT CTC CAA CAA					
N Q K A G L G P R F S P I T P L Q Q					
982	991	1000	1009	1018	1027
GCT GCT CCC GGA GTG GGT CCC CCC TTC AGC CAG GCC CCA GCT CCC CAA CTA CCC					
A A P G V G P P F S Q A P A P Q L P					
1036	1045	1054	1063	1072	1081
CCA GGA CCC CCT GGC GCC CCC AAG CCA CCA CCT GCT TCC CAG CCC AGT CTG GTC					
P G P P G A P K P P P A S Q P S L V					
1090	1099	1108	1117	1126	1135
TCC ACT GTG GCC CCT GGC TCC GGC CTG GCT CCC ACG GCA CAG CCC GGG GCA CCG					
S T V A P G S G L A P T A Q P G A P					
1144	1153	1162	1171	1180	1189
TCC ATG GCA GGC ACT GTG GCC CCA GGA GGG GTG AGC GGC CCT TCC CCA GCC CAG					
S M A G T V A P G G V S G P S P A Q					
1198	1207	1216	1225	1234	1243
CTG GGA GCC CCA GCC CTC GGT GGG CAG CAG TCA GTC TCC AAT AAG CTT CTG GCC					
L G A P A L G G Q Q S V S <u>N K L L A</u>					
1252	1261	1270	1279	1288	1297
TGG AGC GGG GTC CTG GAG TGG CAA GAG AAA CCC AAA CCT GCC TCA GTG GAT GCC					
W S G V L E W <u>Q E K P K P A S V D A</u>					
1306	1315	1324	1333	1342	1351
AAC ACC AAG CTG ACG CGG TCA CTG CCC TGC CAG GTC TAC GTG AAT CAT GGC GAG					
N T K L T R S L P C <u>Q V Y V N H G E</u>					
1360	1369	1378	1387	1396	1405
AAC CTG AAG ACG GAG CAG TGG CCC CAG AAG CTG ATC ATG CAG CTC ATC CCC CAG					
N L K T E <u>Q W P Q K L I M Q L I P Q</u>					
1414	1423	1432	1441	1450	1459
CAG CTG CTG ACC ACC CTG GGC CCT TTG TTC CGG AAC TCA AGG ATG GTC CAG TTC					
<u>Q L L T T L G P L F R N S R M V Q F</u>					

