

Aus dem Adolf Butenandt Institut-Molekularbiologie  
der Universität München

Vorstand: Prof. Peter B. Becker

**Charakterisierung der ATPasen Domino A und Domino B in *Drosophila  
melanogaster***

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Angelika Loiberstetter**

aus

Haag in Obb.

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Ulrich Hartl  
PD Dr. Alexander Faußner

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. A. Eberharter

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2009

*Für Mirjam*

**„A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.“**

Marie Curie (1867 – 1934)



## Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	<b>III</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Chromatin.....	1
1.1.1 Chromatinfaser und -struktur .....	3
1.1.2 Chromatindynamik.....	4
1.1.3 Post-translationale Histonmodifikation.....	5
1.2 Histonvarianten .....	13
1.3 ATP-abhängige Chromatin Remodelling Maschinen.....	16
1.3.1 Die SWI/SNF Familie .....	19
1.3.2 Die ISWI Familie .....	21
1.3.3 Die CHD Familie: dCHD1, dCHD3, dMi-2 und Kismet.....	24
1.3.4 Die Familie der split-ATPasen in Hefe: INO80 und SWR1.....	26
1.3.5 Drosophila split-ATPasen - Domino A und Domino B.....	29
<b>2 Methoden</b> .....	<b>32</b>
2.1 Molekularbiologische Methoden .....	32
2.2 Proteinchemische Methoden .....	33
2.3 Zellkultur.....	39
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
3.1 Aufreinigung von Domino Proteinkomplexen.....	44
3.1.1 Konventionelle Chromatographie.....	44
3.2 Herstellung von rekombinantem Domino B in Sf9 Zellen .....	54
3.3 Biochemische Eigenschaften von rekombinantem Domino B.....	55
3.4 Herstellung einer inaktiven Domino B Punktmutante .....	59
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>66</b>
4.1 Fehlerdiskussion.....	67
4.1.1 Drosophila melanogaster als Modellorganismus.....	67
4.2 Domino A und Domino B - Mitglieder hochmolekularer Proteinkomplexe .....	68

4.3 Domino Proteine besitzen ATPase Aktivität .....	69
4.4 Herstellung und Eigenschaften von rekombinantem Domino B.....	70
4.5 Eine Punktmutation an Lysin 945 in Domino B führt zum Verlust der ATPase Aktivität .....	73
4.6 Mögliche Funktionen von Domino B .....	74
4.6.1 <i>DNA Reparatur</i> .....	74
4.6.2 <i>Bildung von Heterochromatin</i> .....	76
4.7 Mögliche Interaktionspartner von Domino B .....	77
<b>5 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>6 Abkürzungen.....</b>	<b>99</b>

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Peter Becker danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Gruppe zu arbeiten und mich während meiner Doktorarbeit begleitet hat. Danke, dass Du mich immer unterstützt hast und mir mit Deinen Ideen und ausgiebigen Diskussionen neue Inspirationen gegeben hast.

Des Weiteren möchte ich PD Dr. Anton Eberharter für die kompetente Betreuung und die großartige Unterstützung sowohl im Labor als auch während des Schreibens meiner Arbeit danken. Danke für die Zeit und die Geduld die Du mir entgegen gebracht hast und danke für die Lehre von technischen und analytischen Fertigkeiten, die mir ein essentielles Grundwissen in der Forschung verschafft haben.

Spezieller Dank an Cristina Chioda, die mich ebenfalls geduldig vom Zeitpunkt des ersten Pipettierens bis zum Schreiben meiner Doktorarbeit unterstützt hat. Danke, dass Du immer für mich da warst und mir jede Frage beantwortet hast. Du hast mir nicht nur geholfen ein umfassendes Grundlagenwissen in der Forschung zu erlangen, sondern bist mir auch eine wunderbare Freundin geworden.

Ich bin allen Labormitgliedern dankbar, dass sie eine Atmosphäre geschaffen haben, die wissenschaftlich anregend war und in der es Spass gemacht hat zu arbeiten.

Ich danke allen, die mir ihre Expertise und ihre Materialien, die zum Schreiben dieser Arbeit notwendig waren, zur Verfügung gestellt haben.

Catherine Regnard war mir bei der Durchführung der Chromatin Salz Dialyse behilflich. Cristina Chioda hat mich in der Zellkultur und bei der Aufreinigung von Domino unterstützt und mir die Arbeit oft sehr erleichtert.

Vielen Dank auch an Roman Schniepp, der mir wertvolle Tipps beim Schreiben meiner Arbeit gegeben hat und mich mit seiner freundlichen und aufgeweckten Art immer bei Laune gehalten und zum Lachen gebracht hat.

Mirijam, ich bin Dir unendlich dankbar, dass Du immer für mich da warst und Verständnis für die Zeit, die ich mit meinem Studium und meiner Doktorarbeit verbracht habe, gezeigt hast. Ich liebe Dich von ganzem Herzen und danke Dir für die Wärme, die Liebe und das Lachen, die mir jeden Tag Kraft gegeben haben meine Ziele zu erreichen.

Ich möchte auch meiner Familie danken, die mich während des gesamten Studiums mit ihrer Hilfe sowohl moralisch als auch finanziell unterstützt hat.

## Zusammenfassung

In eukaryontischen Zellen existiert eine Vielzahl von ATP-abhängigen *Remodelling* Proteinkomplexen, die die Chromatinstruktur auf molekularer Ebene verändern können. In diesen Enzymkomplexen ist, zusätzlich zu assoziierten Untereinheiten, eine ATPase vorhanden, welche die notwendige Energie für sogenannte *Remodelling* Prozesse zur Verfügung stellt. Es wurde gezeigt, dass diese *Remodelling* Komplexe in der Lage sind Repositionierungen von Nukleosomen unter ATP-Hydrolyse zu katalysieren, ein Prozess, der auch als *Sliding* bezeichnet wird. ATP-abhängige Chromatin *Remodelling* Komplexe konnten mittlerweile aus Hefe, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* und Mensch isoliert werden.

Eine besondere Gruppe stellen *Remodelling* Komplexe dar, deren ATPase Domäne durch Insertion einer gewissen Aminosäuresequenz, zweigeteilt ist. Sie zählen zu der Gruppe der sogenannten *split*-ATPasen. INO80, ein Mitglied dieser Gruppe, wurde als erstes in Hefe entdeckt und charakterisiert. Es spielt bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) eine wichtige Rolle. In *Drosophila melanogaster* besitzen Domino A und Domino B das Merkmal einer *split*-ATPase. Das *domino* Gen wurde erstmals in einem *Screening* für Mutationen, die hämatopoetische Fehlbildungen in *Drosophila* Embryonen verursachen, entdeckt. *Domino* kodiert für zwei Proteinisoformen, bestehend aus 3202 (Domino A) und 2498 (Domino B) Aminosäuren. Beide besitzen eine 500 Aminosäuren lange DNA-abhängige ATPase Domäne aus der SWI2/SNF2 Proteinfamilie, die durch einen Bereich aus 451 Aminosäuren zweigeteilt ist [1]. Die Domino Proteine sind Untereinheiten großer Proteinkomplexe und spielen eine wichtige Rolle bei der Modifizierung von Chromatin. Sie haben Einfluss auf den Ablauf transkriptioneller Prozesse [1] und wirken bei der Reparatur von DSB mit [2]. Das Ziel dieser Arbeit war die mit Domino A und Domino B interagierenden Untereinheiten und die biochemischen Eigenschaften, sowohl der Enzyme als auch der Domino-enthaltenden Proteinkomplexe, zu identifizieren und zu charakterisieren.

Obwohl es leider nicht möglich war, Domino A- und Domino B-assozierte Proteine zu isolieren, konnten dennoch die enzymatischen Eigenschaften von Domino B charakterisiert werden. Es stellte sich heraus, dass die ATPase Aktivität von Domino B

durch DNA und Nucleosomen stimuliert werden kann. Des Weiteren zeigten sich interessanterweise unterschiedliche Enzymaktivitäten in Gegenwart von Nucleosomen, die das „normale“ Histon H2A enthalten und Nucleosomen, bei denen H2A durch die Histonvariante in *Drosophila melanogaster* - H2AvD - ersetzt worden war.

## 1 Einleitung

Desoxyribonukleinsäure (DNA) liegt im eukaryontischen Zellkern in Form von großen Nukleinsäuremolekülen als fädige Struktur vor. Das entspricht beim Menschen  $3 \times 10^9$  Nukleotidpaaren, die auf 23 Chromatinfäden verteilt sind. Ein solcher DNA Faden hat einen Durchmesser von 2 nm und eine Länge von 5-10 cm pro menschlichem Chromosom. Das heißt, die gesamte DNA pro haploide Zelle ist ausgestreckt in etwa 2 m lang.

Jede eukaryontische Zelle ist mit dem Problem konfrontiert, ca. 2 m DNA in ein subzelluläres Organell mit 10 µm Durchmesser - den Zellkern - zu packen, ohne ihre Funktion zu beeinträchtigen. Darüberhinaus müssen alle fundamentalen nukleären Prozesse, wie DNA Reparatur, Replikation, Transkription und Rekombination der jeweiligen Enzymmaschinerie zugänglich gemacht werden und nach individuellem Bedarf der Zelle fehlerfrei ablaufen. Es stellt sich somit die Frage und gleichzeitig die Forderung nach einem Ordnungsprinzip, um diese Vorgaben umsetzen zu können. Für die enorme Verpackung des gesamten Genoms spielen kleine, stark konservierte DNA Bindeproteine, die Histone, eine wesentliche Rolle. Im Zusammenspiel mit zahlreichen Nicht-Histonproteinen organisieren sie die eukaryontische DNA in Form von Chromatin.

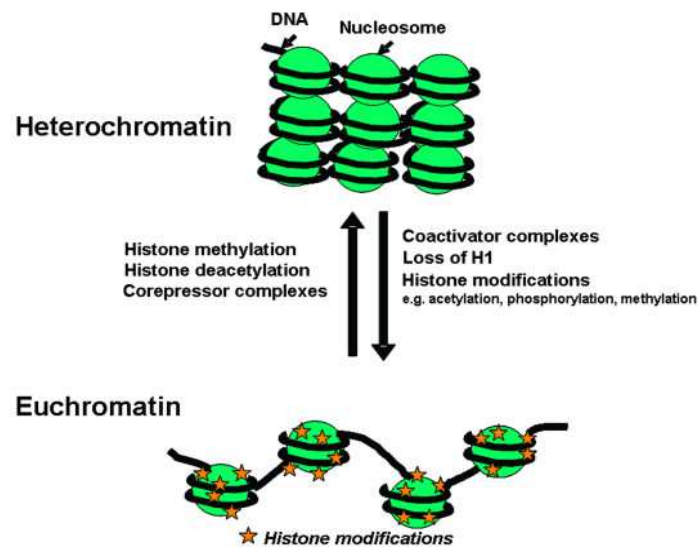
### 1.1 Chromatin

Ende des 19. Jahrhunderts wurde gezeigt, dass das genetische Material in Form einer komplexen Struktur organisiert ist, die aus DNA und Proteinen besteht und in einem hochspezialisierten subzellulären Kompartiment, dem Nukleus, lokalisiert ist. Als es gelungen war, diese Struktur mit grundlegenden Färbemethoden sichtbar zu machen, erhielt sie den Namen Chromatin (gr. *chroma*: Farbe und gr. *soma*: Körper) [3]. Am Anfang des 20. Jahrhunderts wurde mikroskopisch beobachtet, dass sich Chromatin aus verdichteten und aufgelockerten Bereichen zusammensetzt, die man durch deren unterschiedliches Färbeverhalten voneinander unterscheiden konnte. Stark angefärbte

Bereiche wurden als Heterochromatin, weniger intensiv angefärbte Abschnitte als Euchromatin bezeichnet [4], [5].

Euchromatin und Heterochromatin differieren jedoch nicht nur durch ihre verschieden starke Kompaktheit (= Färbbarkeit). Es wird auch angenommen, dass diese in Bezug auf ihre Funktion zwei verschiedene Zustandsformen der DNA repräsentieren. Euchromatin ist vor allem durch eine „offene“ Struktur gekennzeichnet und wird als überwiegend transkriptions-aktive Region angesehen. Im Gegensatz dazu besteht Heterochromatin vorwiegend aus inaktiven DNA Sequenzen. Man unterscheidet drei Arten von Heterochromatin: Konstitutives oder auch „zentromerisches“ Heterochromatin spielt möglicherweise eine Rolle bei der Stilllegung von bestimmten Genen; fakultatives Heterochromatin ist für die Stilllegung eines weiblichen X-Chromosoms verantwortlich. Dadurch entsteht das Barr-Körperchen. Funktionelles Heterochromatin ist nach Ausdifferenzieren einer somatischen Zelle verantwortlich für die Stilllegung von bestimmten Bereichen eines Chromosoms, abhängig von der Zellfunktion. Euchromatin ist vergleichsweise viel dynamischer und kann sich während spezifischer zellulärer Ereignisse bemerkenswerten Veränderungen auf Ebene der Verpackungsdichte unterziehen [6], [7].





**Abb. 1:** Heterochromatin ist die kompakte “geschlossene” Form von Chromatin, welche mit der Stilllegung von Genen assoziiert ist. Die Aktivierung von Chromatin in seine “offene” Form wird durch die Modifizierung von *Core* Histonen reguliert und macht Genexpression möglich. Auch das Entfernen des *Linker* Histones H1 sowie Veränderungen im DNA Methylierungsstatus sind wichtig für diesen Prozess [8].

### 1.1.1 Chromatinfaser und -struktur

Im Jahre 1976 wurde erstmalig das sogenannte Nucleosom als strukturelle und funktionelle Einheit des Chromatins mittels biochemischer und elektronenmikroskopischer Analysen identifiziert [9], [10].

Ein Nucleosom besteht aus 147 Basenpaaren (bp) DNA, die um ein Histonoktamer gewickelt ist. Ein Tetramer aus den Histonen H3 und H4 bildet zusammen mit zwei Histondimeren H2A und H2B das Histon *Core* Partikel [11]. Zwei dieser *Core* Partikel sind durch ein DNA Stück von ca. 20-80 bp, der sogenannten *Linker* Region, voneinander getrennt. Hintereinander geschaltete Nucleosomen, die wie Perlen an einem DNA Faden aufgereiht sind, bilden zusammen eine Faser von 10 nm Durchmesser [12]. Diese Konfiguration nennt man die Primärstruktur, die die erste Stufe der DNA Verpackung im Nucleus darstellt. Weitere hintereinander geschaltete Spiralisierungs- und

Faltungsmechanismen führen zu einer weiteren Komprimierung der DNA [13], [14], [15].

Die Inkorporation von Histon H1 ermöglicht eine weitere Ebene der Verpackung der Chromatinfaser mit einem Durchmesser von etwa 30 nm [16], [17]. Letztendlich definieren intermolekulare Interaktionen zwischen Nukleosomen und anderen Nicht-Histonproteinen, wie die Proteine der HMG (*High Mobility Group*), Heterochromatin Protein 1 (*HPI*) oder Polycomb Gruppe (*Pc-G*), eine Chromatinstruktur höherer Ordnung [18], [19]. Somit ist es möglich, einen 2 m langen Chromatinfaden, der somit im Metaphasechromosom mit einer ca. 20000-fachen Verkürzung ein Maximum erreicht, in einen Zellkern von annähernd 10 µm Durchmesser zu packen und zu organisieren.

Jedes der Histonmoleküle des *Core* Partikels besitzt an seinem C-terminalen Ende einen „globulären“ Abschnitt, der den inneren Teil des Nukleosoms bildet, sowie eine flexible N-terminale Region, die aus dem Nukleosom „herausragt“. Die N-terminalen Abschnitte werden als Histon *Tails* bezeichnet. Dieser Teil des Nukleosoms ist in verschiedenen Spezies sehr ähnlich organisiert und stellt den besser zugänglichen Teil des Chromatins dar [20], [21]. Die N-Termini sind darüberhinaus durch einen hohen Anteil an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin gekennzeichnet. Die Histon *Tails* unterliegen zahlreichen post-translationalen Modifikationen. Diese Modifikationen haben einen erheblichen Einfluss auf die Packung und die Regulation der DNA und halten das Chromatin in einem variablen Zustand. Als post-translationale Modifikationen spielen unter anderem die Acetylierung von Lysinen, die Methylierung von Lysin- und Argininresten sowie die Phosphorylierung von Serinen eine bedeutende Rolle. Aber auch die Ubiquitinierung und die ADP-Ribosylierung gewinnen mehr und mehr an Bedeutung [22], [23], [24].

### ***1.1.2 Chromatindynamik***

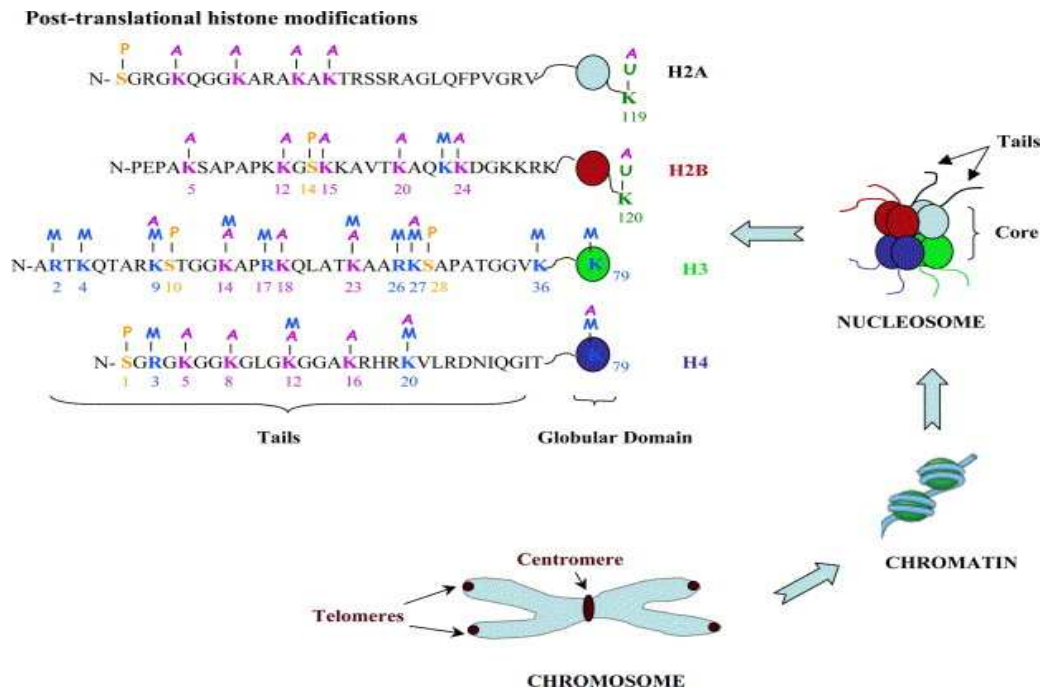
Die komplexe Organisation von Chromatin erschwert den Zugang von Proteinen, die an DNA-assoziierten Prozessen mitwirken, zur DNA. Ein Großteil dieser Faktoren ist an essentiellen Zellprozessen wie Transkription, Replikation oder DNA Reparatur beteiligt.

Somit ist es für eine Zelle lebensnotwendig, Chromatin entsprechend verschiedener Stimuli modulieren zu können.

Im Prinzip lassen sich drei Hauptstrategien beschreiben, welche die Funktion und die Struktur des Chromatins beeinflussen können. Zum einen unterliegen die flexiblen und leicht zugänglichen N-Termini der Histone etlichen post-translationalen Modifikationen [25], [26]. Zum anderen existieren mit den ATP-abhängigen sogenannten Chromatin *Remodelling* Komplexen Maschinen im Zellkern, welche unter ATP-Hydrolyse die Protein-DNA Interaktionen lockern können [27], [28], [29]. Letztendlich sind in den vergangenen Jahren auch eine Reihe von Histonvarianten identifiziert worden, die bei bestimmten nukleären Prozessen eine wichtige Rolle spielen [30], [31]. Im Folgenden wird näher auf diese drei Prinzipien eingegangen.

### ***1.1.3 Post-translationale Histonmodifikation***

Wie bereits erwähnt wurde, sind vor allem die N-terminalen Amine der *Core* Histone Angriffs- bzw. Zielpunkte für eine Vielzahl diverser post-translationaler Modifikationen. Diese spezifischen kovalenten Histonmodifikationen, ob alleine oder in Kombination mit anderen Modifikationen auftretend, beeinflussen nahezu alle DNA-assoziierten Prozesse [32], [33], [34], bzw. üben einen regulatorischen Einfluss auf andere Chromatin-modifizierenden Enzyme aus [35]. Die verschiedenen Möglichkeiten der post-translationalen Modifikation sind in der folgenden Abbildung (Abb. 2) dargestellt.



**Abb. 2: Post-translationale Modifikationen der Histon Tails.** Acetylierung (A): violett; Methylierung (M): blau; Phosphorylierung (P): orange; Ubiquitinierung (U): dunkelgrün. Die farbigen Kreise stellen die „globuläre“ Domäne der vier Core Histone (H2A: hellblau, H2B: rot, H3: grün, H4: dunkelblau) dar [36].

Das Spektrum der post-translationalen Modifikationen der Histon Tails reicht von einzelnen Methyl-, Acetyl- und Phosphorylgruppen bis zur Generierung von isopeptidischen Bindungen zwischen bestimmten Molekülen und Ubiquitinpeptiden oder SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*) [36]. Die Variabilität und die Interaktion von Histonmodifikationen haben zum Gebrauch der Begriffe *Histon Code* und *epigenetischer Code* geführt. Der *Histon Code* fasst das Phänomen interagierender Histonmodifikationen zusammen [33], [34], [37]. Mittels des *epigenetischen Codes* wird ein wichtiges Konzept beschrieben, welches besagt, dass spezifische Kombinationen von Histonmodifikationen mit definierten funktionellen Effekten, wie der Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Enzymen und *Remodelling* Komplexen, einhergehen [38]. Zum einen ist bereits bekannt, dass dadurch regulatorische Effekte auf die Transkription ausgeübt werden, zum anderen wird vermutet, dass der *epigenetische Code* Auswirkungen auf weitere funktionelle Prozesse, wie DNA Reparatur [39] und zelluläre Gedächtnisbildung haben könnte [40]. Epigenetische Modifikationen können ohne Änderung der DNA

Sequenz einen Einfluss auf die Genexpression ausüben, wobei das Verteilungsmuster von DNA Methylierungen in Karzinomen häufig verändert ist.

Das kann zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen führen und somit die Tumorgenese begünstigen. Auch die Invasion und Metastasierung von Tumoren kann Folge eines Methylierungsfehlers sein [41].

Als Beispiel wäre zum einen das Prostatakarzinom zu nennen, bei dem eine verminderte Histonacetylierung und H3K4me2-Methylierung sowie eine vermehrte H3K9me2-Methylierung gefunden wurde. Diese Veränderungen spielen eine kritische Rolle für die Stilllegung von RASSF1A (*Ras ASSociation domain Family protein 1A*) Genen in Prostatakarzinomen und begünstigen dadurch dessen Entstehung [42].

Auch die Aktivität von nukleären Steroidrezeptoren wird direkt über Histon-modifizierende Proteine wie HATs (*HistonAcetylTransferasen*), HDACs (*HistonDeAcetylasen*), HMTs (*HistonMethylTransferasen*) und Demethylasen (s. u.) reguliert. Fehler in diesen post-translationalen Modifizierungsprozessen spielen auch hier eine bedeutende Rolle in der Entstehung und Progression von verschiedenen Tumoren [43], [44].

### **Histonacetylierung und -deacetylierung**

HATs sind definitionsgemäß Enzyme, die Histone acetylieren und somit entscheidende regulatorische Effekte auf die Struktur und Formation von Chromatin sowie auf die Transkription von Genen haben. Die Acetylierung von Histonen bedeutet den Transfer einer Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A auf die Lysinreste der Histone. Diese Reaktion wird durch HATs katalysiert, während die gegensätzliche Reaktion von HDACs durchgeführt wird.

In den letzten 10 Jahren wurden in der Erforschung von HATs große Fortschritte erzielt. Eine beträchtliche Zahl von HAT Enzymen konnte bereits aus verschiedenen Organismen isoliert werden [45]. Die Identifizierung von neuen HATs resultierte in der Erkenntnis, dass diese evolutionsbedingt von Hefe bis Mensch konserviert sind, HATs viele Untereinheiten besitzen können [46], [47], [48] und die Funktionen der katalytischen Untereinheiten stark von den anderen Untereinheiten abhängig sind [49]. HAT Komplexe werden anhand ihrer katalytischen Domänen in verschiedene Familien eingeteilt. Die

Mitglieder einer HAT Familie zeichnen sich durch spezielle Domänen, wie Bromodomänen, Chromodomänen (*CHR*omatin *OR*ganisation *MO*difier), WD40 Repeats, Tudor Domänen und PHD (*Pl*ant *H*omeo *D*omain) Finger aus, mit denen sie modifizierte Histon *Tails* erkennen und an diese binden können. Dadurch erhalten die Mitglieder einer HAT Familie eine gewisse Substratspezifität, z.B. binden Bromodomänen bevorzugt an Lysinreste [50], [51], dagegen Chromodomänen, wie sie HP1 besitzt, spezifisch an methylierte Lysinreste [52]. Das Ganze wird noch durch die Beobachtung kompliziert, dass manche HATs verschiedene Histonsubstrate modifizieren und einige auch eine zunehmende Anzahl an Nicht-Histonsubstraten acetylieren können [53]. Zusätzlich ist der Prozess der Histonacetylierung reversibel. Die Balance zwischen Histonacetylierung und -deacetylierung ist wichtig für eine normale zelluläre Funktion.

Die Acetylierung der N-terminalen Abschnitte von Histonen führt zu einer Auflockerung des Chromatins in eine „offenere“ Form. Generell nimmt man an, dass die Acetylierung von Lysinen der Histon *Tails* die Interaktionen zwischen den basischen Histonen und der DNA abschwächt. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass eine Anreicherung von acetylierten Histonen in Promotorregionen erfolgt und damit die Transkription durch die bessere Zugänglichkeit der Transkriptionsmaschinerie zur DNA erleichtert wird [54], [55].

In neueren Studien konnte auch gezeigt werden, dass die Acetylierung von Histon *Tails* durch HATs eine Rolle bei der DNA Reparatur spielt [39]. Als Beispiel wäre der Tip60 (*HIV-1 Tat interacting protein, 60kDa*) HAT Komplex in *Drosophila melanogaster* zu nennen, der die phosphorylierte Histonvariante H2AvD (s. u.) bei DSB gegen unmodifiziertes H2AvD austauschen kann und somit ein wichtiges Signal für die DNA Reparatur darstellt [2]. Abbildung 3 zeigt bedeutende HAT Familien und deren Substrate.

HAT complexes of the GNAT family											
SAGA (Sc)	SLIK (Sc)	ADA (Sc)	HAT-A2 (Sc)	SAGA (Dm)	ATAC (Dm)	PCAF (Hs)	STAGA (Hs)	TFTC (Hs)	HATB (Sc)	Elongator (Sc)	Hpa2 (Sc)
Catalytic subunit											
Gcn5	Gcn5	Gcn5	Gcn5	GCN5	GCN5	PCAF	GCN5L	GCN5L	Hat1	Elp3	Hpa2
Histones modified											
H2B/H3/H4	H2B/H3/H4	H3	H3	H3	H3/H4	H3/H4	H3/H4	H3/H4	H2A/H4	H3	H3/H4
Associated complex subunits											
Tra1	Tra1			TRA1		PAF400	TRRAP	TRRAP	Hat2	Elp1	Hpa2
Spt7	Spt7			SPT7			STAF65y		Hh1	Elp2	
Spt8										Elp4	
Spt3	Spt3			SPT3		SPT3	SPT3	SPT3		Elp5	
Spt20	Spt20									Elp6	
Ada1	Ada1			ADA1			STAF42				
Ada2	Ada2	Ada2	Ada2	ADA2B	ADA2A	ADA2					
Ada3	Ada3	Ada3	Ada3	ADA3	ADA3	ADA3	STAF54	ADA3			
Sgf29	Sgf29	Sgf29	Sgf29	SGF29							
Sgf73	Sgf73					SCA7	SCA7				
Ubp8	Ubp8					TAF5L	TAF5L	TAF5L			
Sgf11	Sgf11					TAF6L	TAF6L	TAF6L			
Taf5	Taf5			TAF5		TAF9	TAF9	TAF9			
Taf6	Taf6			TAF6		TAF10	TAF10	TAF10			
Taf9	Taf9			TAF9		TAF12	TAF12	TAF12			
Taf10	Taf10			TAF10B				TAF2			
Taf12	Taf12			TAF12			STAF36	TAF4			
Rtg2							STAF46	TAF5			
Chd1	Chd1							TAF6			
		Ahc1		WDA	ATAC1						
		Ahc2			HCF1						

HAT complexes of the MYST family							
NuA4 (Sc)	Pic. NuA4 (Sc)	NuA3 (Sc)	SAS (Sc)	TIP60 (Dm/Hs)	HBO1 (Hs)	MOZ/MORF (Hs)	MSL (Dm)
Catalytic subunit							
Esa1	Esa1	Sas3	Sas2	TIP60	HBO1	MOZ/MORF	MOF
Histones modified							
H2A/H4	H2A/H4	H3	H4	H2A/H4	H3/H4	H3	H4
Associated complex subunits							
Tra1		Yng1	Sas4	TRRAP	ING5	ING5	MSL1
Yng2	Yng2	Taf14	Sas5	ING3	ING4	BRPF1	MSL2
Yaf9		Nto1		p400	JADE1		MSL3
Eaf1				BRD8			MLE
Eaf2				EPC1			roX RNA
Eaf3				EPC2			
Eaf5				DMAP1			
Eaf6				RUJBL1	EAF6	EAF6	
Eaf7				MRG15			
Epl1	Epl1			BAF53a			
Act1				Actin			
Arp4				CAS41			
				MRGX			
				MRGBP			
				FL11730			
				YL1			
				TIP49a			
				TIP49b			
				TRCp120			

Abb. 3: Übersicht über bekannte Mitglieder der HAT Familie. Des Weiteren werden ihr Vorkommen in verschiedenen Spezies und ihre Funktionen aufgezeigt [56].

HDACs sind Enzyme, die für den Prozess der Histondeacetylierung zuständig sind. Im Gegensatz zu den HAT Komplexen hemmen sie über verschiedene Mechanismen den Ablauf der Transkription. Einerseits kommt es durch den Prozess der Deacetylierung zur Verstärkung der Interaktionen zwischen den Histon *Tails* und der DNA. Dadurch wird der Transkriptionsmaschinerie der Zugang zur DNA verwehrt. Andererseits kann durch die Deacetylierung eines bestimmten Lysinrestes das Signal für eine anschließende Methylierung des Histon *Tails* gegeben werden [57], [58].

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Fälle untersucht, bei denen Störungen im Zusammenspiel von Acetylierung und Deacetylierung zu ernsthaften Krankheiten und Tumoren geführt haben [59]. Funktioniert das korrekte Zusammenspiel zwischen HATs und HDACs nicht, so kommt es zu einer Dysregulation der Transkription, des Zellwachstums, des Überlebens und der Proliferation von Zellen. Eine Überexpression von HDACs, deren fehlerhafte Rekrutierung über Onkoproteine oder Mutationen können in vielen Tumoren gefunden werden [60]. Hemmstoffe gegen HDACs induzieren eine Hyperacetylierung von Histonen, die die Chromatinstruktur sowie die Genexpression

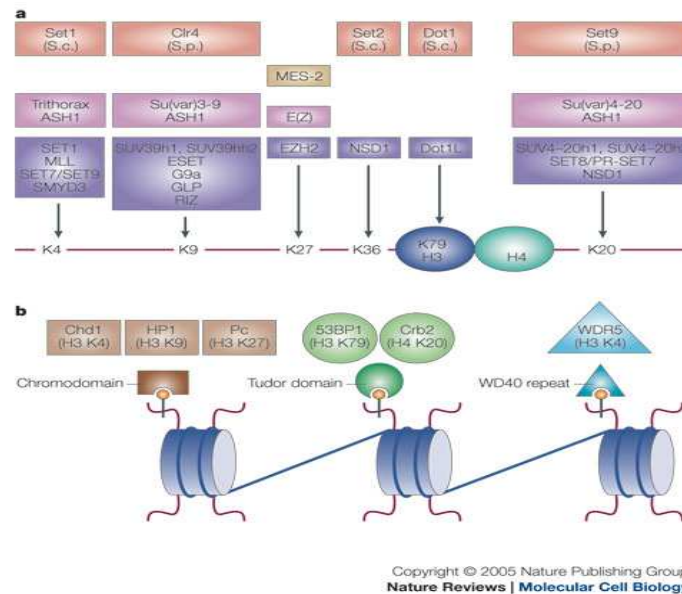
beeinflussen. Dadurch kommt es zum Wachstumsstillstand, zur Hemmung der Zelldifferenzierung und zur Apoptose von Tumorzellen. Zusätzlich verstärken HDAC-Inhibitoren den Effekt von Medikamenten, die zur Krebstherapie eingesetzt werden [57], [60], [61].

### **Histonmethylierung**

Die Methylierung von Lysin- oder Argininresten erfolgt fast ausschließlich an den Histonen H3 und H4. Die Methylierung von Argininresten wird durch Methyltransferasen, die der PRMT (*Protein ARginine MethylTransferases*) Klasse zugehörig sind, katalysiert [33], [62]. Die Methylierung von Lysinresten erfolgt durch Enzyme, die die sog. SET (*Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax*) Domäne enthalten. Während, wie vorher kurz geschildert, die Acetylierung im Allgemeinen zu einer Aktivierung der Transkription führt, kann die Histonmethylierung sowohl als Signal für die Aktivierung, als auch für die Repression fungieren. Welcher Prozess letztendlich ausgelöst wird, ist von der Lokalisation des Methylierungssignals abhängig [63]. Auch die Anzahl der angehängten Methylgruppen kann für bestimmte Prozesse, wie z.B die Inaktivierung des X-Chromosoms, verschiedene Auswirkungen haben.

In den letzten Jahren wurden bei Studien in unterschiedlichen Organismen mehrere Enzyme identifiziert, die ortsspezifische Histonmethylierungen katalysieren. Viele verschiedene biologische Prozesse, wie die Bildung von Heterochromatin, die Inaktivierung des X-Chromosoms, sowie die Regulation der Transkription werden durch Methylierungsprozesse beeinflusst [58]. Für das Erkennen bestimmter Methylierungssignale spielen mindestens drei Proteinmotive - die Chromodomäne, die Tudor Domäne und die WD40 *Repeat* Domäne (siehe Seite 9), die in der Lage sind, spezifische Interaktionen mit methylierten Lysinresten einzugehen (siehe Abb. 4) - eine entscheidende Rolle. Diese sind in nachfolgender Abbildung dargestellt.





**Abb. 4: Histonmethyltransferasen, ihre Substratspezifität und die Methyl-Lysin Bindedomänen. a)** Die Lysin-Methyltransferasen sind entsprechend dem spezifischen Lysinrest, den sie modifizieren, in Gruppen eingeteilt. Die Farbe ist entsprechend ihrer Herkunft gewählt (Hefe: rot; Wurm: gelb; Fliege: pink; Säugetier: violett). Methyltransferasen sind als *S.c* und *S.p* für *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* gekennzeichnet. Für die Enzyme aus Säugetieren ist nur der Name aus einer Spezies gewählt. Die „globulären“ Domänen der Histone sind oval und die Histon *Tails* sind als gerade Linien dargestellt. **b)** Methyl-Lysin Bindeproteine, die Chromodomäne, die Tudor Domäne oder die *WD40 Repeat* Domäne. Diese können nicht nur mit Methyl-Lysinen interagieren, sondern scheinen auch zwischen verschiedenen methylierten Histonen unterscheiden zu können [58].

Methylierungen an Lysin 9 bzw. Lysin 27 in H3 hemmen die transkriptionale Aktivität. Sie führen häufig zur Stilllegung von Genen [64]. Im Gegensatz dazu korrelieren Methylierungen der Lysine 4, 36 und 79 in Histon H3 mit der Initiation der Transkription [65], [66], [67].

Im Gegensatz zu den Histonmethyltransferasen haben die Histondemethylasen und -deiminasen die Aufgabe, Methylgruppen von den Histon *Tails* zu entfernen.

In aktuellen Studien konnten zahlreiche Histondemethylasen und -deiminasen isoliert und charakterisiert werden: PAD1-4 (*PeptidylArginine Deiminase 1-4*), LSD1 (*LySine Demethylase 1*) und JHDMs (*Jumonji C-domain containing Histone DeMethylases*) [41], [68], [69]. Histondemethylasen sind an der Regulation von Transkription und an der Proliferation von Krebszellen beteiligt. Das bedeutet, dass sie eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellhomeostase spielen und dass Fehler in deren Regulation zur

Entstehung von Krebs beitragen können [41]. JmjC (*Jumonji C*)-enthaltende Proteine sind wichtig für eine normale neuronale Funktion [70].

Die Involvierung von Histondemethylasen in Krankheit und Krebs bietet eine entscheidende Möglichkeit zur pharmakologischen Intervention durch die Herstellung spezifischer Inhibitoren dieser Enzyme. Inhibitoren von PAD1-4 und LSD1 wurden bereits identifiziert [71], [72], [73], [74].

### **Histonphosphorylierung**

Die Phosphorylierung ist eine weitere kovalente post-translationale Modifizierung von Histonen. Funktionell von Bedeutung im Kontext von Chromatin ist die Phosphorylierung von amino-terminalem S10 (Serin 10) in H3. Diese kann zwei unterschiedliche Effekte hervorrufen [75]. S10 Phosphorylierung ist notwendig für die Kondensation von Chromatin während der Mitose [76] und spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Transkription in eukaryontischen Genen [77], indem es die Acetylierung von K14 (Lysin 14) desselben Histon *Tails* auslöst [78], [79].

Weniger erforscht ist die Phosphorylierung von S28 (Serin 28) an Histon H3. Es konnte jedoch zum einen gezeigt werden, dass diese mit der Kondensation von Chromatin während der Mitose gekoppelt ist [80]. In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von S28 in H3.3 (s. u.) einen Einfluss auf die dynamische Assemblierung/Disassemblierung von Nukleosomen an aktiven Promotoren ausübt [81].

Weiterhin wurde entdeckt, dass die Histonvariante H2A.X (siehe Seite 14) von einem Mitglied der PI3KK (*Phosphatidylinositol 3-Kinase-like Kinase*) an S139 (Serin 139) phosphoryliert wird. Es wird angenommen, dass diese Modifikation, die post-replikative DNA Reparatur erleichtert [82].

*In vivo* Proteinexpressionsstudien zeigen, dass die Hyperphosphorylierung der Histone H1 und H3 zur Inhibition des durch den Glukokortikoidrezeptor vermittelten Chromatin *Remodellings* führt und somit den MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus promotor*) durch Verhinderung der Assoziation von Transkriptionsfaktoren inaktiviert [83].

## 1.2 Histonvarianten

In Eukaryonten sind die für Histone kodierenden Gene in multiplen Kopien in *Clustern* enthalten. Nur auf diese Weise ist es möglich, eine große Menge an Histonen zur Verfügung zu stellen, was Voraussetzung für die Verpackung neu replizierter DNA während der S-Phase des Zellzyklus ist [30]. Zusätzlich zu den Histonen H1, H2A, H2B, H3 und H4 gibt es die sogenannten Histonvarianten. Diese zeigen Unterschiede vor allem in ihrer Aminosäuresequenz, spielen jedoch auch funktionell distinkte Rollen [31], [84], [85].

Manche Histonvarianten werden in verschiedenen Zellzyklusphasen exprimiert. Zum Beispiel werden die Histonvarianten H3.1 und H3.2 von Säugetieren in der S-Phase exprimiert, während die Variante H3.3 unabhängig vom Zellzyklus synthetisiert wird.

Unterschiede in der Histonprimärstruktur können einen entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaft und die Funktion der Histone haben. Zum Beispiel unterscheidet sich das humane Histon H2A von der Variante H2A.Z durch die Substitution von 15 Aminosäuren in den helikalen Domänen sowie weiteren Insertionen und Deletionen am N- und C-terminalen Ende [86].

In der Abbildung 5 sind einige Histonvarianten unterschiedlicher Spezies und deren bisher beschriebenen Funktionen zusammengefasst.

Variant	Species	Chromatin effect	Function
H1 <sup>0</sup>	Mouse	Chromatin condensation	Transcription repression
H5	Chicken	Chromatin condensation	Transcription repression
SpH1	Sea urchin	Chromatin condensation	Chromatin packaging
H1t	Mouse	Open chromatin	Histone exchange, recombination?
MacroH2A	Vertebrate	Condensed chromatin	X-chromosome inactivation
H2ABbd	Vertebrate	Open chromatin	Transcription activation
H2A.X	Ubiquitous	Condensed chromatin	DNA repair/recombination/transcription repression
H2A.Z	Ubiquitous	Open/closed chromatin	Transcription activation/repression, chromosome segregation
SpH2B	Sea urchin	Chromatin condensation	Chromatin packaging
CenH3	Ubiquitous		Kinetochore formation/function
H3.3	Ubiquitous	Open chromatin	Transcription

**Abb. 5: Verschiedene Histonvarianten und ihre Funktionen [30].**

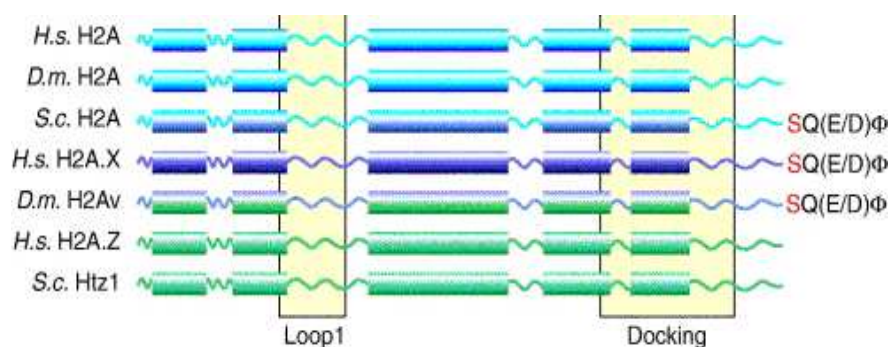
### **Histon H1 Varianten**

Das Histon H1 Molekül besitzt viele Sequenzvarianten, wie zum Beispiel H1<sup>o</sup>, H5 und etliche Spermien- und Testes-spezifische Varianten. Die größten Sequenzunterschiede finden sich in den N- bzw. C-terminalen Abschnitten dieser Proteine. Das Auftreten dieser H1 Varianten ist unter anderem abhängig vom Zelltyp, Zellzyklusphase, Differenzierung und Entwicklung [87], [88]. Weiterhin zeigen die H1 Histonvarianten verschiedene biophysikalische Eigenschaften [89] und ein unterschiedliches Verteilungsmuster im Genom [87].

### **Histon H2A Varianten**

Mit den bisher beschriebenen Varianten H2A.Z, H2A.X, macroH2A, H2A-Bbd und H2AvD besitzt das Histon H2A ein umfangreiches Spektrum an Varianten.

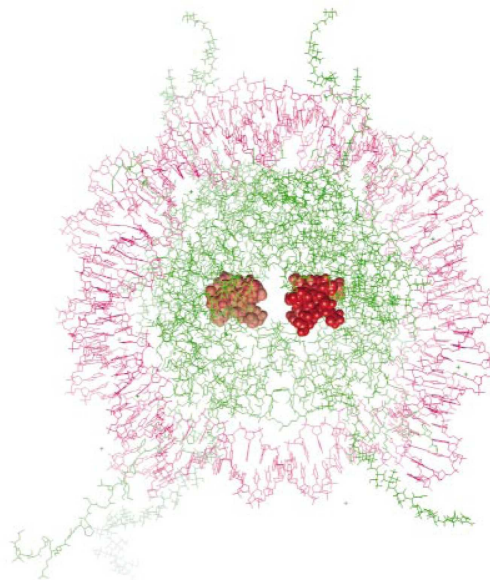
Einige Histonvarianten, wie H2A.Z wurden im Laufe der Evolution konserviert [90]. Während macroH2A [91] und H2A-Bbd [92] nur in Vertebraten und Säugetieren vorkommen, existieren H2A.X bzw. H2A.Z in allen Organismen. Die Variante H2AvD ist eine *Drosophila*-spezifische Variante. Sie verbindet sehr wahrscheinlich die Funktionen und Eigenschaften von H2A.Z und H2A.X (siehe Abb. 6).



**Abb. 6: Histon H2A und seine Varianten aus Hefe (*S. cerevisiae*; *S.c.*), Fruchtfliege (*D. melanogaster*; *D.m.*) und Mensch (*Homo sapiens*; *H.s.*). H2A.X besitzt C-terminal mehrere Aminosäuren, die einen Serinrest (rot) enthalten, der nach der Schädigung der DNA phosphoryliert wird. Zwei funktionell wichtige Domänen unterscheiden H2A.Z Varianten von anderen H2A Verwandten (gelbe Kästen). Strukturunterschiede in *Loop 1* verhindern die Assemblierung von Nukleosomen, die sowohl eine Kopie von H2A als auch eine Kopie von H2A.Z enthalten. Die *Docking* Domäne rekrutiert das (H3-H4)<sub>2</sub> Tetramer; Unterschiede in dieser Domäne haben einen Einfluss auf die Stabilität der Nukleosomen [84].**

H2A.X und H2A.Z werden konstitutiv exprimiert. H2A.Z zeigt eine gewisse Anreicherung in intergenischen Regionen [93], [94]. In einer *in vitro* Studie konnte gezeigt werden, dass H2A.Z zusammen mit HP1 $\alpha$  (*Heterochromatin Protein 1 $\alpha$* ) eine Kondensierung von Chromatinfasern bewirken kann [95].

H2A.Z erleichtert die Faltung der nukleosomalen Filamente in eine kompaktere Faserstruktur durch Vermeidung von Aggregation einzelner Fasern [96]. Des Weiteren kann H2A.Z das Histonoktamer innerhalb eines Nukleosoms stabilisieren [97]. Eine solche spezielle Konformation des Chromatins könnte die Beteiligung von H2A.Z bei der Trennung von Chromosomen, der Genomstabilität und der DNA Reparatur erklären, indem bestimmte DNA Abschnitte speziellen Enzymmaschinerien zugänglich gemacht werden [98], [99], [100]. In Hefe existiert die H2A Variante Htz1, welche vor allem an reprimierten Promotoren lokalisiert ist [100], [101]. Es wurde gezeigt, dass die Inkorporation von Htz1 in Nukleosomen mit besonderen Histonmodifikationen, wie der Acetylierung von Lys 14 einhergeht [79], welches an der Aktivierung von Genen im gesamten Genom beteiligt ist. Aufgrund aktueller Studien wird spekuliert, dass Htz1 „stille“ Promotoren für die Aktivierung der Transkription kennzeichnet [100], [101]. Wie bereits erwähnt existiert in *Drosophila* eine H2A Variante: H2AvD [102], [103].



**Abb. 7: Molekulares Modell des Histon Cores, das die Histonvariante H2AvD enthält. Die C-terminale Domäne, die für die Funktion essentiell ist, ist in rot dargestellt [104].**

H2AvD wird in einer einzigen Kopie in der Region 97CD von Chromosomen kodiert. In *Drosophila* Embryonen ist H2AvD während der ersten zwölf Stunden ubiquitär vorhanden, seine Menge nimmt jedoch in weiter entwickelten Embryonen ab [104].

H2AvD verhält sich genetisch wie ein *Pc-G* Gen, d.h. es gehört zu einer Gruppe von spezifischen Genen, die einen reprimierten Transkriptionsstatus aufrechterhalten [1]. Das könnte bedeuten, dass diese Histonvariante an der Stilllegung von Euchromatin und der Bildung von Heterochromatin beteiligt ist. Aufgrund einer aktuellen Studie wird angenommen, dass eine geordnete Kaskade von molekularen Abläufen zur Etablierung von Heterochromatin in *Drosophila* führt [105]. Das erfordert einerseits die Rekrutierung der Histonvariante H2AvD und die anschließende Acetylierung von Lys 12 in H4. Die Methylierung von Lys 9 in H3 und die Rekrutierung von HP1 sind weitere wichtige Schritte zur Bildung von Heterochromatin [105].

### ***Histon H3 Varianten***

Es existieren bisher drei gut beschriebene Varianten von Histon H3: H3.1, H3.3 und Cid (in *Drosophila melanogaster*) [85], [106], [107].

Cid ist ein essentielles Protein, das vorwiegend am Zentromer vorkommt. Trotz der starken Ähnlichkeit der Histon *Fold* Domäne unterscheiden sich die Zentromer-assoziierten Proteine unterschiedlicher Organismen besonders in ihrem N-terminalen Anteil [106]. Die Varianten H3.3 bzw. H3.1 kommen in aktiven, respektive inaktiven Regionen vor [108], [109].

Es sind auch Varianten der Histone H2B und H4 bekannt [11], [110]. Ihre Funktion ist jedoch noch nicht ausreichend aufgeklärt.

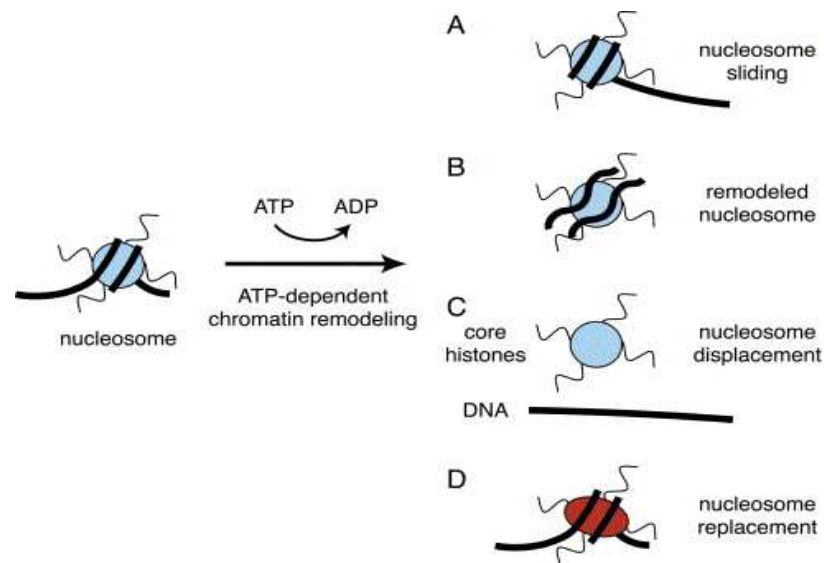
### **1.3 ATP-abhängige Chromatin *Remodelling* Maschinen**

Veränderungen der Chromatinstruktur spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Genen. Eine entscheidende Rolle hierbei haben ATP-abhängige Chromatin *Remodelling* Enzyme, die mit Hilfe der ATP-Hydrolyse strukturelle Veränderungen an Nukleosomen bewirken können [111], [112], [113], [114], [115].

*Remodelling* Faktoren interagieren mit der DNA und den Histonen. Das Binden von ATP und die anschließende Hydrolyse lösen vermutlich eine Reihe von Konformationsänderungen innerhalb der Enzyme aus, die zu einer teilweisen Ablösung der DNA von der Histonoberfläche führen. Dieser Vorgang und die Beteiligung von Kofaktoren, wie z.B. Histon oder DNA *Chaperone*, können zum partiellen oder kompletten Abbau des Histonoktamers führen, bzw. eine Verlagerung von intakten Nukleosomen an der DNA bewirken [29]. In Abwesenheit von Kofaktoren, die den „remodellierten“ Zustand stabilisieren, kommt es sehr rasch zur Rückkehr in die „kanonische“ Struktur. Chromatin, das dem ATP-abhängigen *Remodelling* unterliegt, kann als „dynamisch“ oder „fluide“ bezeichnet werden. *Remodelling* kann nukleosomale DNA zugänglich machen, was jedoch nicht notwendigerweise mit der Aktivierung der zugrunde liegenden Gene korreliert, da sowohl Aktivatoren als auch Repressoren von der transienten Zugänglichkeit zur DNA profitieren können. Des Weiteren kann das Verschieben von Nukleosomen an der DNA (*Sliding*) dazu dienen, eine gewisse Stelle an der DNA frei zu machen oder dazu beitragen, Inhomogenitäten in den nukleosomalen Anordnungen „auszugleichen“, um eine Faltung in eine kompaktere Form zu ermöglichen [32], [116], [117].

Kontrolliertes, Energie-abhängiges nukleosomales *Remodelling* ist sehr bedeutend für die Kontrolle von Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Fehler oder Mutationen in diesen Systemen können zu neoplastischen Veränderungen führen [118], [119].

Die exakten molekularen Mechanismen des „*Remodellings*“ wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht, und haben eine Reihe von zum Teil überlappenden Eigenschaften aufgedeckt, die entscheidende Funktionen bei verschiedenen Regulationsvorgängen sowie bei *Targeting* Prozessen aufweisen [29], [119], [120], [121], [122], [123].



**Abb. 8: Verschiedene Möglichkeiten des ATP-abhängigen Chromatin *Remodellings*.** ATP-abhängige *Remodelling* Komplexe nutzen die Energie aus der ATP-Hydrolyse, um Histon-DNA Kontakte zu verändern. Das kann auf folgende Weise passieren: A) Durch nukleosomales *Sliding* werden Nucleosomen entlang der DNA verschoben und neu an der DNA positioniert. B) Es wird ein „remodellierter“ Zustand erzeugt, in dem DNA besser zugänglich ist. Die Histone bleiben jedoch an der DNA. C) DNA und Histone werden komplett voneinander getrennt, oder D) Histone werden durch Histonvarianten ersetzt. Es ist zu beachten, dass die verschiedenen Modelle des Chromatin *Remodellings* nicht notwendigerweise unabhängig voneinander ablaufen müssen [118].

Alle nukleosomalen *Remodelling* Maschinen gehören der SWI2/SNF2 Familie von ATPasen an [124]. Diese können wiederum in sieben Subfamilien - entsprechend ihrer charakteristischen Eigenschaften - unterteilt werden [29], [125]. Im folgenden Abschnitt werden die vier am besten untersuchten Subfamilien näher beschrieben: die SWI/SNF Familie, die ISWI Familie, die CHD Familie und die INO80 Familie (siehe auch Abb. 9).



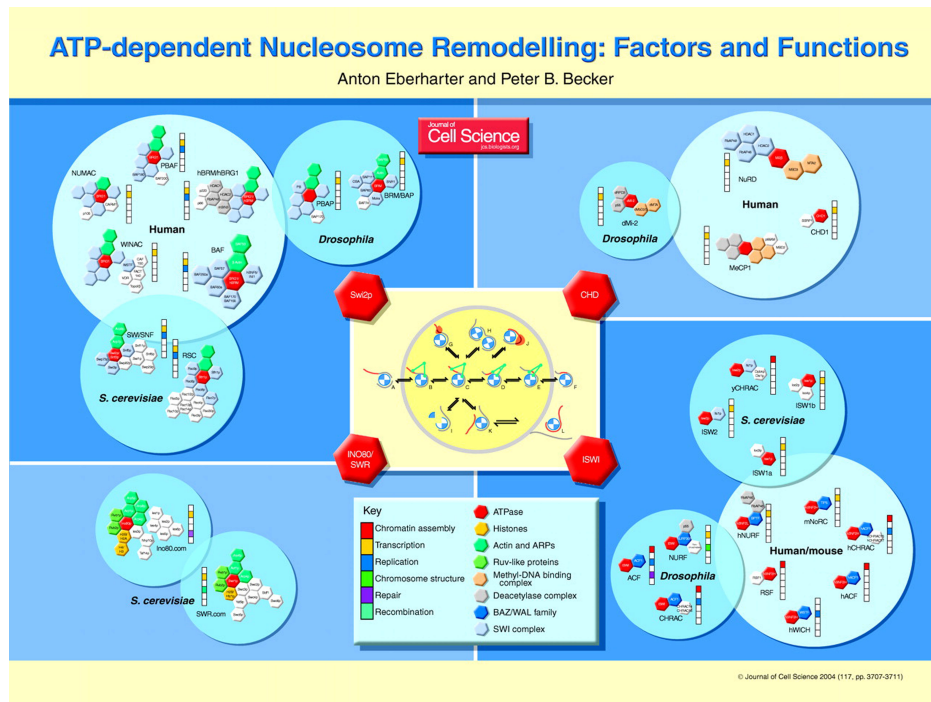


Abb. 9: Überblick über die vier großen Familien der *Remodelling* Faktoren [29].

### 1.3.1 Die SWI/SNF Familie

Der SWI/SNF Komplex wurde zuerst in Hefe entdeckt [126], [127]. Die Isolierung zweier Hefemutanten gab dem Komplex seinen Namen, wobei eine Mutante eine verminderte Fähigkeit besitzt in einem Medium das Sucrose enthält zu wachsen (*Sucrose Non Fermenting*, *SNF*). Die zweite weist eine fehlerhafte *mating type switching* Fähigkeit auf (*SWI*ting *mating type*, *SWI*). Der Komplex besitzt ein Molekulargewicht von etwa 1,5-2 MDa und enthält elf Untereinheiten, von denen zehn charakterisiert wurden [128]. Ein zweiter SWI/SNF-ähnlicher Komplex in Hefe, RSC (*Remodels the Structure of Chromatin*), enthält einige Proteine, die homolog zu den Komponenten des SWI/SNF Komplexes sind. RSC verändert das Chromatin über eine ATP-abhängige Translokation der DNA an Histonoktameren [129], [130]. Der RSC Komplex kommt in etwa zehnmal häufiger als SWI/SNF in einer Zelle vor und ist im Gegensatz zu SWI/SNF lebensnotwendig [131].

In *Drosophila* ist BRM (BRahMa) das homologe Enzym zur Swi2/Snf2 ATPase. BRM existiert in zwei verwandten Komplexen, die viele Untereinheiten besitzen: der BAP (BRahma Assoziierte Proteine) Komplex, der im Menschen dem BAF (BRG1 Associated Factor) und in Hefe dem SWI/SNF Komplex entspricht [132], [133] und PBAP (Polybromo-assoziiertes BAP) Komplex [118], [134], der im Menschen dem PBAF (Polybromo-assoziiertes BAF) und in Hefe dem RSC Komplex entspricht. Die nachfolgende Abbildung vergleicht die SWI/SNF Komplexe und ihre Untereinheiten in verschiedenen Spezies.

Yeast		Drosophila		Human	
SWI/SNF	RSC	BAP	PBAP	BAF	PBAF
Swi2/Snf2	Sth1	Brahma	Brahma	BRG1 or hBRM	BRG1
Swi1/Adr6		OSA		BAF250	
	Rsc1, Rsc2, Rsc4		Polybromo		Polybromo/BAF180
	Rsc9*		BAP170*		
Swi3	Rsc8	Moirá	Moirá	BAF170 & BAF155	BAF170 & BAF155
		BAP111	BAP111	BAF57	BAF57
Swp73	Rsc6	BAP60	BAP60	BAF60a	BAF60a or BAF60b
Swp61/Arp7	Rsc11/Arp7	BAP55	BAP55	BAF53	BAF53
Swp59/Arp9	Rsc12/Arp9				
		actin	actin	actin	actin
Snf5	Sfh1	Snr1	Snr1	hSNF5/INI1	hSNF5/INI1
	Rsc5, 7, 10, 13-15				
	Rsc3, Rsc30				
Swp82					
Swp29/Tlg3/TAF30/Anc1					
Snf6, 11					

**Abb. 10:** Die SWI/SNF Chromatin *Remodelling* Komplexe aus Hefe, *Drosophila* und Mensch. Konservierte Untereinheiten sind horizontal aufgelistet, wobei die ATPase Untereinheit an erster Stelle steht [134].

In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass SWI/SNF Komplexe eine hohe Bedeutung bei zellulären Abläufen, einschließlich der Genregulation, Zellzykluskontrolle, Entwicklung und Differenzierung von Zellen haben. Eine umfangreich diskutierte Eigenschaft der ATP-abhängigen Chromatin *Remodelling* Maschinen, insbesondere der SWI/SNF Komplexe, ist ihre Fähigkeit *in vitro* Nukleosomen entlang der DNA zu mobilisieren (*Sliding*). Des Weiteren führt *Remodelling* zum Lösen der DNA Enden von Histonoktameren oder der Bildung von

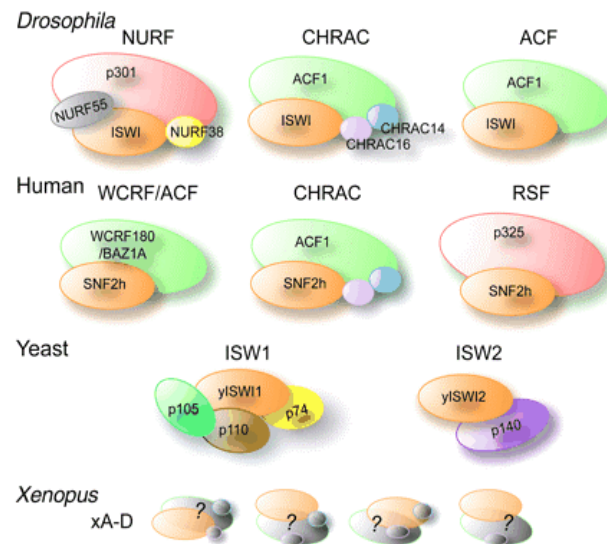
DNA Schleifen - Prozesse, die alle mit einer Veränderung der Zugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren zur nukleosomalen DNA einhergehen [111], [132], [135], [136], [137].

*In vitro* und *in vivo* Daten geben auch Hinweise, dass sowohl SWI/SNF Komplexe als auch RSC Komplexe eine Schlüsselrolle bei der Reparatur von DSB spielen [138], [139]. Der humane SWI/SNF Komplex scheint einen Einfluss bei der Entstehung von Tumoren zu haben, da mehrere Untereinheiten eine intrinsische Tumorsuppressoraktivität besitzen, oder für die Aktivierung von Tumorsuppressorgenen benötigt werden [118], [140]. Zum Beispiel ist SNF5, eine Untereinheit des SWI/SNF Komplexes, in kindlichen hochmalignen rhabdoiden Tumoren spezifisch inaktiviert [141]. Weitere spezifische Mutationen in BRG1 (*Brahma Related Gene 1*), der katalytischen ATPase Untereinheit des humanen SWI/SNF Komplexes, wurden in Zelllinien von Pankreas-, Lungen- und Prostatakarzinomen gefunden [140]. SWI/SNF Komplexe interagieren auch direkt mit Tumorsuppressorgenen und Onkogenen, wie RB (*RetinoBlastoma protein*), BRCA1 (*BReast CAncer 1*), c-MYC und MLL (*Mixed Lineage Leukaemia*) [140], [141], [142], [143].

### 1.3.2 Die ISWI Familie

Die ISWI (*Imitation SWItch*) Chromatin *Remodelling* ATPase wurde wegen seiner Homologie zu SWI2/SNF2 zuerst in *Drosophila melanogaster* identifiziert [144]. ISWI-enthaltende *Remodelling* Komplexe kommen in allen Eukaryonten vor und bilden eine wichtige Untergruppe der SWI2/SNF2 ATPase Familie [26]. In *Drosophila* kommt ISWI in drei bekannten Chromatin *Remodelling* Komplexen vor: NURF (*NUcleosome Remodelling Factor*), ACF (*ATP-utilizing Chromatin and Remodelling Factor*) und CHRAC (*CHromatin Accessibility Complex*) [145], [146], [147]. In allen drei Komplexen dient ISWI als ATP-abhängiges Enzym, das die Assemblierung von Nukleosomen steuert sowie Veränderungen in der Nukleosomenstruktur hervorrufen kann [148], [149], [150]. ISWI kooperiert mit verschiedenen Untereinheiten der Komplexe und verleiht somit NURF, ACF und CHRAC spezifische Aufgaben.

Abbildung 11 zeigt ISWI-enthaltende Komplexe in *Drosophila*, Mensch [142], [151], [152], [153], [154], Hefe [155], [156] und *Xenopus* [157], [158].



**Abb. 11:** Die ISWI-enthaltenden *Remodelling* Komplexe mit bisher bekannten Untereinheiten. Die Proteinfamilien sind farblich gekennzeichnet [159].

*Drosophila* ISWI besitzt eine gewisse Anzahl von Domänen und Motiven, die innerhalb der ISWI Subfamilie konserviert sind [26]. Die molekulare Gesamtstruktur des Proteins ist bis dato noch nicht gänzlich geklärt. Eine limitierte Proteolyse von ISWI hat zwei kompakt gefaltene Untereinheiten identifiziert [160]. Beide sind notwendig für die nukleosomale stimulierte ATPase Aktivität und beide binden Nukleosomen und DNA *in vitro*. Die Bestimmung der Kristallstruktur des C-Terminus gibt Rückschlüsse darauf, wie das Enzym mit seinem nukleosomalen Substrat interagieren könnte. Der zylindrisch geformte C-Terminus von ISWI besteht aus zwölf  $\alpha$ -Helices, welche in drei strukturelle Domänen gefaltet sind - HAND, SANT (*SWI3*, *ADA2*, *N-COR*, und *TFIIB*) und SLIDE (*SANT-Like Domain*). Diese drei Domänen sind eng miteinander verbunden und unterstützen vermutlich als gemeinsame Einheit den *Remodelling* Prozess [160]. Es wurde gezeigt, dass SANT Domänen anderer Proteine Histon *Tails* binden [161]. Die SLIDE Domäne ist essentiell für die Chromatin *Remodelling* Aktivität von ISWI und bindet vor allem DNA [150], [160], [162].

In dNURF ist ISWI mit drei Untereinheiten assoziiert, die ein Molekulargewicht von 300 kDa, 55 kDa und 38 kDa besitzen - NURF301, NURF55 und NURF38. NURF55 ist ein WD40 Protein, welches auch in anderen Komplexen existiert und am Histonmetabolismus beteiligt ist [163]. NURF301 ist die größte Untereinheit des dNURF Komplexes. Mutationen die zu einem Verlust von NURF301 in *Drosophila* Embryonen führen, resultieren in einem Entwicklungsabbruch im Larvenstadium [164], [165]. Frühere Arbeiten zeigen, dass NURF eine Rolle in der Aktivierung der Transkription spielt - es wurden *Heat Shock* Gene und homeotische Gene identifiziert, deren Expression von der Funktion von NURF301 abhängig ist [164], [166]. Neuere Ergebnisse geben eine klare Erklärung für Fehlfunktionen, die in NURF301 Mutanten beobachtet wurden und etablieren NURF als einen Chromatin *Remodelling* Komplex, der für die zeitgemäße Aktivierung eines definierten transkriptionalen Programms während der Entwicklung benötigt wird [164], [165]. NURF38 ist eine Pyrophosphatase, deren Funktion im nukleosomalen *Remodelling* bis dato noch nicht genau bekannt ist.

ACF und CHRAC sind zwei ähnliche Komplexe. In beiden ist die ATPase ISWI mit dem 180 kD Protein ACF1 assoziiert [167], [168]. CHRAC besitzt darüber hinaus noch zwei weitere Untereinheiten: CHRAC14 und CHRAC16 [169], [170]. ACF1 beeinflusst die Aktivität von ISWI nicht nur indem es mit dem Enzym interagiert [26], [118], [168], [171], sondern scheint auch direkt nukleosomales Substrat zu binden [26], [171]. Der C-Terminus von ACF1 besitzt zwei PHD Finger, die für die Stimulation der ISWI Aktivität wichtig sind und mit den „globulären“ Domänen der *Core* Histone interagieren, sowie *in vitro* notwendig für das Binden von Nukleosomen sind [26], [168], [172]. Folglich scheint ACF1 eine aktive Rolle zu spielen, indem es ISWI nukleosomales Substrat präsentiert [97].

Die für CHRAC spezifischen Untereinheiten CHRAC14 und CHRAC16 stimulieren die durch ISWI vermittelte Mobilisierung von Nukleosomen, wenn ISWI und ACF1 in begrenzter Konzentration vorliegen [127], [173]: eine schwache Sequenz-unabhängige DNA Bindeaktivität von CHRAC14/16 ist behilflich bei der Stimulation von ISWI. Es wird vermutet, dass CHRAC14/16 Heterodimere die DNA, die während des Mobilisierungsprozesses von Nukleosomen „befreit“ wurde, transient binden. Unterstützt wird diese These durch die Analyse von mutierten CHRAC14/16 Heterodimeren, die eine

stark erhöhte DNA Bindeaktivität zeigen. Diese Mutanten behindern nukleosomales *Sliding*, was bedeuten könnte, dass nukleosomal freie DNA so effizient gebunden wird, dass keine Ablösung mehr möglich ist [170].

ISWI-enthaltende Komplexe spielen auch eine bedeutende Rolle in der Repression der Transkription und interagieren mit bekannten Repressoren, die an die DNA binden [121], [174]. Eine wichtige Eigenschaft, die alle drei genannten Komplexe besitzen, ist, dass sie die Position von Nukleosomen an der DNA und somit die Zugänglichkeit für weitere Enzymmaschinerien verändern können [150], [175], [176]. Das Existieren verschiedener Komplexe lässt vermuten, dass eukaryontische Zellen unterschiedliche Chromatin *Remodelling* Aktivitäten besitzen, die auf diverse Zielregionen gerichtet und in unterschiedliche Prozesse involviert sind. Das erscheint logisch, da Chromatin *Remodelling* nicht nur einen Beitrag zur Initiation und Elongation der Transkription leistet, sondern auch zur DNA Replikation, DNA Reparatur und eventuell zur Progression des Zellzyklus. In neueren Studien wurden zusätzliche Optionen zur Regulation von ISWI aufgedeckt: ISWI wird *in vivo* post-translational durch Acetylierung modifiziert. Die Aminosäuresequenz, die das acetylierte Lysin umgibt zeigt Ähnlichkeiten zu der Sequenz die K14 von Histon H3 umfasst. In der Tat wird ISWI an dieser Stelle *in vitro* effektiv von der Histonacetyltransferase GCN5 acetyliert, wobei das Niveau der Acetylierung während der Embryogenese moduliert wird. Dies lässt vermuten, dass die Acetylierung von ISWI entwicklungsabhängig kontrolliert wird [177].

### ***1.3.3 Die CHD Familie: dCHD1, dCHD3, dMi-2 und Kismet***

Die CHD Familie in *Drosophila melanogaster* besteht aus mehreren Mitgliedern, von denen CHD1, CHD3, Mi-2 (*Antigen recognized by the patient Mitchell autoimmune antibodies 2*) und Kismet am besten untersucht sind. Allen Mitgliedern ist ein Paar von Chromdomänen gemeinsam. CHD1, CHD3 und Mi-2 besitzen weiterhin einen oder zwei PHD Zink Finger in ihren N-terminalen Abschnitten. Kismet zeichnet sich hingegen durch eine BRK (*BReast Tumor Kinase*) Domäne aus, die in den anderen CHD Mitgliedern nicht gefunden wird.

In neueren Studien wurde beschrieben, dass die Chromodomänen der CHD Proteine spezifisch mit Histon *Tails* von H3, die an Lys 4 methyliert sind, interagieren [178], [179], [180] und unter ATP-Hydrolyse Nukleosomen verschieben können [181].

Mi-2 ist eine ATPase der SWI2/SNF2 Familie [182]. Mi-2 verwandte Enzyme sind Bestandteile von hochmolekularen Komplexen (Mi-2/NuRD/NURD/NRD) [123], [183], [184], [185], [186], [187], [188], [189], [190]. Wie ATP-abhängiges *Remodelling* und Deacetylase Aktivität in Mi-2 Komplexen zusammen arbeiten, ist noch nicht genau geklärt. Zwei Studien zeigten, dass ATP-abhängiges Chromatin *Remodelling* über die Mi-2 Untereinheit die Deacetylierung erleichtert [186], [191]. Die Chromodomäne von Mi-2 ist wichtig für die feste Bindung an Nukleosomen, wobei sie methylierte Histone erkennen kann [188]. Die Mi-2 Aktivität wird durch Phosphorylierung über die Casein Kinase 2 reguliert [188]. Des Weiteren spielt Mi-2 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*, indem es die Transkription entweder hemmt [187], [189], [190] oder aktiviert [192].

Zudem wurde gezeigt, dass CHD1 stark mit der aktiven Form der RNA-Polymerase II kolokalisiert [192]. Kürzlich wurde entdeckt, dass die Chromodomänen von CHD1 Proteinen spezifisch mit H3 Histon *Tails*, die an K4 methyliert sind, interagieren [179], [180]. Diese Histon Methylierung ist eine Markierung für aktiv transkribiertes Chromatin. Im Vergleich zu den meisten anderen *Remodelling* Faktoren scheint CHD1 hauptsächlich als Monomer zu existieren [181]. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse CHD1 eine Rolle bei der „Öffnung“ von Chromatin zur Förderung der Transkription zu [97].

Das *kismet* Gen wurde 1998 als *Trithorax (Trx)* Gen identifiziert [193]. Es kodiert für ein langes (KIS-L) und für ein kurzes (KIS-S) Protein, bestehend aus 574 kDa bzw. 225 kDa [194], [195]. Zusätzlich zu seiner ATPase Domäne und den zwei Chromodomänen enthält KIS-L eine BRK (BRM und KIS) Domäne, die ebenfalls in BRM zu finden ist. Die Sequenz von KIS-S korrespondiert mit dem letzten Drittel von KIS-L, das der BRK Domäne entspricht und damit keine Funktion besitzt. Damit gehört KIS-S im Gegensatz zu KIS-L nicht zu den ATP-abhängigen *Remodelling* Maschinen. Interessanterweise wurde gezeigt, dass KIS-L nicht nur Proteinsequenzen mit CHD und BRM ATPasen teilt, sondern auch überlappende Eigenschaften mit diesen Enzymen zeigt: z.B. kolokalisiert

KIS-L stark mit den drei Proteinen CHD1, Mi-2, und BRM an Interbanden von Polytän Chromosomen, an welchen die RNA-Polymerase II zu finden ist [192]. Diese Beobachtungen bedeuten, dass KIS-L in die Regulation der Transkription involviert ist. Immunfärbungen geben Hinweise, dass die globale Rolle von KIS-L in der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription liegt, indem es den Übergang von der Initiation zur Elongation der Transkription erleichtert [192]. Weitere Funktionen liegen möglicherweise im *Notch* Signaltransduktionsweg [195], [196], [197].

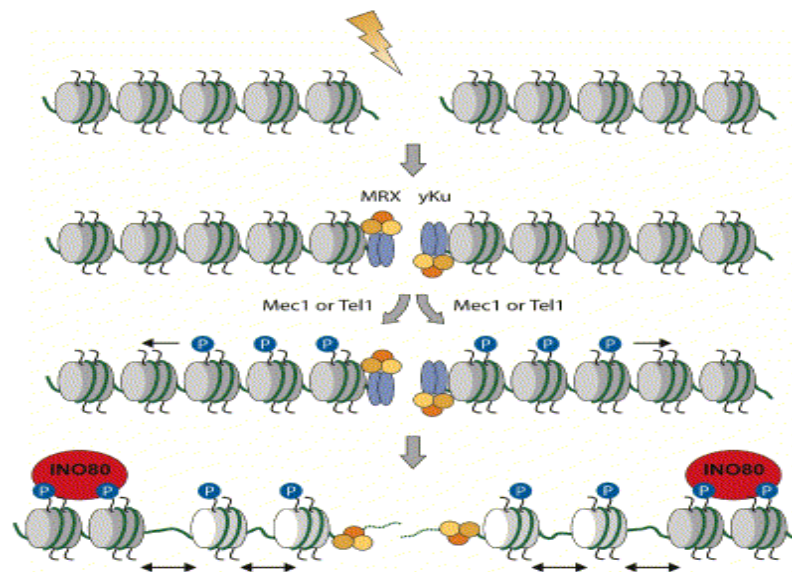
#### ***1.3.4 Die Familie der split-ATPasen in Hefe : INO80 und SWR1***

Ino80 und Swr1 gehören ebenfalls zu den Swi2/Snf2-ähnlichen ATPase/Helikase Proteinen. Sie unterscheiden sich jedoch von den anderen SWI2/SNF2 Mitgliedern durch eine Insertion von Aminosäuren, die die konservierte ATPase Domäne in zwei Segmente teilt. Die funktionelle Bedeutung dieser Zweiteilung der ATPase/Helikase Domäne ist bis dato noch nicht bekannt. Wie bereits für die anderen Untergruppen erwähnt, existieren sowohl Ino80 als auch Swr1 in hochmolekularen Proteinkomplexen.

#### **INO80 Komplexe**

Ino80 bildet die katalytische Untereinheit der INO80 Komplexe, welche aus etwa 13 weiteren Proteinen aufgebaut ist [198], [199], [200]. Diese Proteine können die Aktivität des Enzyms beeinflussen. Die sogenannten ARPs (*Actin Related Proteins*), insbesondere Arp5 und Arp8, sind notwendig für die enzymatische Aktivität von INO80 [201] und können direkt an Histone binden. Folglich könnten sie als Histon Bindungsmodul fungieren [201]. In aktuellen Studien im Modellorganismus *S. cerevisiae* wurde die Bedeutung eines INO80-enthaltenden Komplexes bei der Regulation der Transkription und der Reparatur von DSB dokumentiert [202], [203]. Die an DSB massiv auftretende Phosphorylierung von H2A an Serin 129 wirkt über Arp4 als Rekrutierungssignal dieses *Remodelling* Komplexes (siehe Abb. 12). Es konnte auch gezeigt werden, dass INO80 direkt mit phosphoryliertem H2A interagieren kann [98], [204].





**Abb. 12: Modell für die Reparatur von DSB in *S. cerevisiae*.** Nach Auftreten von DSB werden die DNA Enden von spezifischen Proteinen gebunden, es kommt zur Phosphorylierung von H2A Ser 129. Dem folgt die Rekrutierung von NuA4 (Histonacetyltransferase) und des INO80 Komplexes. Die Chromatin Remodelling Aktivität von INO80 wird für die Verbesserung der Zugänglichkeit zum prozessierten 3'DNA Überhang benötigt. Dies wird wahrscheinlich durch das Entfernen von Nukleosomen ermöglicht [203].

Papmichos et al. konnten zeigen, dass INO80 notwendig ist um die Phosphorylierung von H2A an DSB aufrechtzuerhalten. Es kann auch die SWR1-vermittelte Htz1 Inkorporation (s. u.) antagonisieren [205]. Zudem wird vermutet, dass INO80 zusammen mit SWR1 den Austausch von H2A Varianten katalysiert, die den Neueintritt von Zellen in den Zellzyklus nach DNA Schädigung kontrollieren. In diesem Modell ermöglicht es INO80 den Zellen, beschädigte Chromosomen zu segregieren, indem die Phosphorylierung von H2A aufrecht erhalten wird, die speziell in der Umgebung von DSB vorkommt und dadurch die Anpassung an Kontrollpunkte des Zellzyklus erlaubt [205], [206]. INO80 wird ebenfalls für das Entfernen von H3 und H2B aus ~40 kb Domänen, die DSB umgeben, benötigt [207]. Das humane INO80 Protein (hINO80) enthält die charakteristischen sieben Motive der Swi2/Snf2 Helikase Domäne, die über eine Region von 700 Aminosäuren verteilt sind und eine mögliche DNA Bindedomäne, DBINO (*DNA Binding domain of INO80*). hINO80 besitzt sowohl am N-Terminus, als auch am C-Terminus ein starkes Kernlokalisierungssignal [208]. Das Protein zeigt nur in Anwesenheit von Doppelstrang-DNA ausgeprägte ATPase Aktivität.

## SWR1 Komplexe

Der zweite Vertreter aus der Familie der *split*-ATPasen - Swr1 - wurde ursprünglich ebenfalls aus *S. cerevisiae* gereinigt [99]. Swr1 bildet mit weiteren Proteinen und Htz1 einen Komplex. Htz1 ist in Hefe ein orthologes Histon der Histonvariante H2A.Z und wird von SWR1 in einem ATP-abhängigen *Remodelling* Prozess in Nukleosomen inkorporiert [99], [100], [209], [210], [211], [212]. Verschiedene Experimente konnten zeigen, dass Htz1 vor allem an Promotorregionen angereichert wird. Das bedeutet jedoch nicht, dass Htz1 für die Aktivierung der Transkription verantwortlich ist - es zeigte sich auch eine Anreicherung von Htz1 an Promotoren von inaktiven Genen [100], [213]. Die Inkorporation von Htz1 kann daher als epigenetischer Marker für verschiedene regulatorische Effekte von Genen dienen. Der Mechanismus dieses Prozesses ist bis dato noch nicht komplett verstanden, es scheint jedoch, dass die Acetylierung von Histon *Tails* hierbei eine Rolle spielt [213], [214].

In eleganten *in vitro* Experimenten wurde der SWR1-vermittelte Austausch von H2A/H2B durch Htz1/H2B demonstriert. Die Inkorporation von Htz1 in Chromatin geschieht über eine ATP-abhängige Reaktion und benötigt darüberhinaus die SWR1 Untereinheiten Arp4 und Arp6 sowie Bdf1 [215].

Mehrere Untereinheiten von SWR1, wie Act1, Arp4, Rvb1 und Rvb2, finden sich auch im INO80 Komplex [216] sowie im NuA4 HAT Komplex (siehe Abb.13) [217].

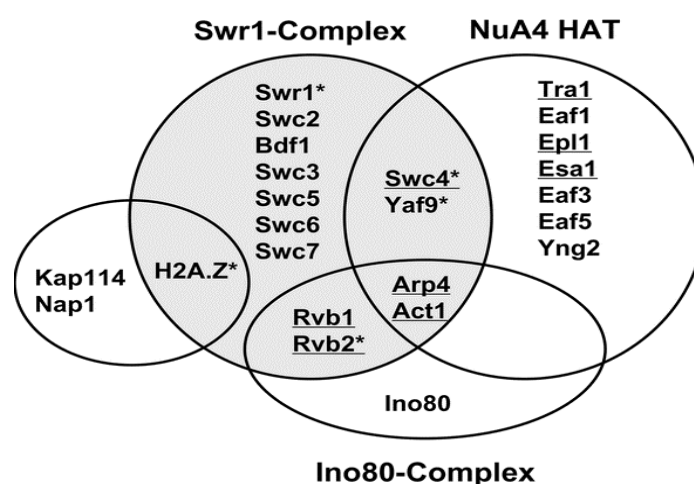
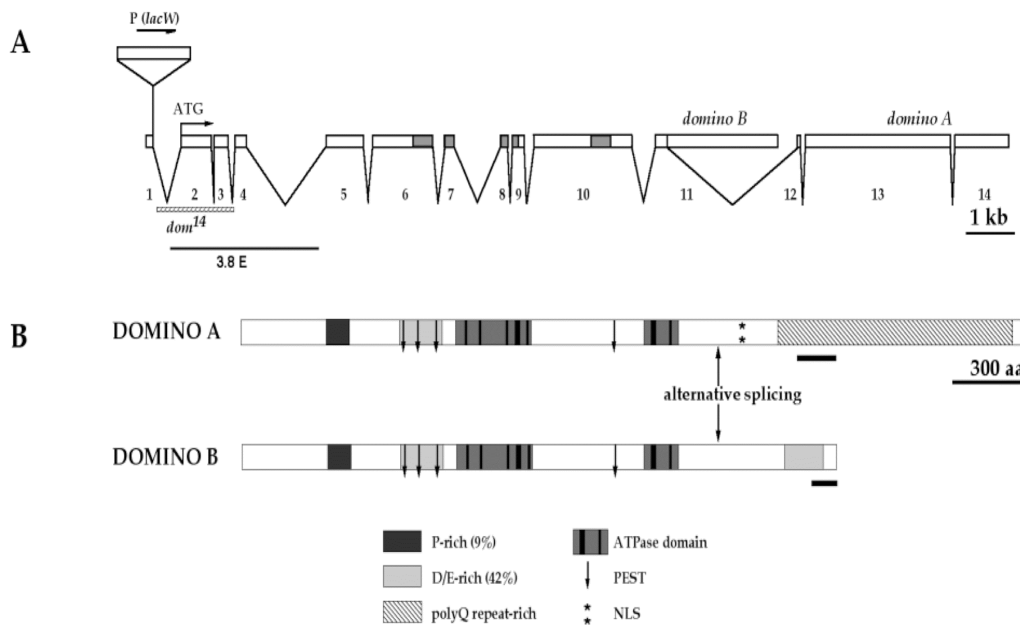


Abb. 13: Architektur der Untereinheiten des SWR1 Komplexes und die Überlappungen mit NuA4 und INO80 Komplexen [209].

Ähnliche Interaktionen zwischen SWR1 und Htz1 Homologen wurden auch in Säugetieren beobachtet [216], [218].

### ***1.3.5 Drosophila split-ATPasen - Domino A und Domino B***

Ursprünglich wurde das *domino* Gen erstmals in einem *Screening* auf Mutationen entdeckt, welche hämatopoetische Fehlbildungen verursachen [219]. In *domino*-mutierten *Drosophila* Embryonen konnten keine zirkulierenden Erythrozyten gebildet werden. Des Weiteren führten bestimmte *domino* Mutationen zu einer Suppression des Immunsystems mit einer folglich stark erhöhten Anfälligkeit der betroffenen Embryonen gegenüber Infektionen mit Viren, Bakterien und Pilzen. In verschiedenen Analysen konnte gezeigt werden, dass *domino* sowohl für die Zellstabilität und Zellproliferation als auch für die Oogenese notwendig ist [1], [219]. *Domino* kodiert für zwei Proteine mit 3202 Aminosäuren (Domino A) oder 2498 Aminosäuren (Domino B). Der N-Terminus beider Isoformen enthält eine Prolin-reiche und eine saure Domäne mit etlichen Aspartaten und Glutamaten (siehe Abb. 14). Die C-Termini beider Isoformen unterscheiden sich dadurch, dass Domino A ein geteiltes Kernlokalisierungssignal sowie einen langen Glutamin-reichen Abschnitt enthält, während Domino B nur eine zusätzliche saure Domäne besitzt. Mit Ausnahme eines ca. 450 Aminosäuren langen, zweigeteilten ATPase/Helikase Motivs, konnte bisher keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen bekannten ATPase Familien gefunden werden. Als Mitglieder der *split*-ATPasen besitzen sowohl Domino A als auch Domino B die charakteristische, durch ca. 450 Aminosäuren getrennte, zweigeteilte ATPase Domäne (siehe Abb. 14).



**Abb. 14: Das *domino* Gen und seine Proteinprodukte. (A) zeigt die Exon/Intron Struktur des *domino* Gens. Durch alternatives *Splicing* werden zwei unterschiedliche Transkripte generiert: *domino A* und *domino B*. Die dunkelgrauen Kästen kennzeichnen Abschnitte der ATPase Domäne. (B) Domino A und Domino B Proteine. Die gemeinsame N-terminale Region enthält eine Prolin-reiche Domäne, eine saure Region (D/E-reich) und eine zweigeteilte DNA-abhängige ATPase Domäne der SWI2/SNF2 Familie [1].**

Domino A reichert sich im Laufe der *Drosophila* Embryonalentwicklung in den Kernen des Nervensystems an und kommt vereinzelt in Kernen der Photorezeptorzellen der Augenanlage vor. Domino B hingegen wird in den Kernen aller Zellen exprimiert und findet sich in adulten Stadien vor allem im Ovar, in Follikelzellen und in den Oozyten [1].

Die korrekte Expression homeotischer Gene wird durch die Expression von Genen der Pc- und Trx-Gruppe reguliert [220]. Mitglieder der Trx-Gruppe werden benötigt um an homeotischen Genen einen aktiven Zustand aufrecht zu erhalten. Mitglieder der Pc-Gruppe erhalten im Gegensatz dazu einen repressiven Status [221].

Im bisher einzigen Bericht über Domino aus *Drosophila* wurde gezeigt, dass Domino A mit dem hochmolekularen HAT Komplex Tip60 assoziiert ist [2]. Der *Drosophila* Tip60 Multiproteinkomplex katalysiert den Austausch von phospho-H2AvD gegen unmodifiziertes H2AvD an DSB. Diese Reaktion wird von zwei Chromatin-abhängigen

Enzymen des Tip60 Komplexes katalysiert: der Histonacetyltransferase Tip60 und der ATPase Domino A. Analysen zeigten, dass diese Proteine zuerst nukleosomales phospho-H2AvD an Lys 5 acetylieren und es anschließend durch H2AvD ersetzen. Ein sehr ähnlicher Mechanismus des Histon austausches an DSB wurde für den INO80/NuA4 Komplex in Hefe beschrieben [99], [209], [210]. Hier sei noch einmal betont, dass in *Drosophila* nur eine H2A Variante, H2AvD, vorkommt.

Tip60 ist ein Proteinkomplex, der viele wichtige Aufgaben erfüllt indem er in Prozesse wie die Regulation der Transkription, den Zell-Zyklus sowie in sogenannte *Checkpoint* Maschinerien und, wie bereits erwähnt, in die DNA Reparatur eingreift. Das funktioniert sowohl über seine Acetyltransferase Aktivität als auch über direkte Protein-Protein Interaktionen und Rekrutierung von Bindepartnern zu spezifischen Kompartimenten. Der Verlust von Tip60 führt zu einer Akkumulation von DSB, was zu einer Zunahme von verschiedenen Karzinomtypen führen kann [222], [223], [224].

Die Beteiligung von Tip60 an der Entstehung von Krebs sowie dessen Einfluss bei der Reparatur von DSB und seiner Interaktion mit myc oder EF2 (*Elongation Factor 2*) könnten einen interessanten Ansatz in der Krebstherapie darstellen [225], [226].

Die Rolle von Domino B und sein Vorkommen in Multiproteinkomplexen ist bis dato noch nicht genauer geklärt worden und war der Gegenstand dieser experimentiellen Arbeit.

## 2 Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

Die folgenden DNA Manipulationen wurden dem Standardwerk Sambrook und Russell, 2001, entnommen und je nach Applikation entsprechend modifiziert: Polymerasekettenreaktion (PCR), Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung, Medien zur Bakterienanzucht, Agarplatten, Transformation kompetenter Bakterien, Resistenzen zur Bakterienanzucht. Des Weiteren wurden für die folgenden Standardmethoden die vom Hersteller empfohlenen Protokolle verwendet: Restriktionsverdau mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen (NEB, Roche), DNA Ligation (NEB), DNA Isolierung nach PCR, sowie DNA Extraktion nach Agarose-Gelelektrophorese (Pharmacia); Isolierung von Plasmiden aus Bakterien (Qiagen), Bacmid Herstellung und Isolierung von viraler DNA zur rekombinanten Proteinexpression in Sf9 Zellen (Invitrogen).

#### **Klonierung und Proteinexpression**

Die vollständige cDNA von Domino B wurde freundlicherweise von Marie-Laure Ruhf (Friedrich Miescher Institut, Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die cDNA von Domino B wurde zuerst mit dem Restriktionsenzym Xba (Roche) in zwei Fragmente geschnitten und beide Teile mittels PCR amplifiziert. Dafür wurden die folgenden Primer verwendet: Dom-PacNot-fw: 5'-AAG CCT AGC GGC CGC AAT GAA GGT AAT TCA GCA-3', Dom-Xba-rev: 5'-AAC GTC TCT AGA TTT ATT TG-3', Dom-Xba-fw: 5'-CAA ATA AAT CTA GAG ACG TT-3', Dom-PacKpn-rev: 5'-AAA TTT GGT ACC CCT GGC TGT TCC GCT-3'. Anschließend wurde das PCR Produkt mit Hilfe des TOPO Cloning Kit (Invitrogen) kloniert. Das Domino B Fragment wurde über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Not I und Kpn I (NEB) in den Bluescript KS-Vektor (Stratagene) eingesetzt. Damit Domino B mit einer *FLAG*-Affinitätssequenz versehen werden konnte, wurde das Fragment mit Not I und Kpn I (NEB) aus dem Bluescript KS-Vektor (Stratagene) herausgeschnitten und in den Vektor pPacFlagBack (Invitrogen), der eine *FLAG*-Sequenz enthält, plaziert. Anschließend wurde nun das

Domino B-*FLAG* Fragment mittels Not I und Xba I (NEB) aus dem pPacFlagBack herausgetrennt, aufgereinigt und mit Not I/Xba I (NEB) in den pFastBacHTc-Vektor (Invitrogen) eingesetzt. Anschließend wurde Domino B-*FLAG* einerseits unter Zuhilfenahme des Fast Bac Kits (Invitrogen) für die Expression in Sf9 Zellen verwendet. Gleichzeitig konnte mit den gleichen Restriktionsenzymen (Not I/Xba I), Domino B-*FLAG* in den Vektor pMiB/V5-HisA (Invitrogen) für die Expression in SL2/KC/Sf4 Zellen eingesetzt werden. Für die Herstellung der Domino B K945R Punktmutante wurde die Mutagenese von Domino B im HTc-Plasmid über PCR durchgeführt (Invitrogen Mutagenesis Kit). Es wurden folgende Primer verwendet:

DomB-K945R-fw: 5'-GAGATGGGTCTGGGC**CGA**ACCATCCAGACCATTG-3'

DomB-K945R-rev: 5'-CAATGGTCTGGATGGT**TCG**GCCCAGACCCATCTC-3'

Nach Aufreinigung der mutierten DNA wurde der komplette Klon von Domino B Wildtyp und der Domino B K945R Mutante im HTc-Plasmid sequenziert und damit die jeweilige cDNA geprüft. Anschließend wurde mit dem Fast Bac Kit (Invitrogen) wie oben beschrieben weiter verfahren.

## 2.2 Proteinchemische Methoden

### SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde das Gelsystem der Firma Novex verwendet. Zuerst wurde ein Trenngel [2,4 ml Wasser, 2 ml Acrylamid/Bisacrylamid Lösung [30%ig; 37,5:1], 1,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 30 µl SDS 20%, 30 µl APS 20%, 2,5 µl TEMED] in eine vorgefertigte Plastikkassette eingegossen und sofort vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde anschließend ein Sammelgel [1,4 ml Wasser, 0,33 ml Acrylamid/Bisacrylamid Lösung [30%ig; 37,5:1], 0,25 ml 0,5 M Tris (pH 6,8), 10 µl SDS 20%, 10 µl APS 20%, 2 µl TEMED] hinzugefügt. Die Gelkammer wurde mit Laufpuffer [192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS] gefüllt und die Proteinproben mit SDS-Ladepuffer [200 mM Tris (pH 6,8), 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin, 4,2% β-Mercaptoethanol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau] im Verhältnis 1:1 bzw. 1:5 versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

Die Elektrophorese wurde zuerst für 15 min bei 150 V durchgeführt, anschließend wurde die Voltzahl auf 200 V erhöht.

Nach dem Gellauf wurden die Polyacrylamid Gele entweder für einen Western Blot Transfer vorbereitet oder direkt mit Coomassie Blau G 250 oder Silbernitrat angefärbt.

### **Coomassie-Färbung**

Zu färbende Gele wurden für 30-40 min in der Fixierlösung [50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure] geschüttelt und anschließend mit Färbelösung [10% (v/v) Essigsäure, 0,025 (w/v) Coomassie (G-250)] für mindestens 1 h angefärbt. Das Entfärben erfolgte durch Zugabe und mehrfachen Wechsel der Entfärbelösung [10% (v/v) Essigsäure] bis der Gelhintergrund klar wurde. Nach Erreichen des gewünschten Entfärbegrades wurde das Gel mit Hilfe des Geldokumentationssystems *Image Master VDS* (Pharmacia) fotografiert bzw. mit einem Scanner (Linotype Saphir Ultra 2, Linocolor) digitalisiert, archiviert und in einem Gelrockner auf Watman Filterpapier getrocknet.

### **Silberfärbung**

Das Gel wurde nach Auftrennung der Proteinproben über Nacht in Fixierlösung [40% Methanol, 10% Essigsäure] inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für 10 min mit Waschlösung [30% (v/v) Ethanol] gewaschen, 1 min in Thiosulfatlösung [0,02% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ] eingelegt, und anschließend für 30 min in Silbernitratlösung [0,2% (w/v)  $\text{AgNO}_3$ ] inkubiert. Anschließend wurde noch dreimal kurz mit Wasser gewaschen und das Gel in den Entwickler [3% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,05% (v/v) Formaldehyd, 0,0004% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ] gelegt. Sobald die Banden die gewünschte Intensität angenommen hatten, wurde die Stopplösung [0,5% (w/v) Glycin] auf das Gel gegeben. Dokumentation und Trocknung erfolgten wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

Für alle Waschschritte wurde reinstes, filtriertes (0,2  $\mu\text{m}$ ) Wasser verwendet. Alle Lösungen wurden frisch zubereitet.

### **Färbung für Histone**

Das Polyacrylamid Gel wurde nach Elektrophorese über Nacht in Fixierlösung [50% (v/v) Methanol] inkubiert um das Glycin zu entfernen, das mit der Färbelösung



interferieren würde. Am Tag darauf wurde die Färbelösung frisch zubereitet. 0,8 g Silbernitrat wurde in 4 ml destilliertem Wasser gelöst (Lösung A) und anschließend tröpfchenweise in 21 ml 0,36% NaOH und 1,4 ml Ammoniumhydroxid (Lösung B) unter konstantem Rühren hinzugefügt. Dann wurde mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt (Lösung C). Das Gel wurde nun für 15 min in Lösung C eingelegt und geschüttelt. Daraufhin wurde das Gel fünfmal für je 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 2,5 ml 1% Zitronensäure und 0,25 ml 38% Formaldehyd gemischt und auf 500 ml aufgefüllt (Lösung D). Das Gel wurde solange in Lösung D inkubiert bis die Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten. Dann wurde das Gel sofort in destilliertem Wasser gewaschen und für 5 min in die Stopplösung eingelegt [45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure]. Zur Lagerung wurde das Gel in 50% Methanol überführt. Dokumentation und Trocknung erfolgten wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

### **Western Blots/Immundetektion**

Proteinproben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in einem Transferpuffer [25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,02% (w/v) SDS] bei 4°C auf eine PVDF-Membran (Biosciences bzw. Millipore) übertragen. Der Transfer erfolgte in einer Western Blot Kammer entweder für zwei Stunden bei 100V oder über Nacht bei 40V. Danach wurden unspezifische Bindungen mit PBS-T [PBS, 0,1% Tween 20] und 5% fettfreies Milchpulver für mindestens eine halbe Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Der Primärantikörper wurde in PBS-T verdünnt und über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 10 min) in PBS-T wurde mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (in 2,5% Milchpulver, Verdünnung des Sekundärantikörpers antiHase und antiRatte: 1:10000; antiMaus: 1:5000). Nach erneutem fünfmaligen Waschen (jeweils 10 min) in PBS-T erfolgte die Nachweisreaktion mit dem ECL-Kit von Amersham. Schließlich wurde die Membran auf eine Glasplatte gegeben, mit Haushaltsfolie bedeckt, Luftblasen entfernt und in einer Filmkassette gegen einen Röntgenfilm (Super RX, Fuji) exponiert. Der Film wurde je nach gewünschter Expositionszeit und Stärke des Signals entwickelt.

### **Präparation von *Drosophila* Embryo Extrakten**

Für die Herstellung eines Zellkernextrakts wurden Fliegenembryonen von *Drosophila melanogaster* (Oregon R) gesammelt. Der Proteinextrakt wurde nach einem etablierten Protokoll, beschrieben bei Nightingale et al. 1999, präpariert. Die Fliegen legten ihre Embryonen auf Apfelsaft-Agarplatten, mit denen Futter in Form von Hefepaste in die Kultur gebracht wurde. Diese Platten wurden alle 12 Stunden gewechselt und die entnommenen Platten bei 4°C gelagert. Das Alter der Embryonen betrug somit zwischen 0 und 12 Stunden. Die über mehrere Tage (3-4 Tage) hinweg gesammelten Embryonen wurden von den Apfelsaft-Agarplatten mit Hilfe eines Haushaltspinsels und kaltem Leitungswasser abgewaschen, durch drei übereinander liegende Siebe mit immer kleiner werdenden Maschen gesammelt und im kleinstmaschigen Sieb gereinigt bzw. gesammelt. Die Embryonen wurden danach in einen Plastikbecher überführt und mit Embryo-Waschpuffer [0,7% (w/v) NaCl, 0,04% Triton-X 100] auf 200-400 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Zum anschließenden Dechorionieren der Embryonen wurde 60 ml Natriumhypochloritlösung (mit 6-14% aktivem Chlor) pro 200 ml Embryosuspension dazugegeben und die Mischung für 2,5 min auf einem Magnetrührer gut gerührt. Anschließend wurden die Embryonen sofort in das feinste Sieb zurück überführt und für 10 min ausgiebig mit kaltem Leitungswasser gewaschen. Um die Chorionhüllen abzutrennen, wurden die Embryonen wieder in einen Plastikbecher gegeben und in 1 l Embryo-Waschpuffer resuspendiert. Durch kräftiges Rühren wurde der Vorgang des Ablösens der Embryohüllen beschleunigt. Nachdem sich die Embryonen unten am Becherboden abgesetzt hatten, wurden die oben schwimmenden Hüllen durch Dekantieren abgetrennt und verworfen. Dieser Schritt wurde zweimal mit jeweils 1 l 0,7% NaCl-Lösung wiederholt. Die Embryonen wurden durch einen Buchnertrichter abgenutscht, einmal mit 200 ml destilliertem Wasser gewaschen und durch Vakuum auf Filterpapier getrocknet, abgewogen und sofort auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Pro Gramm getrocknete Embryonen wurden 6 ml kalter Nu-1 Puffer [15 mM HEPES-KOH, pH 7,6, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 mM EGTA (pH 8,0), 350 mM Saccharose] vorbereitet, d.h. der Puffer wurde frisch mit 1 mM DTT und 0,2 mM PMSF (*PhenylMethylSulfonyl-Fluoride*) versetzt. Die Embryonen wurden in 1 ml pro Gramm Embryo Nu-1 resuspendiert und

durch einen Yamato-Homogenisierer passiert (5 Passagen bei 1500 rpm). Die Kerne bleiben in diesem Schritt intakt. Das Homogenat wurde durch ein Miracloth-Tuch filtriert und direkt in einen vorgekühlten GSA-Zentrifugenbecher gegeben. Das Miracloth-Tuch wurde mit dem restlichen Nu-1 Puffer durchspült. Im anschließenden Zentrifugationsschritt wurden die Kerne abgetrennt. Die Zentrifugation erfolgte im GSA Rotor der Sorvall Zentrifuge für 15 min bei 8000 rpm und 4°C. Der Überstand, größtenteils aus Zytoplasma bestehend, wurde anschließend vorsichtig abgegossen, und die Seitenwände der Zentrifugenbecher mit Einmal-Papiertüchern von Lipiden befreit. Das Kernpellet wurde pro Gramm Embryo in 1 ml kalten Nu-2 Puffer [15 mM HEPES (pH 7,6), 110 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA (pH 8,0)], nach Zugabe von DTT und PMSF, resuspendiert. Dabei sollte vermieden werden, das unter dem Kernpellet liegende Dotterpellet mit zu resuspendieren. Die vollständige Resuspension erfolgte in einem Hand-Homogenisierer mit losem Kolben. Das Volumen der resuspendierten Kerne wurde in einem Messzylinder bestimmt. Die resuspendierten Kerne wurden auf vorgekühlte Ultrazentrifugenbecher aufgeteilt und mit jeweils 10% des Volumens mit 4 M Ammoniumsulfatlösung versetzt um die Kernproteine zu extrahieren. Die Suspension wurde in den Ultrazentrifugen-Bechern für 20 min auf einem Drehrad bei 4°C rotiert und dann in einer vorgekühlten Ultrazentrifuge bei 4°C für 2 Stunden bei 35000 rpm in einem Ti 60 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer 10 ml Pipette vorsichtig abgenommen, das Volumen des Überstandes gemessen und pro ml wurden 0,3 Gramm feines Ammoniumsulfatpulver über einen Zeitraum von 5 min dazugegeben und für weitere 10 min bei 4°C gerührt. Die gefällten Proteine wurden in einer vorgekühlten Sorvallzentrifuge (SS 34 Rotor) für 30 min bei 15000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Seiten der Zentrifugenröhrchen gut getrocknet und das Proteinpellet anschließend mit Hilfe eines kleinen Homogenisators in 0,2 ml pro Gramm Embryo HEMG 40 Puffer [25 mM HEPES (pH 7,6), 40 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA (pH 8,0), 10% (v/v) Glycerol] resuspendiert. Die Proteinlösung wurde zunächst dreimal 45 min gegen HEMG 40 (je 1 l) bei 4°C dialysiert und dann über Nacht gegen 3 l HEMG 100. Am nächsten Morgen wurde das noch nicht vollständig in Lösung gegangene Protein durch Zentrifugation (15000 rpm im SS34 Rotor für 10 min) abgetrennt. Der

Überstand, genannt Kernextrakt (TRAX), wurde in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **Chromatographie**

Die Materialien für die Chromatographie wurden von Amersham-Pharmacia (Q-Sepharose, Hydroxylapatit, Mono Q HR 5/5) und Biorad (Biorex 70) bezogen. Alle Dialyse- und Chromatographiestritte fanden bei 4°C statt. Der Zellkernextrakt (TRAX) wurde aus circa 200 g 0-12 Stunden alten *Drosophila* Embryonen präpariert. Für die verschiedenen Chromatographien wurden die unten aufgelisteten Puffer verwendet. Alle Puffer wurden auf 4°C vorgekühlt, mit jeweils 0,2 mM frischem PMSF, frischen Protease-Inhibitoren (Pepstatin, Leupeptin, Apoptenin) (Roche) und 1 mM Dithiothreitol (DDT) versehen, und durch einen 0,2 µm Filter filtriert.

Q-Sepharose: HEMG 200 [20 mM HEPES pH 7,6, 0,2 M KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EDTA, 10% Glycerol, 0,05% NP 40], HEMG 1000 [1M KCl]

Biorex 70: HEMG 200 [20 mM HEPES pH 7,6, 0,5 mM EDTA pH 8,0, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (v/v) Glycerol, 0,2 M KCl, 0,05% NP 40], HEMG 1000 [1M KCl]

Hydroxylapatit: 0 M KPi [10 mM HEPES pH 7,6, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 500 mM NaCl, 10 mM Glycerolphosphat], 0,5 M KPi [10 mM HEPES pH 7,6, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 500 mM NaCl, 10 mM Glycerolphosphat, 19,25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30,75 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>]

Mono Q: HEMG 50 [20 mM HEPES pH 7,6, 0,5 mM EDTA pH 8,0, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (v/v) Glycerol, 0,05 M KCl, 0,05% NP 40], HEMG 1000 [1M KCl]

Superose 6: HEMG 200 [20 mM HEPES pH 7,6, 0,5 mM EDTA pH 8,0, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (v/v) Glycerol, 0,2 M KCl, 0,05% NP 40]

### **Massenspektrometrie**

Die gereinigten Domino A/B-enthaltenden Fraktionen wurden nach SDS-PAGE für die massenspektrometrische Analyse mit kolloidalem Coomassie laut Hersteller Angaben gefärbt. Alle deutlich erkennbaren Banden wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die isolierten Banden wurden jeweils mit filtriertem 100 µl H<sub>2</sub>O in ein sauberes Eppendorf Röhrchen eingelegt und direkt an das Zentrallabor für Proteinanalytik (ZfP) am Adolf Butenandt Institut übergeben. Nach einem Trypsinverdau wurden die Proben dort mit der MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flying*) Methode analysiert. Die Proteinsequenzen wurden mit Hilfe von *Mascot Search Engine* von der Firma Matrix Science ausgewertet (<http://www.matrixscience.com/>).

### **2.3 Zellkultur**

#### **Transiente Transfektionen in kultivierten *Drosophila* Zellen (SL2/Sf4)**

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $4 \times 10^6$  SL2 bzw. Sf4 Zellen in Platten mit 6 cm Durchmesser gegeben, nach etwa 15 min (Absetzen und Anheften der Zellen) wurde das Medium (Schneider Medium; Invitrogen) abgesaugt und pro Platte 7 ml frisches Medium hinzugefügt. Die Platten wurden mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei 26°C in einem Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit dem Plasmid Domino B-FLAG in pPacFlagBack (Invitrogen) transfiziert. Dafür wurden zuerst 2,4 µg DNA und EC-Puffer (Qiagen) auf ein Volumen von 300 µl gebracht. Anschließend wurden 16 µl Enhancer (Qiagen) Lösung dazu pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde kurz auf dem Vortexgerät durchmischt, für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals kurz zentrifugiert. Daraufhin wurden 60 µl Effectene Reagent (Qiagen) hinzugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das alte Schneider Medium der vorbereiteten Zellen mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Weitere 3 ml Medium wurden in ein steriles 15 ml Falconröhrchen gegeben, mit

dem Transfektionkomplex versetzt und durch Invertieren gemischt. Dieser fertige Transfektionsansatz wurde nun auf die SL2 (oder Sf4 Zellen) gegeben. Anschließend wurden die Platten kurz geschwenkt, damit sich der Transfektionskomplex gleichmäßig auf den Zellen verteilen konnte. Die Platten wurden mittels Parafilm verschlossen und bei 26°C für zwei Tage im Brutschrank gelagert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und mit PBS (und frischen Protease-Inhibitoren) versetzt. Dann wurden die Zellen mit Proteinladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht. Die Proben wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend auf eine PVDF Membran (Millipore) transferiert und mittels anti-*FLAG* oder anti-Domino B Antikörpern analysiert.

### **Titration der Virus-DNA (Baculo-System) zur Austestung der optimalen**

#### **Virusmenge**

Eine 15 cm (Durchmesser) Platte wurde mit 12 Millionen Sf9 Zellen ausgesät und mit verschiedenen Virusmengen inkubiert. Als Virusmenge wurden, wie bei allen anderen Viren, die im Labor verwendet werden, 100-250-500-1000 µl verwendet. Parallel dazu wurde die Inkubationszeit getestet, also 1 Tag, 2, 3 und 5 Tage Inkubation zur Proteinexpression.

#### **Proteinexpression in Sf9 Zellen**

Frisch vorbereitete Sf9 Zellen wurden mit Baculoviren, die entweder Domino B-*FLAG* Wildtyp oder Domino B K945R Mutante enthielten, infiziert und für 48 Stunden bei 26°C inkubiert. Die Zellen wurden in PBS (mit frischen Protease-Inhibitoren) gewaschen, in HEMG 500 (mit frischen Protease-Inhibitoren) resuspendiert und mittels zweier Einfrier- und Auftauzyklen sowie milder Sonifikation (10 Sekunden; 4°C; Amplitude 40%) lysiert. Nach der Sonifikation wurde der Extrakt für 30 min bei 4°C in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit (13000 rpm) abzentrifugiert. Der Überstand (löslicher Teil) wurde mit 10 µl M2 anti-*FLAG beads* (Sigma) pro  $12 \times 10^6$  Zellen versehen und 2-3 Stunden bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die *beads* wurden dreimal in HEMG 500 und einmal in HEMG 200 für 10 Minuten bei 4°C gewaschen. Rekombinantes Protein wurde mittels *FLAG*-Peptid [50 ng/µl] für 3 Stunden (Elution 1) und anschließend über Nacht (Elution 2) bei 4°C eluiert. Eluiertes

Domino B Protein wurde entweder Coomassie gefärbt oder mittels Western Blots und Immundetektion analysiert.

### **Etablierung einer SL2 Zelllinie zur stabilen Expression von Domino B**

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  Zellen (SL2 und KC Zellen) mit 5 ml Schneider Medium (Invitrogen) in eine 60 mm (Durchmesser) Platte gegeben und bei 26°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 2,4 µg Domino B DNA mit DNA Kondensationspuffer und EC Puffer (Qiagen) versetzt. Das Endvolumen betrug 150 µl. Es wurden 8 µl Enhancer (Qiagen) hinzugefügt und kurz auf dem Vortexer vermischt. Dieser Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für einige Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde dem DNA Enhancer Gemisch 25 µl Effectene Transfektionsreagent (Qiagen) hinzugefügt und durch mehrmaliges Invertieren vermischt. Die Ansätze wurden für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung des Transfektionskomplexes zu gewährleisten. In der Zwischenzeit wurde das Medium vorsichtig von den SL2 Zellen entfernt und 4 ml frisches Schneider Medium hinzugefügt. In die Eppendorfgefäße mit dem Transfektionskomplex wurde 1 ml Medium gegeben und durch mehrmaliges Pipettieren gemischt. Sofort danach wurde der Transfektionskomplex langsam auf die SL2 Zellen gegeben und die Platten vorsichtig geschwenkt. Die transformierten Zellen wurden unter ihren normalen Wachstumsbedingungen in den Brutschrank gestellt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 gesplittet und mit Antibiotika versetzt (Blasticidin: 20 µg/ml). In regelmäßigen Abständen (alle 3-5 Tage) wurde mittels Western Blot die Expression von Domino B getestet.

### **Kernextrakt aus SL2 Zellen**

Die geernteten SL2 Zellen wurden bei 900 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Medium im Überstand wurde abgesaugt. Die weiteren Schritte wurden alle bei 4°C durchgeführt. Um die Zellen zu waschen, wurden sie in 5 ml Puffer A [15 mM HEPES, pH 7,6, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EGTA, 0,1 mM EDTA, 350 mM Sucrose, 1 mM DDT] und frischen Protease-Inhibitoren (PMSF; NaMBS; Leupeptin; Pepstatin A; Aprotinin) resuspendiert und für 20 min bei 8000 rpm zentrifugiert (SS34 Rotor; Sorvall). Der

Überstand wurde sehr vorsichtig abgenommen, das Zellpellet wurde in 5 ml Puffer AB [15 mM HEPES, pH 7,6, 110 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EGTA, 0,1 mM EDTA, 1 mM DDT, 0,2 mM PMSF, 1 mM NaMBS] mit frischen Protease-Inhibitoren resuspendiert und mit 1/10 Volumen (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> versetzt und 20 Sekunden vermischt. Nach dieser Inkubation wurde die Suspension sehr viskös. Die Ultrazentrifugationsröhrchen wurden anschließend im vorgekühlten Ti45 Rotor für 2 Stunden bei 35 krpm (= 100000 x g) ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, wobei die Pipettenspitze unter die oben liegende Lipidschicht gehalten wurde. Für jeden ml Überstand wurden langsam unter Rühren 0,3 g (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> hinzugegeben. Dann wurde für weitere 5 min gerührt um eine optimale Präzipitation zu bekommen. Diese Lösung wurde in einer vorgekühlten Sorvall Zentrifuge in einem kühlen SS34 Rotor bei 15 krpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Innenseiten der Zentrifugenröhrchen gut mit einem Kimwipe-Tuch getrocknet. Das Kernpellet wurde in 0,2 ml Puffer C [20% Glycerol, 25 mM HEPES, pH 7,6, 100 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EGTA, 0,1 mM EDTA, 1 mM DDT, 0,2 mM PMSF, 1 mM NaMBS] mit frischen Protease-Inhibitoren resuspendiert. Dieser Ansatz wurde für 4 Stunden gegen 2 l Puffer C dialysiert. Der Kernextrakt wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### **Chromatin Salz Dialyse - nukleosomale Arrays**

Für einen Reaktionsansatz mit 50 µl Endvolumen wurden Plasmid DNA (12xW601 in pUC18; Daniela Rhodes, Cambridge) und rekombinante Histone in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Dafür wurden 10 mM Tris, pH 7,6, 1,8 M NaCl, 0,12 µg/µl BSA, 10 µg Plasmid DNA und 33 µg Histone in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit filtriertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden in neue Eppendorfgefäße, die eine Dialysemembran enthielten, überführt. Zuerst wurden diese Reaktionsansätze in den Dialysegefäßen für eine Stunde gegen 200 ml Lösung 1 [10 mM Tris, pH 7,6, 1,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,01% NP 40, 1 mM β-Mercaptoethanol] dialysiert.

Anschließend wurde 1 l Lösung 2 [10 mM Tris, pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol] mittels einer Peristaltikpumpe tropfenweise in Lösung 1 gemischt. Die



Geschwindigkeit der Pumpe wurde so gewählt, dass die Dialyse nach etwa 13 Stunden beendet war. Am nächsten Tag wurde die Dialyse in der frischen Lösung 2 und 100 mM NaCl für 1-2 Stunden fortgesetzt. Danach wurden die fertig gestellten Polynukleosomen in neue Eppendorfgefäße überführt und bei 4°C aufbewahrt. Um die Qualität der jeweiligen Präparation zu prüfen, wurde anschließend ein MNase Verdau durchgeführt.

#### **MNase Verdau von assembliertem Chromatin**

Die Polynukleosomen wurden mit 0,2 U MNase/150 ng DNA für 30, 60 und 180 Sekunden in der Anwesenheit von 10 mM CaCl<sub>2</sub> verdaut. Die Reaktionen wurden mit der Zugabe von 0,2 Volumen von 4% SDS/100 mM EDTA gestoppt. Die MNase Verdauprodukte wurden auf einem 1,8% Agarose Gel aufgetrennt, mit Ethidiumbromidlösung gefärbt und qualitativ analysiert.

#### **ATPase Assay**

Die ATPase Aktivität von Domino und ISWI wurde nach einem modifizierten Protokoll gemessen [149]. Die ATP-Hydrolyse Rate von etwa 3 fmol ISWI oder Domino wurde in Anwesenheit von 0,1 µg Doppelstrang-DNA oder derselben Menge chromatinisierter DNA bestimmt. Standardreaktionen (15 µl) wurden in ATPase Puffer [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl 0,5 mM 2-Mercaptoethanol, 0,1 g/l BSA, 0,67 mM MgCl<sub>2</sub>] und in einem Mix aus 20 µM ATP und 35 kBq [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Amersham) durchgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden bei 26°C für 30 min inkubiert. 1 µl jeder Reaktion wurde auf eine Dünnschicht Chromatographie Zellulosemembran [Merck] pipettiert. Ungespaltene ATP und freies Phosphat wurden über die Chromatographie mit 0,5 M LiCl/1M Formaldehyd in einem Zeitraum von etwa 15 min voneinander getrennt. Die getrocknete Membran wurde für 10 min auf einem Phosphoimager Screen [Fuji] exponiert und das Verhältnis von freiem Phosphat und ATP wurde mit AIDA Software [Fuji] quantifiziert.

#### **Nukleosomen Mobilisierungs Assay**

Die Durchführung der nukleosomalen Mobilisierungsreaktionen erfolgte wie im Methodenpaper angegeben [29].

### 3 Ergebnisse

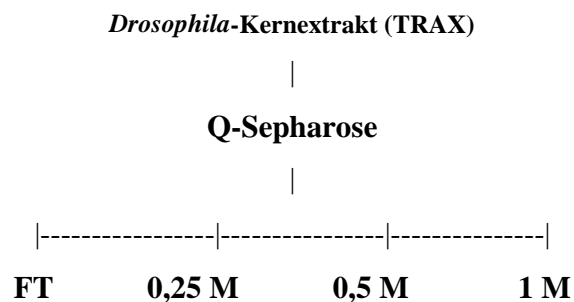
#### 3.1 Aufreinigung von Domino Proteinkomplexen

Zur konventionellen Reinigung und Isolierung von Domino Komplexen wurden Kernextrakte aus ca. 200-300 g *Drosophila* Embryonen verwendet. Für die Detektion der Domino Proteine wurden Antikörper gegen Domino A und Domino B verwendet, die uns freundlicherweise von M. L. Ruhf (Friedrich Miescher Institut, Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurden. Im Zuge der ersten Versuche zur Isolierung von Domino aus Kernextrakten stellte sich jedoch heraus, dass die uns zur Verfügung gestellten Antiseren gegen Domino B zu starken unspezifischen Hintergrundsignalen bei der Immundetektion führten. Deswegen wurden für die Anreicherung von Domino Komplexen vorwiegend zwei Antiseren gegen Domino A (ein Antiserum wurde in Hase, ein zweites Antiserum in Ratte generiert) verwendet.

##### 3.1.1 Konventionelle Chromatographie

###### Schema 1

A) Fraktionierung mittels Q-Sepharose (starker Anionenaustauscher)



Die Q-Sepharose Elution erfolgte durch eine Erhöhung der Salzkonzentrationen von 100 mM (= Laden und Waschen der Säule) auf 250-500-1000 mM KCl in HEMG Puffer. Die Westernblotanalyse zeigte eine Anreicherung von Domino A im Durchlauf (FT). Ein Signal ergab sich auch in der 500 mM Fraktion und ein schwaches Signal in der 250 mM Fraktion. Die 1 M Fraktion zeigte keine Signale (Resultat hier nicht dargestellt).

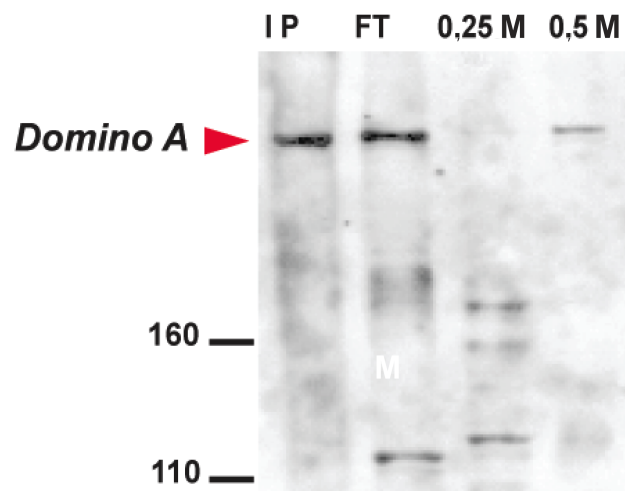
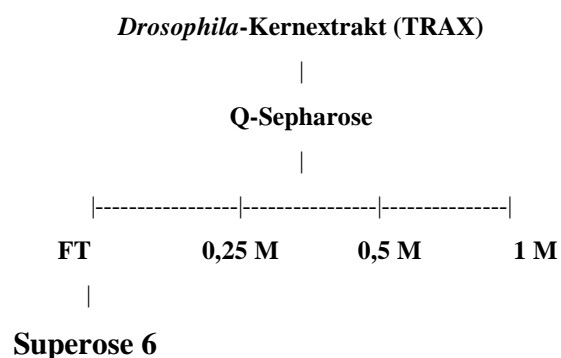


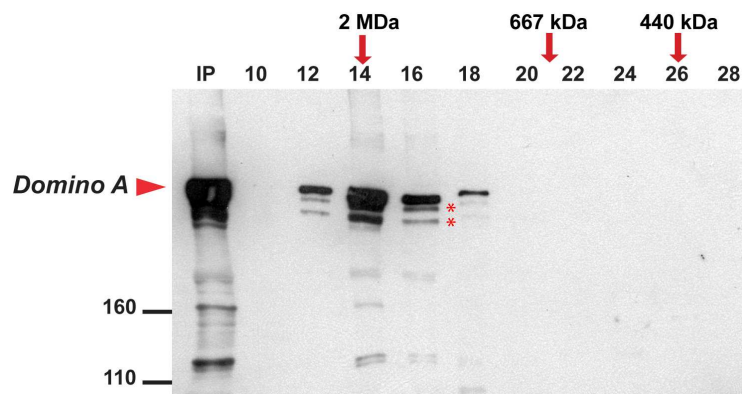
Abb. 15: Western Blotanalyse nach der schrittweisen Elution der Q-Sepharose Säule (siehe Schema 1). Die Spuren des SDS-PAGE (6%) wurden mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Proteinstandard, Auftrag (IP), Durchlauf (FT), Eluate bei stufenweise erhöhter Salzkonzentration (0,25 M-0,5 M). Die Blotmembran wurde mit dem Antikörper gegen Domino A ( $\alpha$ -Hase) inkubiert.

#### B) Gelfiltration durch Superose 6 Chromatographie

Um einen Hinweis auf das native Molekulargewicht von Domino A bzw. möglicher Domino A Komplexe zu bekommen, wurde eine Größen-Ausschluss-Chromatographie durchgeführt. Dazu wurde ein 250  $\mu$ l Aliquot der FT-Fraktion aus der Q-Sepharose auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen.



Die Eichung der Gelfiltration wurde mit Standardproteinen durchgeführt. Deren Elutionsprofil an der Superose 6 wurde ermittelt und ist dementsprechend angegeben (siehe Pfeile): Blau Dextran 2 MDa, Thyreoglobulin 660 kDa, Ferritin 440 kDa, Aldolase 220 kDa (nicht gezeigt). Das Trennverfahren einer Superose 6 Säule beruht darauf, dass unter nativen Bedingungen hochmolekulare Proteine bzw. Proteinkomplexe die Säule schneller durchlaufen als niedermolekulare.

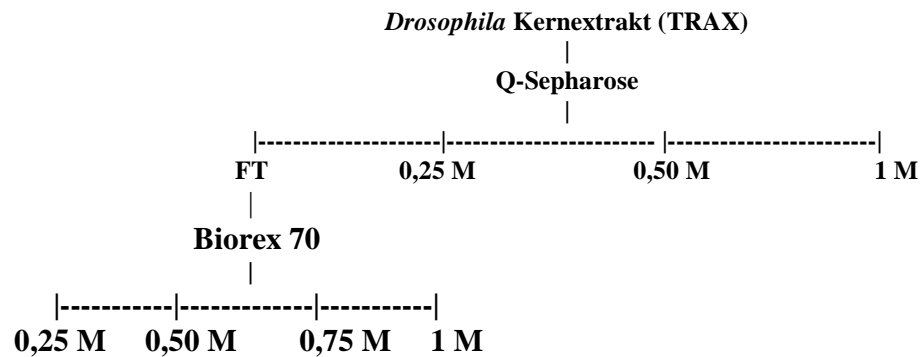


**Abb. 16: Western Blotanalyse der Fraktionen nach der Superose 6 Gelfiltration: Die Spuren des SDS-PAGE (6%) wurden mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Auftrag (IP), eluierte Fraktionen (10-28) entsprechend einem abnehmenden Molekulargewicht (siehe Pfeile). Die Blotmembran wurde mit dem Antikörper gegen Domino A inkubiert. Die mit \* gekennzeichneten Banden könnten Abbauprodukte von Domino A darstellen oder es könnte sich um eine unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers handeln.**

Das Resultat der Superose 6 demonstrierte, dass Domino A in den Fraktionen 12-16 eluierte, entsprechend einem Gewicht von etwa 2 MDa. Das kalkulierte Molekulargewicht von Domino A beträgt in etwa 300 kDa. Somit kann angenommen werden, dass Domino A in einem hochmolekularen Proteinkomplex von ca. 2 MDa vorliegt.

Eine Superose 6 Chromatographie dient ausschließlich der Molekulargewichtsbestimmung unter nativen Bedingungen. Um eine verbesserte Aufreinigung bzw. Anreicherung von Domino A zu erzielen, bedarf es zusätzlicher Chromatographiestritte. Weitere Reinigungsschemata werden nachfolgend aufgezeigt und beschrieben.

## Schema 2

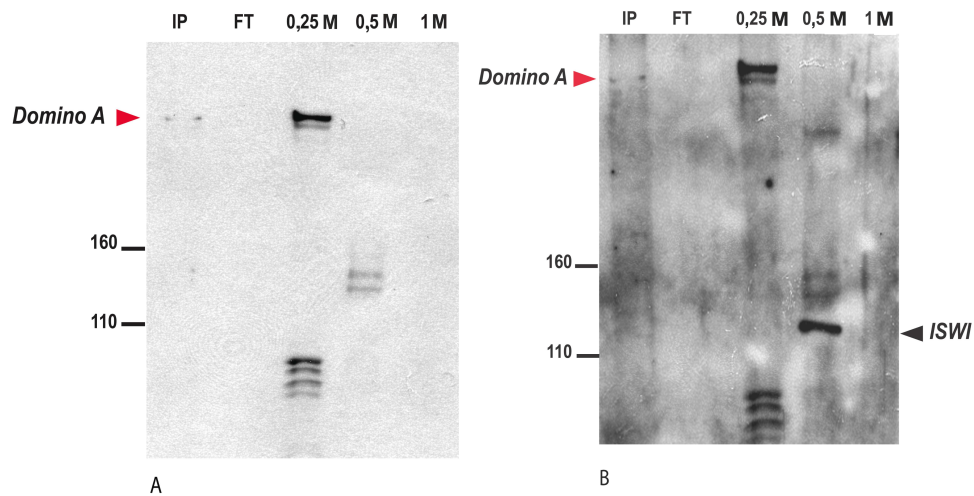


Wie bereits gezeigt (siehe Abb. 15, S. 45), eluierte eine prominente Menge Domino A im FT der Q-Sepharose.

## C) Biorex 70 (schwacher Kationenaustauscher)

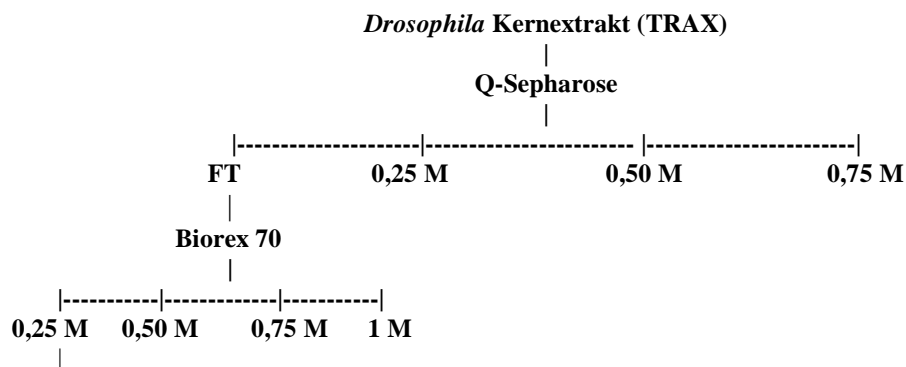
Der nicht gebundene Teil von Domino A nach der Q-Sepharose wurde gesammelt und anschließend auf die Kationenaustauschersäule Biorex 70 aufgetragen. Der gebundene Anteil der Proteine wurde mit einer stufenweisen Erhöhung der Salzkonzentration von 100 mM auf 250-500-750-1000 mM eluiert. Wie in Abb. 17 gezeigt, befand sich Domino A in der Fraktion, welche mit 250 mM KCl eluiert wurde (linkes Bild).

Um zu überprüfen, ob Domino A mit bereits bekannten ATPasen koeluiert, wurde die Western Blotmembran mit Antikörpern gegen verschiedene ATPasen nochmals beprobt. In Abbildung 17 B wird gezeigt, dass die ATPase ISWI mit Domino A nicht koeluierte. Während sich Domino A in der Fraktion 0,25 M (= 250 mM KCl) befand, eluierte ISWI in der Fraktion 0,5 M (= 500 mM KCl) (rechtes Bild). Ein Antiserum gegen Mi-2, eine weitere ATPase in *Drosophila melanogaster*, ergab kein Signal in den Biorex Fraktionen (nicht gezeigt).



**Abb. 17:** Western Blotanalyse der Fraktionen nach Biorex 70. Die Spuren des SDS-PAGE (6%) wurden mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Proteinstandard, Auftrag (IP), Durchlauf (FT), Eluate bei stufenweise erhöhter Salzkonzentration (0,25 M-1 M). Die Blotmembran wurde zuerst mit dem Antikörper gegen Domino A inkubiert (linke Spalte). Anschließend wurde die Membran mit einem Antikörper gegen ISWI inkubiert. Das stärkste Domino A Signal eluierte in der 0,25 M Fraktion, das stärkste ISWI Signal in der 0,5 M Fraktion (rechte Spalte).

#### D) Hydroxylapatit Chromatographie



#### **Hydroxylapatit**

Die 0,25 M Fraktion nach der Biorex 70 Chromatographie - in diesem Pool befand sich Domino A - wurde anschließend auf eine Hydroxylapatit Affinitätssäule geladen und mittels eines kontinuierlichen Salzgradienten (0 M bis 0,5 M Kaliumphosphat) in Puffer A [10 mM HEPES pH 7,6, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 500 mM NaCl, 10 mM Glycerolphosphat] weiter aufgereinigt. Die Analyse der eluierten Fraktionen nach

Hydroxylapatit Chromatographie zeigte, dass Domino A hauptsächlich in den Fraktionen 57-62 eluierte.

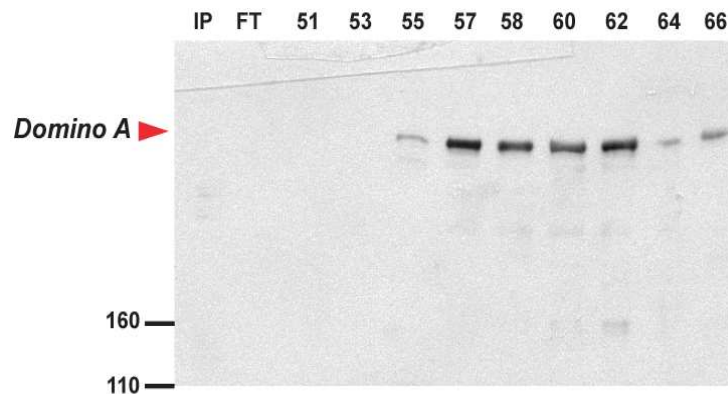
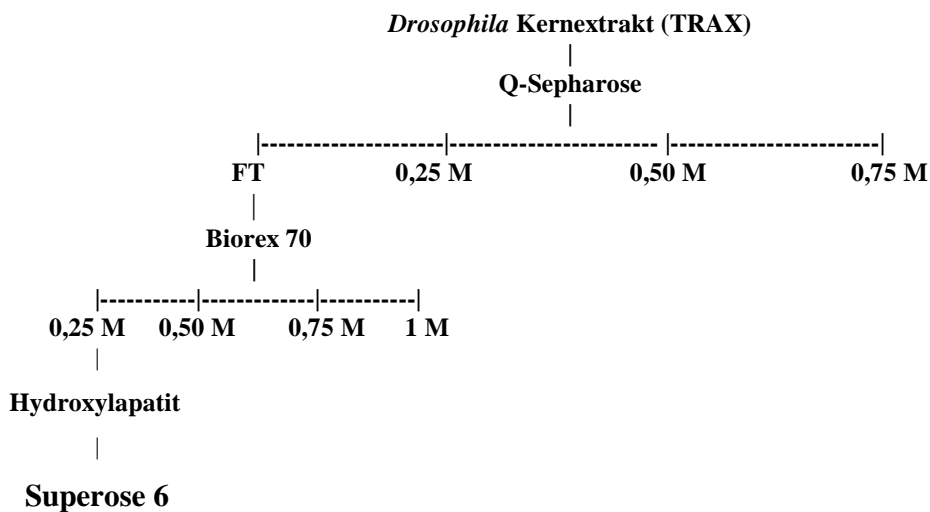


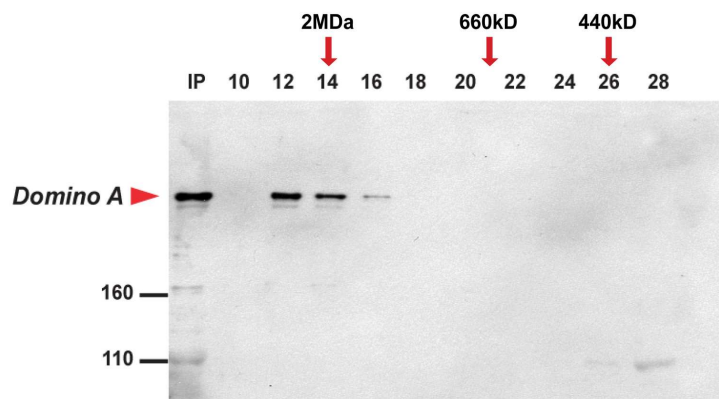
Abb. 18: Western Blotanalyse der Fraktionen nach Hydroxylapatit: Die Spuren des SDS-PAGE (6%) wurden mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Proteinstandard, Auftrag (IP), Durchlauf (FT), Eluate der Fraktionen (51-66). Die Blotmembran wurde mit dem Antikörper gegen Domino A inkubiert.

E) Superose 6 Gelfiltration



Die Domino A-enthaltenden Fraktionen 57-62 nach Hydroxylapatit Chromatographie wurden vereinigt, mittels Zentrifugation bei 7000 x g in einem Proteinkonzentrationsgefäß auf ein Endvolumen von 500 µl konzentriert und auf die

Gelfiltrationssäule Superose 6 aufgetragen. Die Gelfiltrationssäule Superose 6 von potentiell gereinigtem Domino A Komplex (siehe Schema 2) ergab wiederum ein Molekulargewicht von ca. 2 MDa. Dies entsprach dem bereits ermittelten Wert der weniger gereinigten Fraktionen direkt nach der Q-Sepharose Chromatographie (siehe Abb. 16).



**Abb. 19: Western Blotanalyse der Fraktionen nach der Superose 6 Gelfiltration: Die Spuren des SDS-PAGE (6%) wurden mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Proteinstandard, Auftrag (IP), Eluate der Fraktionen (10-28) entsprechend einem abnehmenden Molekulargewicht (siehe Pfeile). Die Blotmembran wurde mit dem Antikörper gegen Domino A inkubiert.**

Von den Fraktionen der Superose 6 Chromatographie wurde neben einem Western Blot (siehe Abb. 19) auch eine SDS-PAGE (12%ig) zur Proteinfärbung mittels Silbernitrat durchgeführt. Dazu wurden je 15 µl der angegebenen Fraktionen auf das Gel geladen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel mit Silbernitrat (siehe Material und Methoden, S. 34) gefärbt. Es ist einerseits gut ersichtlich, dass in den Domino A-positiven Fraktionen (12-16; siehe Immundetektion in Abb. 19) ca. 6-8 zusätzliche Proteinbanden sichtbar sind. Gleichzeitig konnte aber auch ein prominenter Anteil von nicht Domino A-assoziierten Proteinen separiert werden (siehe gefärbte Proteine in den Fraktionen 18-28).



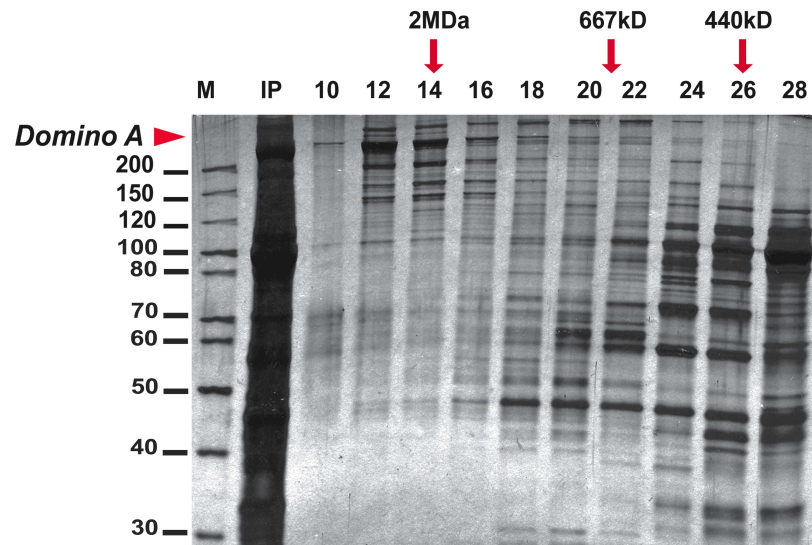
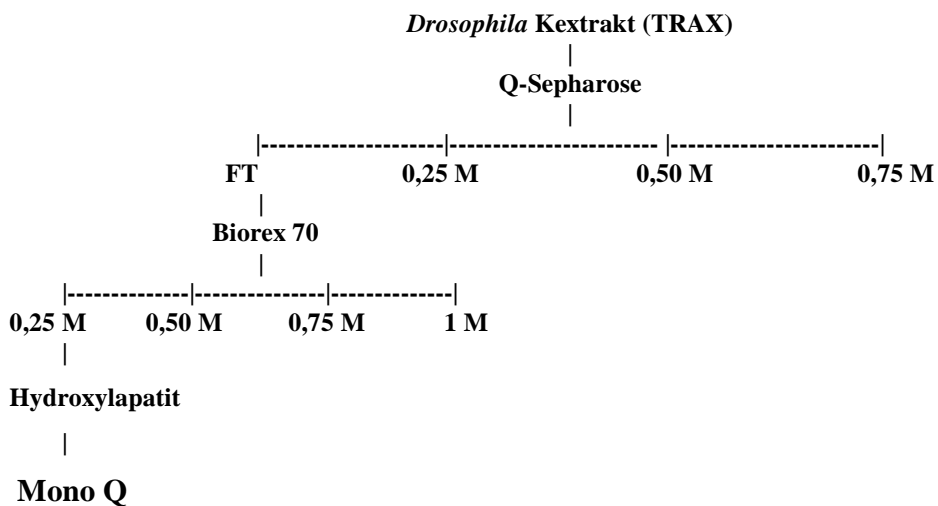


Abb. 20: Silberfärbung der Fraktionen nach Superose 6: Die Spuren des SDS-PAGE (12%) wurden mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Proteinstandard, Auftrag (IP), Eluate der Fraktionen (10-28) entsprechend einem abnehmenden Molekulargewicht. Die Pfeile zeigen die Elution von Proteinstandards an.

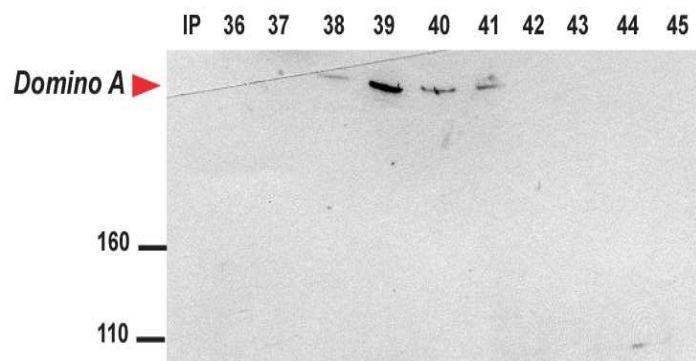
*Schema 3*

F) Mono Q FPLC (*F*ast *P*erformance *L*iquid *C*hromatographie)



Bei diesem Aufreinigungsschema wurden die ersten drei Chromatographieschritte (Q-Sepharose, Biorex 70, Hydroxylapatit) auf dieselbe Weise, wie in Reinigungsschema 2 (siehe Seite 47) beschrieben, durchgeführt.

Nach der Affinitätsreinigung über die Hydroxylapatitsäule wurden die für Domino A-positiven Fraktionen vereinigt, anschließend gegen HEMG 50 über Nacht bei 4°C dialysiert und auf eine 1 ml Mono Q FPLC Säule geladen. Der an die Säule gebundene Anteil Proteine wurde mit einem kontinuierlichen Salzgradienten von 50 mM-1 M KCL eluiert. Domino A eluierte in den Fraktionen 38-41, mit einem deutlichen Maximum in Fraktion 39, was einer KCl Konzentration von ca. 300 mM entsprach.

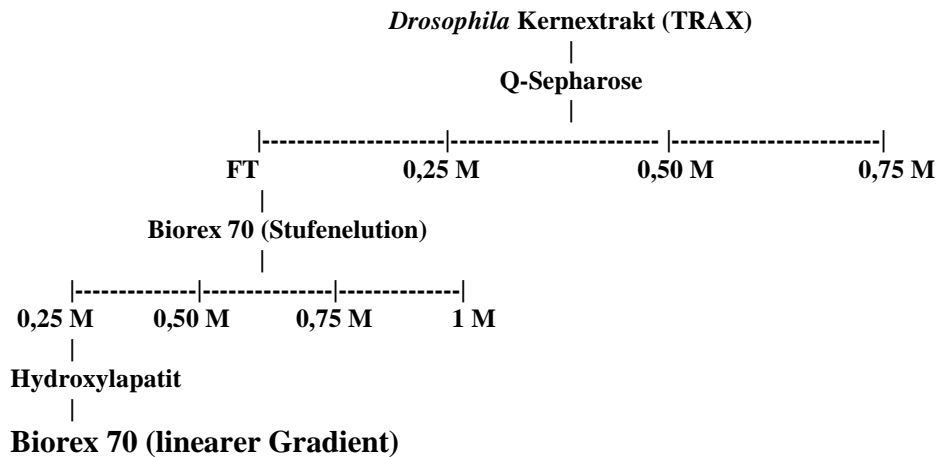


**Abb. 21: Western Blotanalyse der Fraktionen nach Mono Q: Die Spuren des SDS-PAGE (6%) wurden mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Proteinstandard, Auftrag (IP), Eluate der Fraktionen 36-45. Die Blotmembran wurde mit dem Antikörper gegen Domino A inkubiert.**

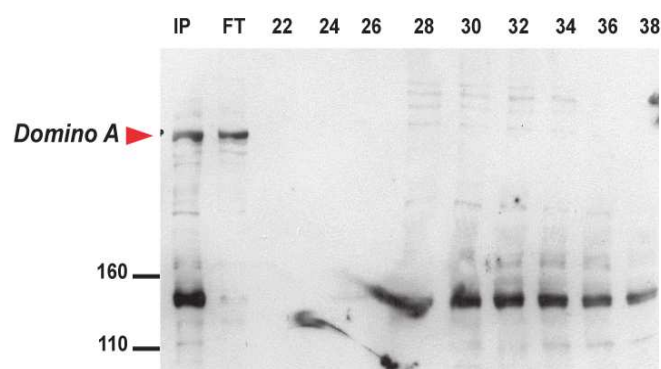
#### *Schema 4*

Bei diesem Reinigungsschema wurden die ersten drei Chromatographieschritte (Q-Sepharose, Biorex 70, Hydroxylapatit) wie in Schema 2 beschrieben, durchgeführt.

G) Biorex 70 (linearer Gradient)



Im Anschluss an die Hydroxylapatitsäule wurden die Domino A-positiv identifizierten Fraktionen vereinigt und dreimal eine Stunde bei 4°C gegen HEMG 75 dialysiert (dreimaliger Pufferwechsel). Die dialysierte Probe wurde nun auf eine Biorex 70 geladen und, im Gegensatz zur bereits beschriebenen stufenweisen Elution, nun mittels eines kontinuierlichen Salzgradienten prozessiert (von 0,075 M-1 M KCl). Das Resultat ist in Abbildung 22 gezeigt. Wie ersichtlich, befand sich Domino A im Durchlauf (FT). Dieses Ergebnis entsprach soweit nicht den Erwartungen, zumal sich Domino A bei der stufenweisen Elution an der Biorex 70 Säule vorwiegend in der 0,25 M Fraktion befand. Dieses Chromatographieschema wurde dreimalig in gleicher Weise unter gleichen Bedingungen durchgeführt und lieferte jedes Mal das gleiche Ergebnis (siehe Abb. 22).



**Abb. 22: Western Blotanalyse der Fraktionen der Biorex 70. Die Spuren des SDS-PAGE (6%) wurden mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Proteinstandard, Auftrag (IP), Durchlauf (FT), Eluate der Fraktionen 22-38. Die Blotmembran wurde mit dem Antikörper gegen Domino A inkubiert.**

Nachdem jeweils eines der beschriebenen Reinigungsschemata abgeschlossen war, wurden mit den Proben des jeweils letzten Reinigungsschrittes (Superose 6 aus Schema 1 und Schema 2, Mono Q aus Schema 3 und Biorex 70 aus Schema 4), die Domino A enthielten, ATPase Aktivitätsassays (siehe Material und Methoden, S. 43) durchgeführt. Als Substrat wurden sowohl freie DNA als auch Polynukleosomen verwendet. Es konnte jedoch in keinem der durchgeführten Assays eindeutige ATPase Aktivität der Domino A-enthaltenden Fraktionen gemessen werden.

### **3.2 Herstellung von rekombinantem Domino B in Sf9 Zellen**

Ausgehend von einer vollständigen cDNA für Domino B (zur Verfügung gestellt von M. L. Ruhf, Friedrich Miescher Institut, Basel, Schweiz) wurden Expressionsvektoren hergestellt, um Domino B in rekombinanter Form sowohl in Sf9 Zellen mit Hilfe des Baculovirus Expressionssystems, als auch in Domino B-transfizierten Zelllinien zu exprimieren (siehe Material und Methoden, S. 40-41). Dadurch wurde es möglich, Domino B sowohl als einzelnes rekombinantes Protein durch Expression und Reinigung aus Sf9 Zellen, als auch zu erwartende Domino B Komplexe durch Reinigung aus SL2 Zelllinien zu isolieren und zu charakterisieren.

Das Domino B Protein besteht aus 2786 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von ca. 280 kDa. Die Aufreinigung von Domino B in den vorher aufgeführten Zelltypen erfolgte über anti-*FLAG* Affinitätschromatographie, da der C-Terminus des Domino B Proteins mit einem *FLAG-tag* ausgestattet wurde.

Um eine optimale Proteinexpression zu erhalten, wurde zuerst sowohl eine Titration der hergestellten Domino B Virus-DNA durchgeführt, als auch die Dauer der Proteinexpression ermittelt (siehe Material und Methoden, S. 40). Abbildung 23 zeigt das Resultat einer typischen Affinitätsreinigung von rekombinantem Domino B aus Sf9 Zellen.

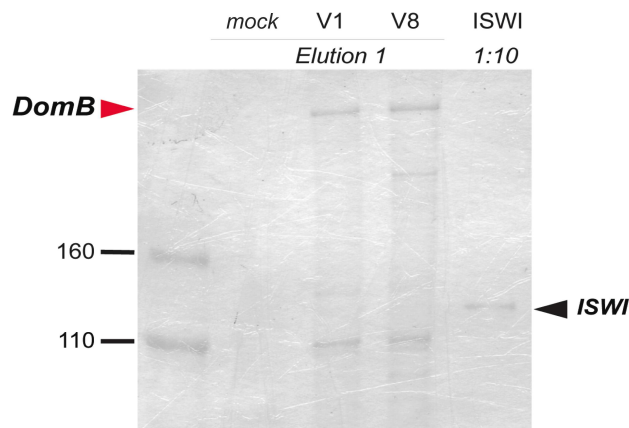


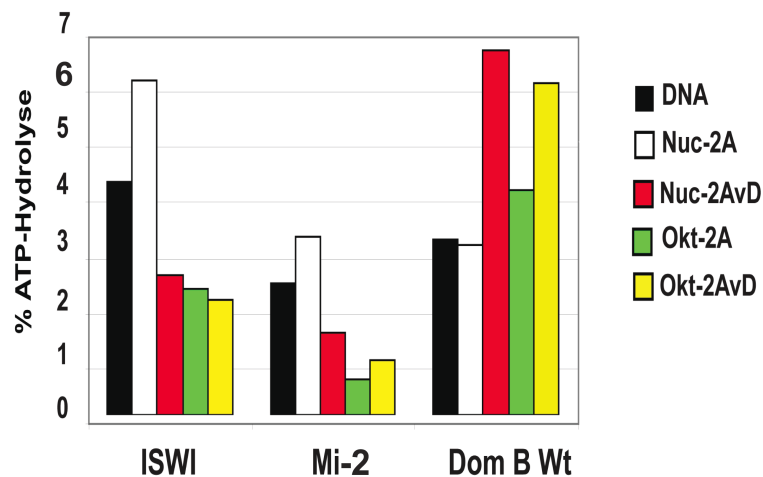
Abb. 23: Coomassie-Färbung eines SDS-6%PAGE von rekombinantem Domino B, das aus Sf9 Zellen durch *FLAG*-Affinitätsreinigung isoliert wurde. Die Bezeichnung *mock* bezieht sich auf nicht-infizierte Sf9 Zellen, die unter identischen Bedingungen aufgearbeitet wurden. Proteinstandard, *Flag* Peptid Elution von *mock* und rekombinantem Domino B (V1 und V8 entsprechen zwei verschiedenen Viren für Domino B-*FLAG*) sind dargestellt. Parallel zur Domino B Reinigung wurde auch rekombinantes ISWI gereinigt.

### 3.3 Biochemische Eigenschaften von rekombinantem Domino B

Das rekombinante Domino B Protein wurde nach der Aufreinigung (siehe Abb. 23) unter variablen Bedingungen auf dessen ATPase Aktivität untersucht. Vor Durchführung der ATPase Assays wurde jeweils der Proteingehalt der Domino B-enthaltenden Eluate bestimmt. Dabei wurden verschiedene Mengen Domino B Eluat auf ein Coomassie-Gel aufgetragen und mit entsprechenden Standardproteinkonzentrationen verglichen (nicht gezeigt). Zur Qualitätskontrolle der Polynukleosomen nach einer Chromatin Salz Dialyse (siehe Material und Methoden, S. 42-43) wurden diese mit MNase verdaut, auf ein Agarosegel aufgetragen und qualitativ analysiert (siehe Material und Methoden, S. 43).

Mit den ermittelten Proteinkonzentrationen wurden anschließend ATPase Assays bei 26°C und 50 mmol KCL durchgeführt, gleiche Konzentrationen von ISWI dienten jeweils als Kontrolle. Rekombinantes Domino B zeigte Aktivität in der Anwesenheit von freier DNA, sowie interessanter Weise eine ausgeprägte ATPase Aktivität in Gegenwart von Polynukleosomen und Histonoktameren mit der *Drosophila*-spezifischen Histonvariante H2AvD. Diese ATPase Werte von Domino B sind vergleichbar mit ISWI in Gegenwart von dessen Substrat, den H2A/H2B-enthaltenden Nukleosomenketten.

Dessen ATPase Aktivität in Gegenwart von Nukleosomen mit den Histonen H2A/H2B lag deutlich darunter. Es ist daher interessant zu beobachten, dass Domino B die stärkste ATPase Aktivität in Gegenwart der *Drosophila*-spezifische Variante H2AvD im Kontext von Polynukleosomen zeigte. Die ATPase Assays wurden immer dreimal mit demselben Domino B Eluat durchgeführt und zeigten jedes Mal annähernd dieselben Ergebnisse.

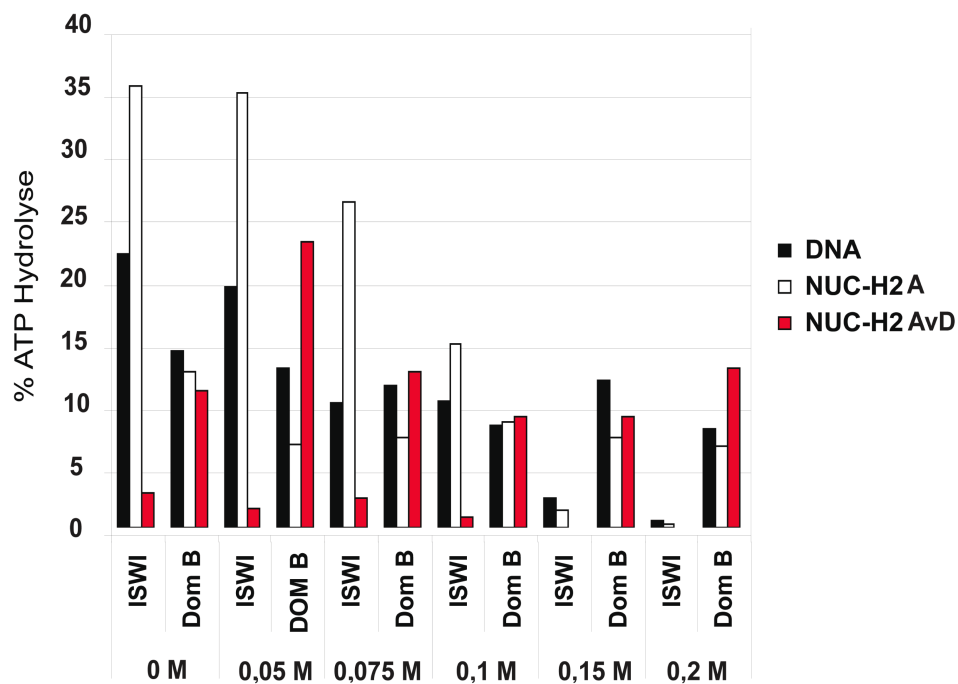


**Abb. 24:** ATPase Aktivitätsassay von rekombinantem Domino B, ISWI und Mi-2. Freie DNA, nukleosomale DNA mit Histon H2A bzw. Histonvariante H2AvD, Histonoktamere, die jeweils das Histon H2A und die Histonvariante H2AvD enthielten, wurden in einer Konzentration von 100 ng/μl im Reaktionsansatz verwendet. Nach 30 min wurde die Reaktion gestoppt. ISWI diente als Vergleichsgröße und Positivkontrolle. Alle Werte sind abzüglich der *mock* Aktivität (durchschnittlich 1,5 % ATP-Hydrolyse) aufgetragen.

Die Salzabhängigkeit von rekombinantem Domino B wurde mittels variierender KCl Konzentrationen während des ATPase Tests ermittelt. Dabei wurden Endkonzentrationen Salz von 0 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM und 200 mM KCl im Reaktionsansatz und ISWI als Referenzenzym verwendet. Die Auswertung des ATPase Assays (siehe Abb. 25) zeigte, dass Domino B in Relation zu ISWI eine geringere Sensitivität gegenüber ansteigenden KCl Konzentrationen aufwies. Die ATPase Aktivität von rekombinantem Domino B in Gegenwart von freier DNA zeigte nahezu keine Unterschiede zwischen 50 mM und 200 mM KCl, während ISWI hingegen bei 150 mM bzw. 200 mM KCl keine nennenswerte ATPase Aktivität mehr besaß. Die ATP-Hydrolyserate von Domino B in Gegenwart von Nukleosomen mit der Histonvariante H2AvD zeigte, erstens, wiederum die höchsten Werte, wobei bei 50 mM ein Maximum

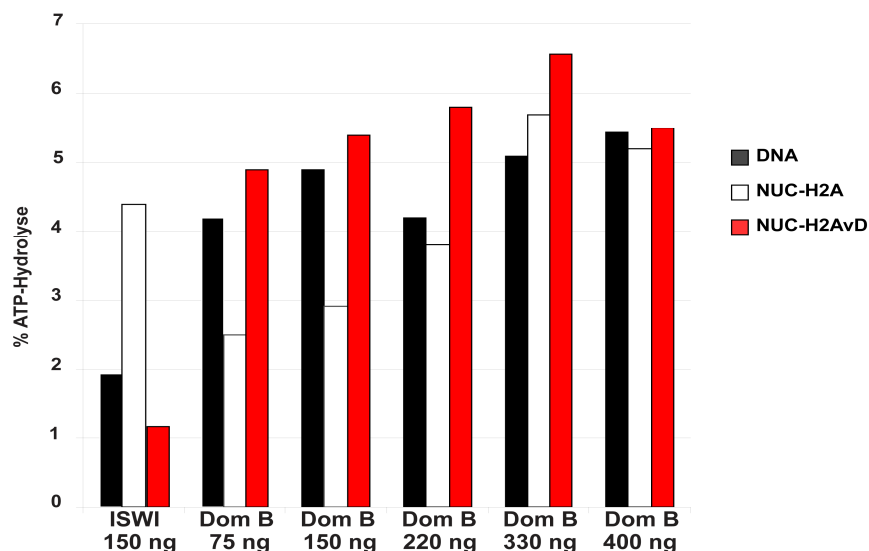
zu beobachten war. Zweitens, sank zwar die Aktivität auf ca. 50% des Maximums, blieb jedoch unverändert bei höheren Salzkonzentrationen. Domino B zeigte im Verlauf nur geringe Aktivitätsunterschiede. Wiederum waren bei 150 mM bzw. 200 mM KCl die ISWI Aktivitäten kaum detektierbar.

Bezüglich der Substratspezifität zeigten sich einige Unterschiede bei steigender Salzkonzentration. Während Domino B bei 50 mM (grenzwertig auch bei 75 mM) eine Substratspezifität für Nucleosomen mit der Histonvariante H2AvD aufwies, ließ sich diese Präferenz bei höheren Salzkonzentrationen nicht mehr nachweisen. Dieses Experiment wurde dreimal wiederholt und zeigte eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Daraus lässt sich schließen, dass die Substratspezifität von Domino B für Nucleosomen mit der Histonvariante H2AvD bei steigender Salzkonzentration abnimmt und sich ab 100 mM KCl nahezu aufhebt.



**Abb. 25:** Analyse der ATPase Aktivität von rekombinantem Domino B unter unterschiedlichen KCl Konzentrationen (von 0 M bis 0,2 M). Parallel dazu wurde die ATPase ISWI getestet. Als Substrate wurden entweder jeweils 100 ng an freier DNA und nukleosomaler DNA mit Histon H2A oder der Histonvariante H2AvD verwendet. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei einer Temperatur von 26°C.

In einer weiteren Variation des ATPase Tests wurde Domino B mit steigenden Mengen an Substraten inkubiert. Der ATPase Assay wurde mit 75 ng, 150 ng, 220 ng, 330 ng, 400 ng an freier DNA oder nukleosomaler DNA bei 26°C für 30 min durchgeführt. Die Polynukleosomen wurden zuerst qualitativ mittels MNase Verdau analysiert und anschließend zusammen mit der DNA auf ein Coomassie-Gel aufgetragen und mit bekannten Standardsubstratkonzentrationen verglichen, um eine genaue Quantifizierung der Substratmengen zu gewährleisten. Die Salzkonzentration wurde anhand der in Abbildung 25 gezeigten Ergebnisse bei 50 mM gewählt. Im anschließenden ATPase Assay wurde festgestellt, dass Domino B bereits bei einer Substratkonzentration von 75 ng bzw. 150 ng eine ausgeprägte ATP-Hydrolyseaktivität in Gegenwart von DNA oder dem H2AvD-enthaltenden nukleosomalen Substrat aufwies. Eine Erhöhung der Substratkonzentration brachte keine weitere signifikante Steigerung der ATPase Aktivität. Bemerkenswert war jedoch, dass eine Verdopplung des nukleosomalen Substrats mit dem „normalen“ Histon H2A eine Steigerung der ATPase Aktivität auf Werte erbrachte, die denen des H2AvD Nukleosoms entsprachen. Für die weiteren Analysen von Domino B im ATPase Test wurden Substratkonzentrationen von 100 ng DNA bzw. nukleosomaler DNA verwendet.



**Abb. 26:** Analyse der ATPase Aktivität von Domino B bei steigenden Substratkonzentrationen. Es wurden Substratmengen von 75, 150, 220, 330 und 400 ng/Assay ausgetestet. Als Kontrolle diente die ATPase ISWI.



Im Anschluss daran wurde die ATPase Aktivität bei unterschiedlichen Domino B Enzymmengen gemessen. Wiederum wurde das Verhalten von Domino B in Gegenwart der drei verschiedenen Substrate DNA, Nuc-H2A und Nuc-H2AvD analysiert. Bei der höchsten Enzymkonzentration von 5 fmol zeigte sich nach 60 Minuten Inkubationszeit bei 26°C die stärkste ATP-Hydrolyse.

Zusätzlich wurde bei einer Konzentration von 2 fmol das unterschiedliche Verhalten gegenüber den drei verschiedenen Substraten am deutlichsten sichtbar. Man erkennt eine signifikante Präferenz von Domino B für DNA und Polynukleosomen mit der Histonvariante H2AvD im ATPase Test.

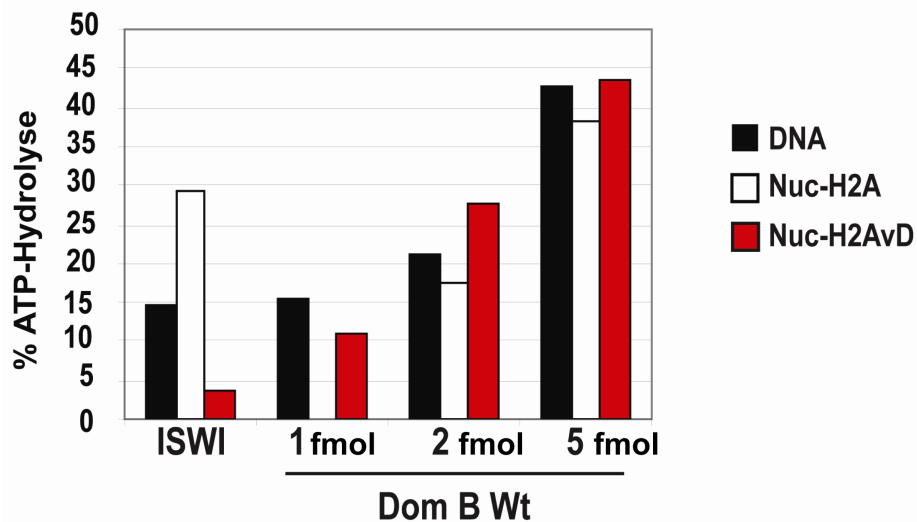
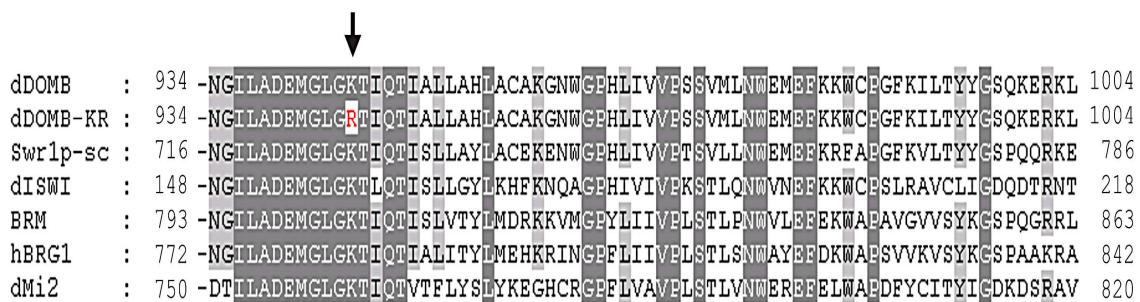


Abb. 27: Aktivitätsanalyse von Domino B bei ansteigenden Enzymkonzentrationen (1 fmol, 2 fmol, 5 fmol) in Gegenwart der drei verschiedenen Substrate DNA, Nuc-H2A und Nuc-H2AvD. ISWI wurde als Kontrolle verwendet.

### 3.4 Herstellung einer inaktiven Domino B Punktmutante

Bei der ATPase Domino B handelt es sich um eine sogenannte *split*-ATPase. Charakteristisch dafür ist die Zerteilung der ATPase Domäne. Als weiteren Schritt zur Charakterisierung von Domino B wurde eine ATPase-inaktive Mutante hergestellt. Bisher existieren noch keine rekombinanten Mutanten für Domino bzw. Vertreter der *split*-ATPase Familie. Durch eine ATPase Mutante ließ sich auch bekräftigen, dass die

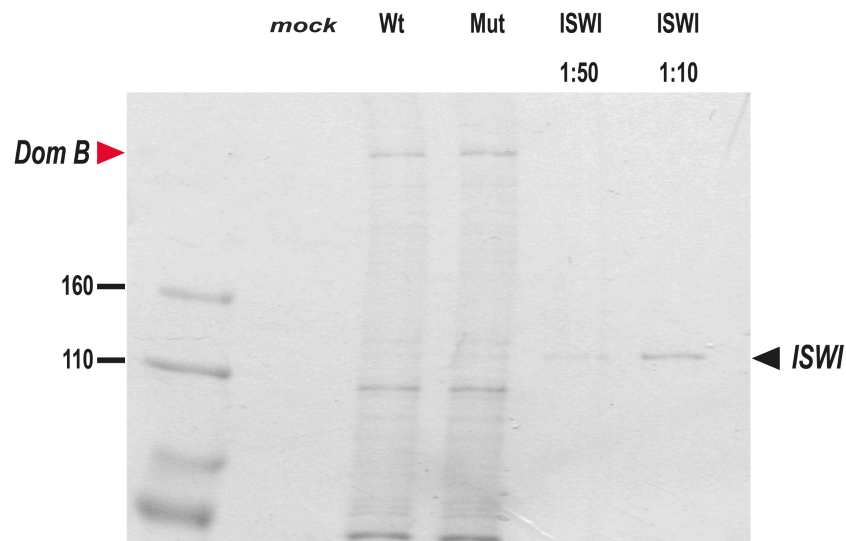
gemessenen Ergebnisse im ATPase Test sicher auf die ATPase Aktivität von rekombinantem Domino B zurückzuführen waren. Als Ausgangspunkt wurde zuerst ein Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener ATPasen erstellt, um den Ort der Mutation bestimmen zu können. Die Punktmutation wurde am Lysin 945 in Domino B gesetzt (siehe Abb. 28). Diese Stelle für eine Punktmutation entspricht dem Lysin 159 der bereits gut charakterisierten ATPase ISWI. Für ISWI resultierte die Mutation von Lysin 159 zu Arginin in einer vollständigen Inaktivierung [149]. Durch spezifisch zusammengestellte Primer wurde die Aminosäure Lysin 945 von Domino B in einer PCR-Reaktion durch Arginin ersetzt (siehe Material und Methoden Seite 32-33).



**Abb. 28:** *Alignment* verschiedener ATPasen aus unterschiedlichen Spezies. Der Pfeil kennzeichnet den Ort der Mutation. In Domino B handelt es sich um die konservierte Aminosäure Lysin an Stelle 945, die durch ein Arginin ausgetauscht wurde. Diese Mutation korrespondiert mit der Punktmutation an Lysin 159 der ATPase ISWI.

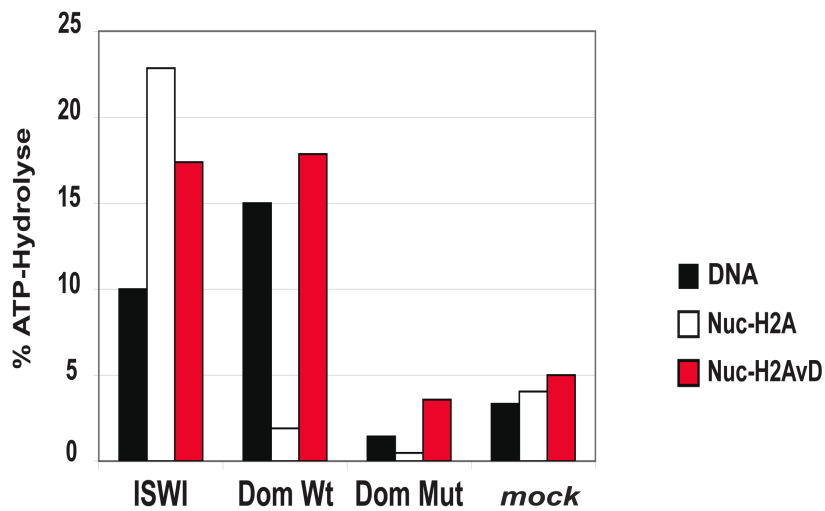
Mit Hilfe des baculoviralen Expressionssystem wurden wiederum in Sf9 Zellen Domino B Wildtyp und die K945R Mutante exprimiert und via eines C-terminalen *FLAG-tags* affinitätsgereinigt. In der Abbildung 29 ist ein 6%iges Proteingel einer typischen Reinigung von Domino B Wildtyp und der Domino K945R Punktmutante dargestellt.

Für Aktivitätsanalysen im ATPase Test wurde als Positivkontrolle rekombinantes ISWI verwendet. Um die Konzentrationen der rekombinanten Proteine vergleichen und aufeinander abstimmen zu können, wurde ISWI in zwei verschiedenen Verdünnungen ebenfalls durch eine SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abb. 29).



**Abb. 29 zeigt ein Coomassie-gefärbtes Gel mit den affinitätsgereinigten Proteinen Domino B Wildtyp und K945R Mutante. Die Spuren der SDS-PAGE sind mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Proteinstandard, FLAG-Elution von *mock*, Domino B Wildtyp (Wt), Domino K945R Mutante (Mut), ISWI in zwei verschiedenen Verdünnungen.**

Mit den in Abb. 29 gereinigten Proteinen wurde ein ATPase Assay durchgeführt. Die Salzkonzentration betrug 50 mM bei einer Temperatur von 26°C und einer Inkubationszeit von 30 Minuten. Wiederum konnte gezeigt werden, dass Domino B Wildtyp eine Substratspezifität für DNA und vor allem für Nukleosomen mit der Histonvariante H2AvD besitzt, während ISWI durch Nukleosomenketten mit dem „normalen“ Histon H2A am stärksten stimuliert wurde. Besonders hervorzuheben ist hier jedoch, dass die Domino B K945R Mutante an keinem der verwendeten Substrate detektierbare ATPase Aktivität besaß. Es ist somit gelungen, durch eine gezielte Punktmutation (Lys 945→Arg) im konservierten Abschnitt des ersten ATPase Bereichs der *split*-ATPase Domäne, das Domino B Enzym zu inaktivieren. Damit konnte auch erstmalig ein Vertreter der *split*-ATPasen, das rekombinante Domino B Protein, näher enzymatisch charakterisiert werden.



**Abb. 30: Analyse der ATPase Aktivität von rekombinantem Domino B Wildtyp und Domino B K945R Mutante im Vergleich zur ATPase ISWI. Als Substrate dienten jeweils 100 ng DNA, 100 ng Nukleosomen mit dem Histon H2A (Nuc-H2A) und 100 ng Nukleosomen mit der Histonvariante H2AvD (Nuc-H2AvD).**

In einer weiteren Variante des ATPase Tests zur enzymatischen Charakterisierung von Domino B wurde dessen Enzymaktivität während unterschiedlicher Inkubationszeiten analysiert. Das Ergebnis eines typischen ATPase Tests zur Untersuchung der Zeitkinetik ist in Abbildung 31 dargestellt. Die Substratpräferenz von Domino B vor allem für Nukleosomen mit der Histonvariante H2AvD ist auch hier wieder offensichtlich. Auffällig war jedoch, dass Domino B erst nach 15 min Inkubationszeit effizient ATP hydrolysieren konnte. Die K945R Mutante war, wie zu erwarten, immer inaktiv. Die Ergebnisse waren in zwei nachfolgenden Wiederholungsassays annähernd gleich.

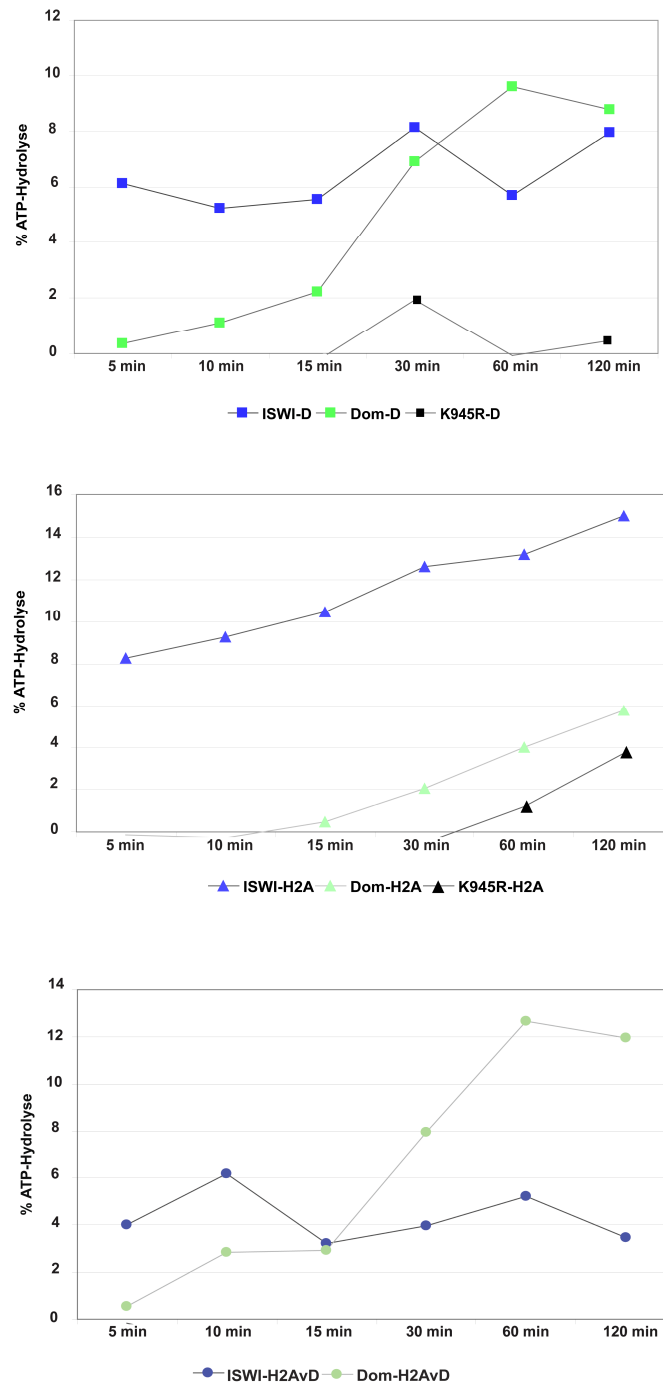


Abb. 31: Analyse der ATPase Aktivitäten von rekombinantem Domino B und der K945R Mutante nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. Der Assay wurde bei einer Salzkonzentration von 50 mM KCl und bei der Standardtemperatur von 26°C durchgeführt. Als Substrate dienten jeweils 100 ng DNA (D), 100 ng Nukleosomen mit dem Histon H2A (H2A) und 100 ng Nukleosomen mit der Histonvariante H2AvD (H2AvD). Die ATPase ISWI diente als Kontrolle.

### 3.5 Expression von Domino B Komplexen in Zellen nach transienter Transfektion

Parallel zur Herstellung von rekombinantem Domino B in Sf9 Zellen wurde auch versucht, eine stabil-exprimierende Domino B Zelllinie zu generieren. Damit sollte erreicht werden, Domino B Komplexe aufzureinigen und assoziierte Proteine zu identifizieren. In ersten Vorversuchen wurden zuerst transient-exprimierende Zelllinien in verschiedenen Zelltypen (SL2/KC/Sf4 Zelllinien) erstellt, um herauszufinden, welche Zellen für eine Expression von Domino B am besten geeignet sind. Des Weiteren wurden diese Zellen mit unterschiedlichen Plasmid Konzentrationen transfiziert, um die Menge an DNA mit der höchsten Effizienz in der Proteinausbeute bestimmen zu können. Es zeigte sich, dass die am besten geeignete Zelllinie die SL2 Zellen sind. Die transfizierte DNA Konzentration von 2,4  $\mu\text{g}$  erbrachte die höchste Proteinausbeute.

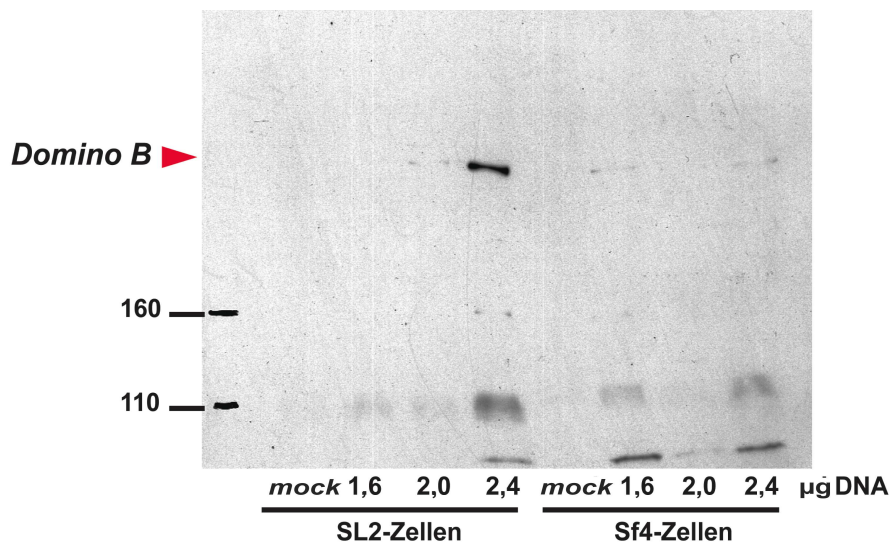


Abb. 32: Western Blotanalyse der transienten Proteinexpression von Domino B in SL2 und Sf4 Zellen. Die Membran wurde nach dem Transfer mit dem anti-FLAG Antikörper beprobt. Die angegebenen Zahlen unter jeder Spur zeigen die verwendete Menge DNA Menge [in  $\mu\text{g}$ ] pro Transfektion.

Nach diesen Transfektionsvorversuchen wurden nun SL2 Zellen sowohl mit Domino B Wildtyp, als auch mit der Domino B K945R Mutante transfiziert und versucht, eine stabil-exprimierende Domino B Zelllinie zu generieren. Es wurden verschiedene

Vektoren mit zwei unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen verwendet. Dabei handelte es sich entweder um eine Hygromycin- oder um eine Blasticidinresistenz. Als Kontrolle wurden parallel nicht-transfizierte SL2 Zellen in gleicher Weise wie die Domino B-exprimierenden Zellen behandelt. Die transfizierten Zellen wurden über einen Zeitraum von mehreren Wochen amplifiziert. Mit einer Menge von  $1 \times 10^9$  Zellen wurde ein Kernextrakt hergestellt und dieser mittels Domino B anti-*FLAG* Affinitätsreinigung weiter prozessiert. Domino B bzw. Domino B Komplexe sollten mittels Westernblot bzw. Coomassie-Färbung/Silberfärbung detektiert werden. Es ist bis dato jedoch noch nicht gelungen, größere, ausreichende Mengen an Domino B-exprimierenden SL2/KC/Sf4 Zellen zu gewinnen. Es wird deshalb in Zukunft notwendig sein, genauere Evaluierungen durchzuführen, um eine stabil-exprimierende Domino B Zelllinie zu etablieren. Diese sollte dazu dienen, Domino B Komplexe zu isolieren, exakter zu charakterisieren und assoziierte Proteine zu bestimmen.

## 4 Diskussion

Das *domino* Gen wurde in *Drosophila melanogaster* im Rahmen eines Screenings für hämatopoetische Fehlbildungen entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass *domino* für das Überleben und die Proliferation von Zellen notwendig ist. Des Weiteren spielt es bei weiblichen *Drosophila* Organismen eine Rolle bei der Oogenese. Einige Untergruppen der SWI2/SNF2 Familie, wie ISWI [227], BRM [144] und Mi-2 [228] zeigen ähnliche Aufgaben in der Regulation zellulärer Abläufe.

BRM und ISWI stellen zwei gut bekannte Mitglieder der SWI2/SNF2 Familie in *Drosophila* dar. Beide Proteine bilden Untereinheiten großer Proteinkomplexe [145], [146], [168]. *Drosophila* ISWI, zum Beispiel, kommt in drei verschiedenen nukleosomalen *Remodelling* Komplexen vor - NURF, ACF und CHRAC. In jedem dieser Komplexe interagiert ISWI mit unterschiedlichen Partnern, die jeweils für eine bestimmte Funktion des Proteinkomplexes verantwortlich sind [145], [146], [159], [229]. Domino B zeigt ATPase Aktivität in Anwesenheit von DNA und Nukleosomen mit Präferenz für die Histonvariante H2AvD. ISWI hingegen bevorzugt Nukleosomen mit dem „normalen“ H2A. Eine neuere Studie zeigte, dass Domino A als Mitglied des Tip60 HAT Komplexes phosphoryliertes und acetyliertes H2AvD an DSB austauscht und somit in Prozesse der DNA Reparatur involviert ist [2]. Die Präferenz für H2AvD lässt auch vermuten, dass Domino Proteine eine Rolle in der Bildung von Heterochromatin spielen [105]. Domino B scheint in ähnliche Prozesse an der DNA involviert zu sein, zumal sich auch hier eine Präferenz für die Histonvariante zeigt. Inwieweit Domino A und Domino B interagieren ist noch nicht geklärt und erfordert weitere Untersuchungen. Auch die Identifizierung von Domino B-assoziierten Proteinen stellt einen interessanten Aspekt für zukünftige Studien dar.



## 4.1 Fehlerdiskussion

### 4.1.1 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

Wie schon in der Einleitung aufgeführt, werden zahlreiche molekularbiologische Studien im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* durchgeführt.

Eine Vielfalt von *Remodelling* Komplexen sowie deren Funktionen konnten erstmals in diesem Organismus identifiziert werden - darunter dISWI und die damit assoziierten Komplexe dNURF, dACF und dCHRAC [159].

Im Jahre 2001 isolierten Ruhf et al. die Gene von Domino A und Domino B aus *Drosophila melanogaster* [1]. 2004 wurde der Tip60 HAT Komplex, der Domino A enthält, aufgereinigt [2].

Vorteile von *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus sind der kurze Lebenszyklus von etwa 10 Tagen und die hohe Reproduktionsrate. Das Genom dieses Modellorganismus ist komplett sequenziert (13500 Gene). Diese Eigenschaften vereinfachen Studien von genetischen Mechanismen in der Entwicklung des Organismus. Die Haltung im Labor stellt im Vergleich zu anderen Modellorganismen (z.B. Mäusen) einen kostengünstigen Aspekt dar. *Drosophila* bietet eine riesige Auswahl an Mutanten, die zur Erforschung von Genen und zum Verstehen molekularer Mechanismen beitragen. Die gewebespezifische Expression mit dem UAS-Gal-4 System ist einfach zu handhaben und RNA-Interferenz trägt zur Vielfältigkeit der Forschungsmöglichkeiten bei. Bei RNA-Interferenz oder kurz RNAi handelt es sich um einen natürlichen Mechanismus, der die Genexpression einzelner Gene hemmt.

Ein weiterer positiver Aspekt ist die Möglichkeit von *in vivo* Experimenten. Die Untersuchung von DNA Reparatur Prozessen und Histonuntersuchungen ist in *Drosophila melanogaster* gut etabliert.

Der Nobelpreis für Medizin wurde 1995 an die Forscher Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus vergeben. Sie entdeckten durch die Herstellung von etwa 20000 Mutanten die Funktion von rund 120 Genen.

Ein Nachteil von *Drosophila melanogaster* als auch von weiteren etablierten Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie, z.B. *Caenorhabditis elegans* oder *Xenopus laevis*, ist die relativ entwicklungsgeschichtliche Distanz zum Menschen. Es ist

zu bedenken, dass die identifizierten Proteine nicht immer dieselbe Funktion wie Proteine aus dem menschlichen Organismus aufweisen. Eine allgemeine Übertragung auf den Menschen ist deshalb nicht möglich.

#### **4.2 Domino A und Domino B - Mitglieder hochmolekularer Proteinkomplexe**

In der Studie von Ruhf et al. 2001 wurde postuliert, dass Domino A und Domino B, Mitglieder der SWI2/SNF2 Familie, in großen Proteinkomplexen vorkommen. Große Unterschiede zwischen kalkulierter Proteinmasse (350 kDa für Domino A bzw. 250 kDa für Domino B) und ihrem, durch Größen-Ausschluss-Chromatographie ermittelten, nativen Gewicht von 2MDa stützen diese Vermutung [1].

In dieser Arbeit sollten mittels verschiedener Chromatographieschemata Domino A und Domino B Komplexe aufgereinigt und identifiziert werden. Es war leider nicht möglich Domino B mit den vorhandenen Antikörpern zu detektieren, da diese zu starken unspezifischen Hintergrundreaktionen geführt haben.

Domino A konnte in den verschiedenen Chromatographieschemata mittels Westernblot detektiert werden. Das native Molekulargewicht von Domino A in partiell gereinigten Fraktionen als auch in mehrfach gereinigten Fraktionen betrug ca. 2 MDa (siehe Ergebnisse Chromatographie). Diese Ergebnisse sind gut vereinbar mit den Untersuchungen von Ruhf et al., und bestätigen, dass Domino A in großen Proteinkomplexen vorkommt [1]. Die Trennung von ISWI macht eine Komplexbildung von Domino A und dieser ATPase unwahrscheinlich.

Kusch et al. isolierten im Jahre 2004 den Tip60 HAT Komplex aus *Drosophila melanogaster*, der die ATPase Domino A enthält. Es konnte gezeigt werden, dass die Histonvariante H2AvD mit dem Tip60 HAT Komplex koeluiert und somit einen festen Bestandteil des Komplexes bildet [2].

In dieser Arbeit wurden verschiedene Fraktionen aus der Chromatographie mit dem H2AvD Antikörper beprobt. Auch hier zeigte sich ein positives Signal in den Domino A-enthaltenden Fraktionen (Ergebnisse nicht gezeigt). Interessanterweise fiel auf, dass Domino A auch mit Actin koeluiert. Es ist möglich, dass es sich hierbei um sogenannte

ARPs handelt. ARPs sind essentielle Bestandteile des INO80 und SWR1 Komplexes. Insbesondere Arp5 und Arp8, sind notwendig für die enzymatische Aktivität von INO80 [201]. Der SWR1 Komplex benötigt unter anderem Arp4 und Arp6 um Htz1 in Chromatin zu inkorporieren [215].

Bei der Aufreinigung des Tip60 HAT Komplexes konnten keine ARPs detektiert werden [2]. Somit scheinen diese Proteine nicht essentiell für die Funktion dieses Komplexes zu sein. Dies lässt vermuten, dass neben Tip60 Domino-enhaltende Komplexe existieren, die Actin als funktionelle Untereinheit benötigen, wie es z.B. bei INO80 und SWR1 der Fall ist [201], [215].

Weitere Untereinheiten von Domino A konnten mittels Chromatographie und Westernblot nicht identifiziert werden. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Die Proteinmenge hatte nach jeder Chromatographie abgenommen, eine Konzentration von Domino A gelang auch durch die Kombination verschiedener Chromatographieschemata nicht. Es kann angenommen werden, dass die Bindungsstärke der Domino Proteine an die Chromatographiesäulen nicht ausreichend war. Als Ursache einer Abnahme der Bindungsstärke kommen Änderungen der elektrischen Ladung, der Proteingröße sowie die Beeinflussung der Stabilität und Funktion von Proteinkomplexen durch den Aufreinigungsprozess in Frage. Eine weitere Möglichkeit des Proteinverlustes stellt die Präzipitation der Domino A Proteine aufgrund von pH- bzw. Ionenveränderungen entlang der Chromatographiesäulen dar. Auch Abspaltungen wichtiger Untereinheiten während der Aufreinigung führen zur Inaktivierung enzymatisch wirksamer Proteine [216]. Eine mögliche Proteolyse der Domino A Proteine wurde durch Zugabe von Protease-Inhibitoren verhindert. Es ist nötig weitere Chromatographieschemata zu etablieren, um Domino A Komplexe in ihrer Gesamtheit zu isolieren und folglich ihre Funktionalität untersuchen zu können.

### **4.3 Domino Proteine besitzen ATPase Aktivität**

ATP-abhängige *Remodelling* Komplexe haben wichtige Funktionen in der Erhaltung, Übertragung und Expression von Genen. Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der

SWI2/SNF2 Familie deutliche ATPase Aktivität besitzen [118]. SWI/SNF, INO80, ISWI und Mi-2 stellen die vier bekannten Klassen der *Remodelling* Komplexe dar. Jedes Mitglied dieser Gruppen zeichnet sich durch eine individuelle Komposition von Untereinheiten und eine unterschiedliche ATPase Domäne aus [111], [112], [117], [128]. Domino A und B werden ebenfalls der SWI2/SNF2 Familie zugeteilt [1]. Die zweigeteilte ATPase Domäne der Domino Proteine ist auch im INO80 Komplex in Hefe zu finden. INO80 nutzt die Hydrolyse von ATP um DSB zu reparieren [98], [204]. Kush et al. zeigten, dass die ATPase Domino A Mitglied des Tip60 HAT Komplexes ist. Tip60 nutzt ebenfalls die Energie von ATP um in Prozesse der DNA Reparatur einzugreifen. Ähnlich wie beim SWR1 Komplex kommt es zu Histon austauschreaktionen in der Nähe von DSB. Das bevorzugte Substrat von Tip60 und somit von Domino A stellt in diesem Fall die Histonvariante H2AvD dar [2].

In dieser Arbeit wurden Domino A und B auf ATPase Aktivität untersucht. In den hier durchgeführten ATPase Assays mit dem durch Chromatographie aufgereinigtem Domino A konnte keine spezifische ATPase Aktivität aus den bereits oben erwähnten Gründen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei rekombinantem Domino B reproduzierbare ATPase Aktivität (s. Ergebnisse). Domino B scheint Nukleosomen mit der Histonvariante H2AvD zu bevorzugen. Dies lässt vermuten, dass Domino B ähnliche Aufgaben wie Domino A erfüllt. Möglicherweise interagieren Domino Proteine und erfüllen ähnliche Aufgaben bei der DNA Reparatur. Aber auch die Bildung von Heterochromatin könnten Aufgaben von Domino B darstellen, zumal H2AvD als Produkt von *Pc-G* Genen an der Kondensierung von Chromatin beteiligt ist [105].

#### **4.4 Herstellung und Eigenschaften von rekombinantem Domino B**

Wie bereits oben beschrieben wurde, war es nicht möglich Domino A/B Komplexe mittels Chromatographie aufzureinigen und ihre Funktionalität zu testen. Die nicht ausreichende Bindungsstärke der Domino Proteine an die Chromatographiesäulen aufgrund Änderungen der elektrischen Ladung, der Proteingröße sowie die Beeinflussung

der Stabilität und Funktion von Proteinkomplexen stellen wie bereits oben beschrieben mögliche Ursachen dar. Bezüglich der fehlenden Detektion von weiteren Untereinheiten muss an Verluste während der Aufreinigung gedacht werden, was möglicherweise auch für die fehlende Aktivität von Domino A verantwortlich war.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit versucht, rekombinantes Domino B herzustellen. Mittels dem Baculovirus System war es gelungen aus Sf9 Zellen rekombinantes Domino B zu isolieren und funktionell zu untersuchen. In einer massenspektrometrischen Analyse wurde sicher gestellt, dass es sich bei dem 2,2 MD Protein um Domino B handelt (Ergebnisse nicht gezeigt). In Folge war es möglich mit dem rekombinanten Domino B Protein funktionelle Studien durchzuführen. Im ersten Schritt wurde das Verhalten von Domino B im Vergleich zu rekombinantem ISWI gegenüber verschiedenen Substraten getestet. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass die ATPase Aktivität von ISWI am stärksten an Nukleosomen ausgeprägt ist, die das „normale“ Histon H2A enthalten [29]. In Gegenwart von freier DNA oder Histonen, die die Histonvariante H2AvD enthalten, ist die Aktivität um mehr als die Hälfte reduziert (s. Ergebnisse). Diese Ergebnisse zeigen die hohe Substratspezifität von ISWI für das Histon H2A. Die *Drosophila*-spezifische Histonvariante H2AvD stellt das bevorzugte Substrat von Domino B dar, während ISWI hier kaum Aktivität zeigte. Die ATPase Aktivität von Domino B an Nukleosomen, die das Histon H2A enthalten war im Vergleich zu ISWI äußerst gering (s. Ergebnisse). Diese Beobachtungen sind gut vereinbar mit den Ergebnissen von Kusch et al. Hier zeigte sich, dass Domino A als Mitglied des Tip60 HAT Komplexes, ebenfalls eine Substratspezifität für H2AvD aufweist, indem es am Austausch von phosphoryliertem und acetyliertem H2AvD gegen unmodifiziertes H2AvD an DSB beteiligt ist [2]. Diese Ergebnisse stützen die These, dass *Remodelling* auf unterschiedliche Zielregionen gerichtet ist und spiegeln somit die Funktionsvielfalt der verschiedenen *Remodelling* Komplexe in *Drosophila melanogaster* wieder.

In einen weiteren Schritt wurde die Enzymkinetik von rekombinantem Domino B im Vergleich zu rekombinantem ISWI untersucht. Es zeigte sich, dass ISWI eine geringere Toleranz gegenüber steigenden Salzkonzentrationen aufweist als Domino B. Die ATPase Aktivität von Domino B ist bei einer Salzkonzentration von 0,05 M KCL am stärksten ausgeprägt. Hierbei zeigt sich auch eine hohe Substratspezifität für die Histonvariante

H2AvD. Die ATPase Aktivität von ISWI ist bei niedriger Salzkonzentration am stärksten und nimmt mit steigender KCL Menge ab, wobei bereits bei einer Salzkonzentration von 0,15 M KCL keine Aktivität mehr detektierbar ist. Domino B zeigt auch bei einer Salzkonzentration von 0,2 M KCL noch etwa die Hälfte der ATPase Aktivität wie bei 0,05 M KCL, im Verlauf nimmt jedoch die Substratspezifität für die Histonvariante H2AvD ab (s. Ergebnisse). Es ist anzunehmen, dass das Domino B Protein mit steigender Salzkonzentration denaturiert und somit die Aktivität, wie auch bei ISWI zu sehen ist, sinkt. Die Stabilität von rekombinantem Domino B ist der von rekombinantem ISWI überlegen. Es ist jedoch zu beachten, dass rekombinantes Domino B verwendet wurde. Es sind weitere Studien nötig um die Enzymkinetik von Domino B Komplexen zu untersuchen um Rückschlüsse auf die Funktionalität des Komplexes als Ganzes stellen zu können. Bezüglich der Substratspezifität kann spekuliert werden, dass eventuell die Bindungsstellen für die Histonvariante mit steigender Salzkonzentration im Rahmen der Denaturierung geschädigt werden und somit die Spezifität für H2AvD abnimmt. Es ist jedoch auch möglich, dass H2AvD hohe Salzkonzentrationen weniger stark toleriert und denaturiert. Insgesamt kann man aus diesen Experimenten ersehen, dass der Aktivitätsprozess abnimmt, je weiter der pH-Wert sinkt.

Bietet man rekombinantem Domino B steigende Substratmengen, lässt sich kaum eine Zunahme der ATPase Aktivität erkennen. Dies lässt Rückschlüsse zu, dass die Bindungsstellen bereits bei geringer Substratkonzentration besetzt sind und somit keine signifikante Aktivitätssteigerung mehr möglich ist. Möglicherweise ist daher nur ein geringer Teil des rekombinanten Proteins aktiv. Die Spezifität für die Histonvariante H2AvD nimmt bei hohen Substratkonzentrationen zugunsten der Aktivität gegenüber DNA als Substrat ab.

Anders zeigt sich eine beträchtliche Steigerung der ATPase Aktivität bei steigender Enzymmenge. Bei Verdopplung der Domino B Konzentration, lässt sich in etwa auch eine Verdopplung der ATPase Aktivität erkennen. Dies stützt die These, dass nur wenige Bindungsstellen für die Histonvariante vorhanden sind. Die ATPase Aktivität steigt folglich bei Zunahme der Enzymmenge, da wieder Bindungsstellen für H2AvD geschaffen werden. Ein erhöhtes Substratangebot hat jedoch insgesamt wenig Einfluss auf die ATPase Aktivität.

Als weiteren Versuch zur Charakterisierung von Domino B wurde ein *time course assay* zur Untersuchung der Enzymkinetik zusammen mit der Domino B K945R Mutante (s. u.) durchgeführt. Rekombinantes ISWI diente als Kontrolle. Interessanterweise zeigte sich hier, neben der bereits beschriebenen Substratspezifität für die Histonvariante H2AvD, dass die ATPase Aktivität von rekombinantem Domino B erst nach 15 Minuten linear ansteigt und nach 60 Minuten ein Maximum erreicht. Eine weitere Steigerung der ATPase Aktivität nach 120 Minuten war nicht ersichtlich. Rekombinantes ISWI hingegen zeigte in Gegenwart von Histon H2A bereits von Anfang an hohe ATPase Aktivität. Der lineare Anstieg war im Vergleich zu Domino B in Gegenwart der Substrate H2AvD und DNA viel geringer und erreichte in keinem Fall die Werte von Domino B. In Gegenwart von DNA zeigte ISWI im Verlauf annähernd gleichbleibende Aktivität, während in Gegenwart der Histonvariante H2AvD die ATPase Aktivität abnahm. Die Mutante (s. u.) war in Gegenwart der drei verschiedenen Substrate nicht aktiv.

Insgesamt lässt sich bei diesem Experiment sehr gut erkennen, dass sich rekombinantes Domino B in der Enzymkinetik stark von rekombinantem ISWI unterscheidet, obwohl beide Enzyme derselben Proteinfamilie zugeordnet werden. Dies betrifft die Substratspezifität, das Aktivitätsmuster und daher wahrscheinlich auch die spezifischen Aufgaben dieser Proteine.

#### **4.5 Eine Punktmutation an Lysin 945 in Domino B führt zum Verlust der ATPase Aktivität**

ISWI, ein sehr gut charakterisiertes Enzym in *Drosophila*, kann durch eine einzige Punktmutation von Lys 159 in ein Arginin inaktiviert werden. Diese Änderung kommt durch eine Veränderung der Bindungseigenschaften von mutiertem ISWI zustande. Die Bindung von ATP ist somit nicht mehr möglich, was in einen Funktionsausfall des Enzyms resultiert [149].

Domino B besitzt im Vergleich zu ISWI eine zweigeteilte ATPase Domäne, deren Funktion noch nicht genau geklärt werden konnte [1].

Orthologe Enzyme, wie INO80 und SWR1 in Hefe, die ebenfalls eine *split*-ATPase Domäne besitzen, wurden bis dato nur durch Deletionsstämme inaktiviert [230]. Daten über die Inaktivierung dieser Enzymkomplexe durch eine einzige Punktmutation, wie es bei ISWI der Fall ist, existieren bis dato nicht.

Die im Ergebnisteil gezeigte vollständige Inaktivierung der ATPase Aktivität in der Domino B K945R Mutante bekräftigt, dass die *split*-ATPase in Domino B durch eine einzige Punktmutation vollständig inaktiviert werden kann.

Die Inaktivierung des ISWI Proteins durch die Punktmutation von Lysin 159 korrespondiert mit der Punktmutation von Lysin 945 in Domino B (siehe Ergebnisse). Dies lässt vermuten, dass sich die ATPase Domänen der *split*-ATPase Domino B und der ATPase ISWI in ihrem Aufbau ähneln. Man kann somit postulieren, dass die ATPase Domäne stark konserviert ist und damit die Aminosäuresequenz nicht nur einen Einfluss auf die Struktur und die Faltung der ATPase Domänen hat, sondern auch das aktive Zentrum definiert.

## **4.6 Mögliche Funktionen von Domino B**

### **4.6.1 DNA Reparatur**

DSB spielen eine entscheidende Rolle für das Überleben von Zellen. Ungenaue bzw. ineffiziente Reparaturen von DSB führen zur Genominstabilität, was zum Tod der Zelle oder sogar zur Entstehung von Krebs führen kann. Um DSB reparieren zu können müssen Enzyme, die in DNA Reparaturmechanismen involviert sind, Zugang zur DNA erhalten. Einerseits existieren hierfür Enzyme, die kovalent die vier *Core* Histone modifizieren. Zum anderen lockern Chromatin *Remodelling* Komplexe unter ATP-Hydrolyse Interaktionen zwischen Histonen und der umgebenden DNA.

Die erste Histonmodifikation, die speziell mit DSB in Verbindung gebracht wurde, war die Phosphorylierung von H2AX ( $\gamma$ -H2AX). Diese ereignet sich unmittelbar nach dem Auftreten von DSB und verbreitet sich über die Chromatin Domänen, welche die beschädigten DNA Abschnitte umgeben [231]. Folglich kommt es zur Rekrutierung von DNA Reparatur Enzymen wie BRCA1 [232] und MDC1 [233], [234].



In *S. cerevisiae* kommt es in der Nähe von DSB zur Phosphorylierung von S128 im Histon H2A durch die ATM/ATR Homologen Tel1 und Mec1 [82], [235], [236]. Phosphoryliertes H2A breitet sich ebenfalls um die DSB aus und bildet das Signal für die Rekrutierung von INO80 und SWR1, wodurch die DNA Reparatur initiiert wird [98], [99], [204], [237]. SWR1 katalysiert den Austausch von H2A gegen Htz1, was Effekte auf grundlegende zelluläre Prozesse wie die Transkription oder die Bildung von Heterochromatin (s.u.) hat [99], [209], [212]. Einen direkten Einfluss auf die DNA Reparatur scheint SWR1 nicht zu haben.

In *Drosophila melanogaster* wird H2AvD an S137 infolge von DSB phosphoryliert [98], [204], [238]. Kusch et al. zeigten, dass es im Anschluss an die Phosphorylierung von H2AvD zur Rekrutierung des Tip60 Komplexes kommt, der sowohl über ATPase als auch Acetylase Aktivität verfügt. Dieser bindet phosphoryliertes H2AvD und tauscht es durch unmodifiziertes H2AvD aus. Bei der ATPase, die diesen Vorgang katalysiert handelt es sich um Domino A [2]. Diese Ergebnisse schreiben Domino A eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DSB zu.

In der vorgelegten Arbeit zeigte sich in durchgeführten ATPase Assays, dass Domino B eine Präferenz für die Histonvariante H2AvD besitzt. Diese Daten postulieren eine wichtige Rolle von Domino B bei DNA Reparaturprozessen. Es kann spekuliert werden, dass die Aufgaben von Domino B-enthaltenden *Remodelling* Komplexen dem Tip60 HAT Komplex ähnlich sind. Durch die hohe ATPase Aktivität in Gegenwart der Histonvariante H2AvD (und damit laut Kusch et al. an DSB) wird Energie freigesetzt, welche bei Histonaustauschreaktionen im Rahmen von Reparaturprozessen benötigt wird. Damit könnte Domino B einerseits als Energieträger bei der Reparatur beschädigter DNA Abschnitte eine wichtige Rolle spielen. Andererseits könnte für eine effiziente DNA Reparatur auch die Kooperation von Domino B-enthaltenden Enzymkomplexen mit dem Tip60 HAT Komplex notwendig sein.

Die Ähnlichkeit zu SWR1 in Hefe lässt weitere Vermutungen über die Funktion von Domino B zu. Durch Histonaustauschreaktionen bzw. die Inkorporation von Histonvarianten an Promotoren kann es zur Repression der Transkription kommen, um z.B. das Ablesen von beschädigten DNA Abschnitten zu verhindern. Die Bildung von

transkriptions-inaktiven Bereichen in der Nähe von DSB ist Voraussetzung für eine effiziente DNA Reparatur, die z.B. durch den Tip60 Komplex initiiert wird.

#### 4.6.2 Bildung von Heterochromatin

Chromatin ist eine sehr dynamische Struktur, die eine wichtige Rolle bei der DNA Replikation, Transkription und DNA Reparatur spielt. ATP-abhängige Chromatin *Remodelling* Komplexe können durch Verschieben von Histonen entlang der DNA die Kompaktheit des Chromatins beeinflussen. Des Weiteren tragen kovalente Modifikationen der Histon *Tails* zur Veränderung der Chromatinstruktur bei.

Untersuchungen des Tip60 Komplexes in *Drosophila melanogaster* zeigten, dass die Untereinheit Reptin, die auch in anderen Chromatin *Remodelling* Komplexen enthalten ist, für die Stilllegung von Chromatin verantwortlich ist. Domino A als Mitglied ähnelt p400 und SRCAP in Säugetieren und Swr1 in Hefe [239]. Es konnte gezeigt werden, dass der SWR1 Komplex die Histonvariante H2A.Z (Htz1 in Hefe) gegen H2A-enhaltende Nukleosomen austauscht [99], [209], [212]. In Hefe wurde gezeigt, dass Htz1 an der Bildung von Heterochromatin beteiligt ist [240], [241]. Der Austausch von Histonvarianten scheint eine konservierte Eigenschaft in der Regulation von Chromatin zu sein, zumal in einer Arbeit von Swaminathan et al. gezeigt wurde, dass sich *Drosophila* H2Av genetisch wie ein *Pc-G* Gen verhält und PEV unterdrückt. Dies führt zur Bildung von Heterochromatin und der Stilllegung von Genen [105]. Domino A tauscht acetyliertes und phosphoryliertes H2AvD gegen unmodifiziertes H2AvD an DSB aus [2]. Es kann angenommen werden, dass der durch Tip60 induzierte Austausch von Histonvarianten zu einer Repression der Transkription führt und somit eine wesentliche Rolle in der epigenetischen Stilllegung von Genen spielen könnte [242].

In dieser vorgelegten Arbeit zeigte sich die bereits beschriebene erhöhte ATPase Aktivität von Domino B in Anwesenheit der Histonvariante H2AvD (siehe Ergebnisse S. 53). Zum anderen wurde in einer *FLAG*-Affinitätsreinigung nachgewiesen, dass die Histonvariante H2AvD mit Domino B koeluiert (Daten nicht gezeigt). Entsprechend gängiger molekularbiologischer Sichtweisen ist damit von einer Bindung der

Histonvariante H2AvD an Domino B auszugehen. Diese Ergebnisse verdeutlichen den engen Zusammenhang zwischen der Histonvariante H2AvD und den Domino Proteinen. Ähnlich wie SWR1 könnte Domino B an der Bildung von Heterochromatin beteiligt sein. Dafür spricht die Präferenz für die Histonvariante H2AvD, die wie bereits beschrieben wesentlich an der Bildung von Heterochromatin beteiligt ist. Domino B könnte zur Repression der Transkription beitragen, indem es durch Histonaustauschreaktionen die Chromatinstruktur verändert und dadurch die Kompaktheit von Chromatin erhöht. Nimmt man an, dass Domino A und somit der Tip60 Komplex mit Domino B Komplexen kooperiert, ist folgende Hypothese möglich: Domino B Komplexe führen in der Umgebung von DSB zur Stilllegung von Genen und verhindern somit das Ablesen eines beschädigten DNA Abschnitts. Zeitgleich katalysiert Domino A als Mitglied des Tip60 Komplexes den Austausch von modifiziertem H2AvD gegen unmodifiziertes H2AvD und initiiert somit DNA Reparaturprozesse, indem beschädigte DNA Abschnitte gekennzeichnet werden. Die Komplexität dieser Abläufe ist jedoch noch lange nicht geklärt und erfordert weitere Untersuchungen um die genaue Funktion der Domino Proteine zu klären.

#### 4.7 Mögliche Interaktionspartner von Domino B

Einen Hinweis auf mögliche Interaktionspartner für die *split*-ATPase Domino B geben Analysen der homologen *Remodelling* Komplexe aus Hefe: SWR1 und INO80. Beide Komplexe interagieren mit sogenannten ARPs. In INO80 sind ARPs unentbehrlich für die ATPase Aktivität und nukleosomales *Remodelling*. Zusätzlich wird ihnen eine Rolle bei der Koordination verschiedener ATPase Aktivitäten zugeschrieben. In Experimenten wurde eine hohe Bindungsaffinität von Arp4 zu phosphoryliertem H2A beobachtet [216]. In dieser Arbeit zeigte sich, dass in den Domino A-enthaltenden Fraktionen der Chromatographie auch Actin zu detektieren war. Ob es sich hierbei spezifisch um ARPs handelte, wurde nicht untersucht. Es gelang nicht, weitere spezifische Interaktionspartner zu identifizieren. Mögliche Ursache dafür ist die bereits oben dargestellte Problematik der wiederholten aufwendigen Aufreinigungsprozesse, wodurch es möglicherweise zum Verlust von Interaktionspartnern mit schwacher Bindung zum Komplex kommt. Die

Identifizierung dieser und weiterer Proteine könnte einen Aufschluss über die Regulationsmechanismen von Domino A und Domino B geben und zusätzlich Aussagen über den Mechanismus des H2AvD Austauschs in Chromatin zulassen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Ruhf, M.L., et al., *The domino gene of Drosophila encodes novel members of the SWI2/SNF2 family of DNA-dependent ATPases, which contribute to the silencing of homeotic genes.* Development, 2001. **128**(8): p. 1429-41.
2. Kusch, T., et al., *Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions.* Science, 2004. **306**(5704): p. 2084-7.
3. Dokumov, S.I., *[A Simple And Reliable Procedure For Staining Nuclear Sex Chromatin.]* Lab Delo, 1963. **39**: p. 38-40.
4. Lyon, M.F., *Symposium No. 6: Gene and chromosome inactivation. Introduction by the Chairman.* Genetics, 1974. **78**(1): p. 305-9.
5. Passarge, E., *Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago.* Am J Hum Genet, 1979. **31**(2): p. 106-15.
6. Sandritter, W., *[Functional structures of the cell nucleus. Euchromatin and heterochromatin]*. Med Welt, 1970. **1**: p. 1-10.
7. Back, F., *The variable condition of euchromatin and heterochromatin.* Int Rev Cytol, 1976. **45**: p. 25-64.
8. Adcock, I.M. and K.Y. Lee, *Abnormal histone acetylase and deacetylase expression and function in lung inflammation.* Inflamm Res, 2006. **55**(8): p. 311-21.
9. van Holde, K.E., *Chromatin.* 1988, New York: Spring Verlag.
10. Wolffe, A.P., *Chromatin Structure and Function.* 1998, London: Academic Press.
11. Thatcher, T.H. and M.A. Gorovsky, *Phylogenetic analysis of the Core histones H2A, H2B, H3, and H4.* Nucleic Acids Res, 1994. **22**(2): p. 174-9.
12. Lodish, H., et al., *Molecular cell biology.* fourth edition ed. 2000: Freeman.
13. Woodcock, C.L., *Chromatin architecture.* Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(2): p. 213-20.
14. Robinson, P.J. and D. Rhodes, *Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the Linker histone.* Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(3): p. 336-43.

15. Bharath, M.M., N.R. Chandra, and M.R. Rao, *Molecular modeling of the chromatosome particle*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(14): p. 4264-74.
16. Thoma, F., T. Koller, and A. Klug, *Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin*. J Cell Biol, 1979. **83**(2 Pt 1): p. 403-27.
17. Kasinsky, H.E., et al., *Origin of H1 Linker histones*. Faseb J, 2001. **15**(1): p. 34-42.
18. Hayes, J.J. and J.C. Hansen, *Nucleosomes and the chromatin fiber*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(2): p. 124-9.
19. Felsenfeld, G. and M. Groudine, *Controlling the double helix*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 448-53.
20. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome Core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
21. Luger, K., *Dynamic nucleosomes*. Chromosome Res, 2006. **14**(1): p. 5-16.
22. Spada, F., M. Chioda, and E.M. Thompson, *Histone H4 post-translational modifications in chordate mitotic and endoreduplicative cell cycles*. J Cell Biochem, 2005. **95**(5): p. 885-901.
23. Khorasanizadeh, S., *The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation*. Cell, 2004. **116**(2): p. 259-72.
24. Turner, B.M., *Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(2): p. 110-2.
25. Henikoff, S., *Histone modifications: combinatorial complexity or cumulative simplicity?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(15): p. 5308-9.
26. Sullivan, B.A. and G.H. Karpen, *Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(11): p. 1076-83.
27. Ragab, A., E.C. Thompson, and A.A. Travers, *HMGD and HMGZ interact genetically with the Brahma chromatin Remodelling complex in Drosophila*. Genetics, 2005.

28. Dejardin, J. and G. Cavalli, *Epigenetic inheritance of chromatin states mediated by Polycomb and trithorax group proteins in Drosophila*. Prog Mol Subcell Biol, 2005. **38**: p. 31-63.
29. Eberharter, A. and P.B. Becker, *ATP-dependent nucleosome Remodelling: factors and functions*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 17): p. 3707-11.
30. Kamakaka, R.T. and S. Biggins, *Histone variants: deviants?* Genes Dev, 2005. **19**(3): p. 295-310.
31. Henikoff, S., T. Furuyama, and K. Ahmad, *Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance*. Trends Genet, 2004. **20**(7): p. 320-6.
32. Turner, B.M., *Histone acetylation and an epigenetic code*. Bioessays, 2000. **22**(9): p. 836-45.
33. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
34. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
35. Eberharter, A., R. Ferreira, and P. Becker, *Dynamic chromatin: concerted nucleosome Remodelling and acetylation*. Biol Chem, 2005. **386**(8): p. 745-51.
36. Santos-Rosa, H. and C. Caldas, *Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2381-402.
37. Cosgrove, M.S. and C. Wolberger, *How does the histone code work?* Biochem Cell Biol, 2005. **83**(4): p. 468-76.
38. Turner, B.M., *Defining an epigenetic code*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(1): p. 2-6.
39. Loizou, J.I., et al., *Epigenetic information in chromatin: the code of entry for DNA repair*. Cell Cycle, 2006. **5**(7): p. 696-701.
40. Nightingale, K.P., L.P. O'Neill, and B.M. Turner, *Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(2): p. 125-36.
41. Klose, R.J. and Y. Zhang, *Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(4): p. 307-18.

42. Kawamoto, K., et al., *Epigenetic modifications of RASSF1A gene through chromatin Remodelling in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(9): p. 2541-8.
43. Robinson-Rechavi, M., H. Escriva Garcia, and V. Laudet, *The nuclear receptor superfamily*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 4): p. 585-6.
44. Leader, J.E., et al., *Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors*. Biochem Pharmacol, 2006.
45. Carrozza, M.J., et al., *The diverse functions of histone acetyltransferase complexes*. Trends Genet, 2003. **19**(6): p. 321-9.
46. Kimura, A., K. Matsubara, and M. Horikoshi, *A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes*. J Biochem (Tokyo), 2005. **138**(6): p. 647-62.
47. Carre, C., et al., *The histone H3 acetylase dGcn5 is a key player in Drosophila melanogaster metamorphosis*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(18): p. 8228-38.
48. Sterner, D.E. and S.L. Berger, *Acetylation of histones and transcription-related factors*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(2): p. 435-59.
49. Utley, R.T. and J. Cote, *The MYST family of histone acetyltransferases*. Curr Top Microbiol Immunol, 2003. **274**: p. 203-36.
50. Jacobson, R.H., et al., *Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module*. Science, 2000. **288**(5470): p. 1422-5.
51. Kasten, M., et al., *Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14*. Embo J, 2004. **23**(6): p. 1348-59.
52. Jacobs, S.A. and S. Khorasanizadeh, *Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail*. Science, 2002. **295**(5562): p. 2080-3.
53. Yang, X.J., *The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): p. 959-76.
54. Yu, Q., et al., *Mechanism of the long range anti-silencing function of targeted histone acetyltransferases in yeast*. J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 3980-8.
55. Yan, C. and D.D. Boyd, *Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(17): p. 6357-71.



56. Lee, K.K. and J.L. Workman, *Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(4): p. 284-95.
57. Cho, Y., et al., *Individual histone deacetylases in Drosophila modulate transcription of distinct genes*. Genomics, 2005. **86**(5): p. 606-17.
58. Martin, C. and Y. Zhang, *The diverse functions of histone lysine methylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(11): p. 838-49.
59. Yang, X.J. and E. Seto, *Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(2): p. 143-53.
60. Minucci, S. and P.G. Pelicci, *Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 38-51.
61. La Thangue, N.B., *Histone deacetylase inhibitors and cancer therapy*. J Chemother, 2004. **16 Suppl 4**: p. 64-7.
62. Yu, M.C., et al., *The role of protein arginine methylation in the formation of silent chromatin*. Genes Dev, 2006. **20**(23): p. 3249-54.
63. Zhang, Y. and D. Reinberg, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the Core histone Tails*. Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2343-60.
64. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1039-43.
65. Ng, H.H., et al., *Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 709-19.
66. Xiao, T., et al., *Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast*. Genes Dev, 2003. **17**(5): p. 654-63.
67. Krogan, N.J., et al., *Methylation of histone H3 by Set2 in Saccharomyces cerevisiae is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(12): p. 4207-18.
68. Klose, R.J., E.M. Kallin, and Y. Zhang, *JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(9): p. 715-27.

69. Shi, Y. and J.R. Whetstine, *Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases*. Mol Cell, 2007. **25**(1): p. 1-14.
70. Jensen, L.R., et al., *Mutations in the JARID1C gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin Remodelling, cause X-linked mental retardation*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(2): p. 227-36.
71. Luo, Y., et al., *Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization*. Biochemistry, 2006. **45**(39): p. 11727-36.
72. Stone, E.M., et al., *Inactivation of two diverse enzymes in the amidinotransferase superfamily by 2-chloroacetamide: dimethylargininase and peptidylarginine deiminase*. Biochemistry, 2005. **44**(42): p. 13744-52.
73. Lee, M.G., et al., *Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications*. Chem Biol, 2006. **13**(6): p. 563-7.
74. Culhane, J.C., et al., *A mechanism-based inactivator for histone demethylase LSD1*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(14): p. 4536-7.
75. Mishra, S., et al., *Phosphorylation of histones by tissue transglutaminase*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5532-8.
76. Nowak, S.J. and V.G. Corces, *Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation*. Trends Genet, 2004. **20**(4): p. 214-20.
77. Dunn, K.L. and J.R. Davie, *Stimulation of the Ras-MAPK pathway leads to independent phosphorylation of histone H3 on serine 10 and 28*. Oncogene, 2005. **24**(21): p. 3492-502.
78. Lim, J.H., et al., *Chromosomal protein HMGNI enhances the acetylation of lysine 14 in histone H3*. Embo J, 2005. **24**(17): p. 3038-48.
79. Millar, C.B., et al., *Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast*. Genes Dev, 2006. **20**(6): p. 711-22.
80. Goto, H., et al., *Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25543-9.

81. Sun, J.M., et al., *Phosphorylated serine 28 of histone H3 is associated with destabilized nucleosomes in transcribed chromatin*. Nucleic Acids Res, 2007.
82. Unal, E., et al., *DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain*. Mol Cell, 2004. **16**(6): p. 991-1002.
83. Bhattacharjee, R.N. and T.K. Archer, *Transcriptional silencing of the mouse mammary tumor virus promoter through chromatin Remodelling is concomitant with histone H1 phosphorylation and histone H3 hyperphosphorylation at M phase*. Virology, 2006. **346**(1): p. 1-6.
84. Jin, J., et al., *In and out: histone variant exchange in chromatin*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(12): p. 680-7.
85. Malik, H.S. and S. Henikoff, *Phylogenomics of the nucleosome*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(11): p. 882-91.
86. Suto, R.K., et al., *Crystal structure of a nucleosome Core particle containing the variant histone H2A.Z*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(12): p. 1121-4.
87. Parseghian, M.H. and B.A. Hamkalo, *A compendium of the histone H1 family of somatic subtypes: an elusive cast of characters and their characteristics*. Biochem Cell Biol, 2001. **79**(3): p. 289-304.
88. De, S., et al., *Histone H1 variants differentially inhibit DNA replication through an affinity for chromatin mediated by their carboxyl-terminal domains*. Gene, 2002. **292**(1-2): p. 173-81.
89. Ramakrishnan, V., *Histone H1 and chromatin higher-order structure*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1997. **7**(3): p. 215-30.
90. Jackson, J.D. and M.A. Gorovsky, *Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(19): p. 3811-6.
91. Pehrson, J.R. and R.N. Fuji, *Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(12): p. 2837-42.
92. Chadwick, B.P. and H.F. Willard, *Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(10): p. 1101-13.

93. Rangasamy, D., et al., *Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development*. *Embo J*, 2003. **22**(7): p. 1599-607.
94. Leach, T.J., et al., *Histone H2A.Z is widely but nonrandomly distributed in chromosomes of Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(30): p. 23267-72.
95. Fan, J.Y., et al., *H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 $\alpha$ -mediated chromatin fiber Folding*. *Mol Cell*, 2004. **16**(4): p. 655-61.
96. Fan, J.Y., et al., *The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states*. *Nat Struct Biol*, 2002. **9**(3): p. 172-6.
97. Park, Y.J., et al., *A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(23): p. 24274-82.
98. Morrison, A.J., et al., *INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin Remodelling to DNA damage repair*. *Cell*, 2004. **119**(6): p. 767-75.
99. Mizuguchi, G., et al., *ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin Remodelling complex*. *Science*, 2004. **303**(5656): p. 343-8.
100. Zhang, H., D.N. Roberts, and B.R. Cairns, *Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss*. *Cell*, 2005. **123**(2): p. 219-31.
101. Li, B., et al., *Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin Remodelling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(51): p. 18385-90.
102. van Daal, A., et al., *Drosophila has a single copy of the gene encoding a highly conserved histone H2A variant of the H2A.F/Z type*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(15): p. 7487-97.
103. van Daal, A. and S.C. Elgin, *A histone variant, H2AvD, is essential in Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell*, 1992. **3**(6): p. 593-602.
104. Clarkson, M.J., et al., *Regions of variant histone His2AvD required for Drosophila development*. *Nature*, 1999. **399**(6737): p. 694-7.

105. Swaminathan, J., E.M. Baxter, and V.G. Corces, *The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of Drosophila heterochromatin*. Genes Dev, 2005. **19**(1): p. 65-76.
106. Ahmad, K. and S. Henikoff, *Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99 Suppl 4**: p. 16477-84.
107. Ahmad, K. and S. Henikoff, *The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly*. Mol Cell, 2002. **9**(6): p. 1191-200.
108. Henikoff, S., E. McKittrick, and K. Ahmad, *Epigenetics, histone H3 variants, and the inheritance of chromatin states*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2004. **69**: p. 235-43.
109. McKittrick, E., et al., *Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(6): p. 1525-30.
110. Akhmanova, A., K. Miedema, and W. Hennig, *Identification and characterization of the Drosophila histone H4 replacement gene*. FEBS Lett, 1996. **388**(2-3): p. 219-22.
111. Becker, P.B. and W. Horz, *ATP-dependent nucleosome Remodelling*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 247-73.
112. Havas, K., I. Whitehouse, and T. Owen-Hughes, *ATP-dependent chromatin Remodelling activities*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(5-6): p. 673-82.
113. Lusser, A. and J.T. Kadonaga, *Chromatin Remodelling by ATP-dependent molecular machines*. Bioessays, 2003. **25**(12): p. 1192-200.
114. Neely, K.E. and J.L. Workman, *The complexity of chromatin Remodelling and its links to cancer*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1603**(1): p. 19-29.
115. Neely, K.E. and J.L. Workman, *Histone acetylation and chromatin Remodelling: which comes first?* Mol Genet Metab, 2002. **76**(1): p. 1-5.
116. Reinke, H. and W. Horz, *Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter*. Mol Cell, 2003. **11**(6): p. 1599-607.
117. Fazio, T.G. and T. Tsukiyama, *Chromatin Remodelling in vivo: evidence for a nucleosome Sliding mechanism*. Mol Cell, 2003. **12**(5): p. 1333-40.

118. Mohrmann, L. and C.P. Verrijzer, *Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin Remodelling complexes*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1681**(2-3): p. 59-73.
119. Choudhary, P. and P. Varga-Weisz, *ATP-dependent chromatin Remodelling: action and reaction*. Subcell Biochem, 2007. **41**: p. 29-43.
120. Saha, A., J. Wittmeyer, and B.R. Cairns, *Chromatin Remodelling: the industrial revolution of DNA around histones*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(6): p. 437-47.
121. Bouazoune, K. and A. Brehm, *ATP-dependent chromatin Remodelling complexes in Drosophila*. Chromosome Res, 2006. **14**(4): p. 433-49.
122. Owen-Hughes, T., *Colworth memorial lecture. Pathways for Remodelling chromatin*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 5): p. 893-905.
123. Brehm, A., et al., *dMi-2 and ISWI chromatin Remodelling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties*. Embo J, 2000. **19**(16): p. 4332-41.
124. Eisen, J.A., K.S. Sweder, and P.C. Hanawalt, *Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(14): p. 2715-23.
125. Flaus, A., et al., *Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(10): p. 2887-905.
126. Cote, J., et al., *Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex*. Science, 1994. **265**(5168): p. 53-60.
127. Sudarsanam, P., et al., *Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3364-9.
128. Kadam, S., et al., *Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits*. Genes Dev, 2000. **14**(19): p. 2441-51.
129. Wittmeyer, J., A. Saha, and B. Cairns, *DNA translocation and nucleosome Remodelling assays by the RSC chromatin Remodelling complex*. Methods Enzymol, 2004. **377**: p. 322-43.
130. Saha, A., J. Wittmeyer, and B.R. Cairns, *Chromatin Remodelling through directional DNA translocation from an internal nucleosomal site*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(9): p. 747-55.

131. Cairns, B.R., et al., *Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-Remodelling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains.* Mol Cell, 1999. **4**(5): p. 715-23.
132. Wang, W., *The SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers: similar mechanisms for diverse functions.* Curr Top Microbiol Immunol, 2003. **274**: p. 143-69.
133. Xue, Y., et al., *The human SWI/SNF-B chromatin-Remodelling complex is related to yeast rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13015-20.
134. Mohrmann, L., et al., *Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related Drosophila chromatin-Remodelling complexes.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(8): p. 3077-88.
135. Li, B., M. Carey, and J.L. Workman, *The role of chromatin during transcription.* Cell, 2007. **128**(4): p. 707-19.
136. Sudarsanam, P. and F. Winston, *The Swi/Snf family nucleosome-Remodelling complexes and transcriptional control.* Trends Genet, 2000. **16**(8): p. 345-51.
137. de la Serna, I.L., Y. Ohkawa, and A.N. Imbalzano, *Chromatin Remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodelers.* Nat Rev Genet, 2006. **7**(6): p. 461-73.
138. Hara, R. and A. Sancar, *The SWI/SNF chromatin-Remodelling factor stimulates repair by human excision nuclease in the mononucleosome Core particle.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(19): p. 6779-87.
139. Chai, B., et al., *Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair.* Genes Dev, 2005. **19**(14): p. 1656-61.
140. Roberts, C.W. and S.H. Orkin, *The SWI/SNF complex--chromatin and cancer.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 133-42.
141. Uno, K., et al., *Aberrations of the hSNF5/INI1 gene are restricted to malignant rhabdoid tumors or atypical teratoid/rhabdoid tumors in pediatric solid tumors.* Genes Chromosomes Cancer, 2002. **34**(1): p. 33-41.

142. Bochar, D.A., et al., *BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin Remodelling to breast cancer*. Cell, 2000. **102**(2): p. 257-65.
143. Amati, B., et al., *Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin Remodelling and transcription*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1471**(3): p. M135-45.
144. Elfring, L.K., et al., *Genetic analysis of brahma: the Drosophila homolog of the yeast chromatin Remodelling factor SWI2/SNF2*. Genetics, 1998. **148**(1): p. 251-65.
145. Ito, T., et al., *ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and Remodelling factor*. Cell, 1997. **90**(1): p. 145-55.
146. Tsukiyama, T., et al., *ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome Remodelling factor*. Cell, 1995. **83**(6): p. 1021-6.
147. Varga-Weisz, P.D., et al., *Chromatin-Remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 598-602.
148. Clapier, C.R., et al., *Critical role for the histone H4 N terminus in nucleosome Remodelling by ISWI*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 875-83.
149. Corona, D.F., et al., *ISWI is an ATP-dependent nucleosome Remodelling factor*. Mol Cell, 1999. **3**(2): p. 239-45.
150. Langst, G., et al., *Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer*. Cell, 1999. **97**(7): p. 843-52.
151. Barak, O., et al., *Isolation of human NURF: a regulator of Engrailed gene expression*. Embo J, 2003. **22**(22): p. 6089-100.
152. Bochar, D.A., et al., *A family of chromatin Remodelling factors related to Williams syndrome transcription factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1038-43.
153. LeRoy, G., et al., *Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 14787-90.
154. Poot, R.A., et al., *HuCHRAC, a human ISWI chromatin Remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-Fold proteins*. Embo J, 2000. **19**(13): p. 3377-87.



155. Mellor, J., *Imitation switch complexes*. Ernst Schering Res Found Workshop, 2006(57): p. 61-87.
156. Zofall, M., et al., *Chromatin Remodelling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(4): p. 339-46.
157. Gonda, K. and N. Kikyo, *Nuclear Remodelling assay in Xenopus egg extract*. Methods Mol Biol, 2006. **348**: p. 247-58.
158. Guschin, D., et al., *Multiple ISWI ATPase complexes from xenopus laevis. Functional conservation of an ACF/CHRAC homolog*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35248-55.
159. Langst, G. and P.B. Becker, *Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-Remodelling factors*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 14): p. 2561-8.
160. Grune, T., et al., *Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the Remodelling factor ISWI*. Mol Cell, 2003. **12**(2): p. 449-60.
161. de la Cruz, X., et al., *Do protein motifs read the histone code?* Bioessays, 2005. **27**(2): p. 164-75.
162. Clapier, C.R., K.P. Nightingale, and P.B. Becker, *A critical epitope for substrate recognition by the nucleosome Remodelling ATPase ISWI*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(3): p. 649-55.
163. Martinez-Balbas, M.A., et al., *Drosophila NURF-55, a WD Repeat protein involved in histone metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 132-7.
164. Badenhorst, P., et al., *Biological functions of the ISWI chromatin Remodelling complex NURF*. Genes Dev, 2002. **16**(24): p. 3186-98.
165. Badenhorst, P., et al., *The Drosophila nucleosome Remodelling factor NURF is required for Ecdysteroid signaling and metamorphosis*. Genes Dev, 2005. **19**(21): p. 2540-5.
166. Kang, J.G., A. Hamiche, and C. Wu, *GAL4 directs nucleosome Sliding induced by NURF*. Embo J, 2002. **21**(6): p. 1406-13.

167. Ito, T., et al., *ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly*. *Genes Dev*, 1999. **13**(12): p. 1529-39.
168. Eberharter, A., et al., *Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI-induced nucleosome Remodelling*. *Embo J*, 2001. **20**(14): p. 3781-8.
169. Corona, D.F., et al., *Two histone Fold proteins, CHRAC-14 and CHRAC-16, are developmentally regulated subunits of chromatin accessibility complex (CHRAC)*. *Embo J*, 2000. **19**(12): p. 3049-59.
170. Hartlepp, K.F., et al., *The histone Fold subunits of Drosophila CHRAC facilitate nucleosome Sliding through dynamic DNA interactions*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(22): p. 9886-96.
171. Fyodorov, D.V. and J.T. Kadonaga, *Dynamics of ATP-dependent chromatin assembly by ACF*. *Nature*, 2002. **418**(6900): p. 897-900.
172. Eberharter, A., et al., *ACF1 improves the effectiveness of nucleosome mobilization by ISWI through PHD-histone contacts*. *Embo J*, 2004. **23**(20): p. 4029-39.
173. Kukimoto, I., et al., *The histone-Fold protein complex CHRAC-15/17 enhances nucleosome Sliding and assembly mediated by ACF*. *Mol Cell*, 2004. **13**(2): p. 265-77.
174. Mellor, J., *Dynamic nucleosomes and gene transcription*. *Trends Genet*, 2006. **22**(6): p. 320-9.
175. Alexiadis, V., et al., *In vitro chromatin Remodelling by chromatin accessibility complex (CHRAC) at the SV40 origin of DNA replication*. *Embo J*, 1998. **17**(12): p. 3428-38.
176. Mizuguchi, G., et al., *Role of nucleosome Remodelling factor NURF in transcriptional activation of chromatin*. *Mol Cell*, 1997. **1**(1): p. 141-50.
177. Ferreira, R., et al., *Site-specific acetylation of ISWI by GCN5*. *BMC Mol Biol*, 2007. **8**: p. 73.
178. Sims, R.J., 3rd, et al., *Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(51): p. 41789-92.

179. Pray-Grant, M.G., et al., *Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation*. Nature, 2005. **433**(7024): p. 434-8.
180. Flanagan, J.F., et al., *Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail*. Nature, 2005. **438**(7071): p. 1181-5.
181. Lusser, A., D.L. Urwin, and J.T. Kadonaga, *Distinct activities of CHD1 and ACF in ATP-dependent chromatin assembly*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(2): p. 160-6.
182. Seelig, H.P., et al., *The major dermatomyositis-specific Mi-2 autoantigen is a presumed helicase involved in transcriptional activation*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(10): p. 