---

1468	1477	1486	1495	1504	1513
CAT TTC ACC AAC AAG GAC CTG GAG TCT CTC AAA GGC CTC TAC CGC ATC ATG GGC					
H F T N K D L E S L K G L Y R I M G					
1522	1531	1540	1549	1558	1567
AAC GGC TTC GCG GGC TGC GTG CAC TTC CCC CAC ACG GCG CCC TGT GAG GTG CGC					
N G F A G C V H F P H T A P C E V R					
1576	1585	1594	1603	1612	1621
GTG CTC ATG CTC CTG TAC TCG TCC AAG AAG AAG ATC TTC ATG GGC CTC ATC CCC					
V L M L L Y S S K K K I F M G L I P					
1630	1639	1648	1657	1666	1675
TAC GAC CAG AGC GGC TTC GTC AAC GGC ATC CGG CAG GTC ATC ACC AAC CAC AAG					
Y D Q S G F V N G I R Q V I T N H K					
1684	1693	1702	1711	1720	1729
CAG GTC CAG CAG CAG AAG CTG GAG CAG CAG CAG CGA GGA ATG GGG GGA CAG CAG					
Q V Q Q Q K L E Q Q Q R G M G G Q Q					
1738	1747	1756	1765	1774	1783
GCA CCC CCC AGG GCT GGG GCC CAT TCT GGA GGA CCA AGC CAG GCC CTC ACA GAA					
A P P R A G A H S G G P S Q A L T E					
1792	1801	1810	1819	1828	1837
TCT GCT CCA GCT CCG CCC ACC GCA GCC CCA GCC TCA GGG TAC CGT AGG GGC CTC					
S A P A P P T A A P A S G Y R R G L					
1846	1855	1864	1873	1882	1891
TGG GGC CAC GGG GCA GCC CCA GCC CCA AGG TAC TGC CCA GCC CCC GCC AGG TGC					
W G H G A A P A P R Y C P A P A R C					
1900	1909	1918	1927	1936	1945
CCC TCA AGG CCC TCC TGG AGC AGC TTC TGG CCC ACC CCC TCC TGG ACC CAT CCT					
P S R P S W S S F W P T P S W T H P					
1954	1963	1972	1981	1990	1999
TCG GCC CCA GAA CCC TGG GGC CAA CCC TCA GCT GCG AAG CCT CCT CCT CAA CCC					
S A P E P W G Q P S A A K P P P Q P					
2008	2017	2026	2035	2044	2053
ACC ACC GCC GCA GAC TGG GGT GCC CCC ACC CCA GGC CTC CCT CCA CCA CCT GCC					
T T A A D W G A P T P G L P P P P A					
2062	2071	2080	2089	2098	2107
CAG TCC TGG CCC GCA CAA CTT CCC CCT CGG GCT CCA CTG CCA GGT AAG GGG ACC					
Q S W P A Q L P P R A P L P G K G T					
2116	2125	2134	2143	2152	2161
CGG GGG AGG GCA GAG GTC TGG ACT GAG TGT CCC AGC AGC TCC TGG GCT AGA GCA					
R G R A E V W T E C P S S S W A R A					
2170	2179	2188	2197	2206	2215
CCA AGA CCA AGT GCT CCT GGG AAG TAA AGA CAT AGG ATC CAA GAA TGA GGG TTC					
P R P S A P G K *					

---

2224 2233 2242 2251 2260 2269  
CCC CAG CCG GGC CTG CAG CCC AGC GTC ATG GAG GAC GAC ATC CTC ATG GAT CTC

2278 2287 2296 2305 2314 2323  
ATC TGA ATC CCC AAC ACC CAA TAA AGT TCC TTT TTA ACA CAA AAA AAA AAA AAA

AAA AAA 3'

**Abb. 42:** Aminosäure- und cDNA-Sequenz von VaCID (hypothetisches Protein TCBAP0758). Dargestellt ist die Version aus dem Humangenomprojekt (NCBI Zugangsnummer NP\_112235). Die Von-Willebrand-Faktor-Typ A-Domäne ist grau hinterlegt. Die CID-Domäne ist unterstrichen. Das Stopp-Codon ist durch einen Stern (\*) repräsentiert.

# Lebenslauf

Name: Gerhard Max Josef Mittler  
Geburtsort: Augsburg  
Geburtsdatum: 29. März 1972  
Familienstand: unverheiratet

## Dissertation:

1998 — 2002  
Anfertigung der Promotionsarbeit im Labor von  
Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Meisterernst am Genzentrum der  
Ludwig-Maximilians-Universität München und  
am Hämatologikum der Gesellschaft für Umwelt und  
Gesundheitsforschung mbH (GSF) in München  
Thema: Regulation der RNA-Polymerase II-Transkription durch  
humanen Mediator

## Studium:

1992 — 1997  
1997  
Biochemiestudium an der Universität Bayreuth  
Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. Rösch  
am Lehrstuhl Biopolymere, Universität Bayreuth  
Thema: Klonierung, Expression und Reinigung des  
Transmembranproteins Vpu aus dem menschlichen  
Immunschwächevirus HIV-1

## Projektarbeit:

1996  
Unter Anleitung von Dr. W. Kölch und Dr. H. Mischak am  
Hämatologikum der GSF in München  
Thema: Enzymatische Charakterisierung der Raf-Kinase

## Zivildienst:

1991 — 1992  
Johanniter-Unfallhilfe e.V. Augsburg

## Schulbildung:

1978 — 1982  
1982 — 1991  
Löweneck-Grundschule Augsburg  
Holbein-Gymnasium Augsburg  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife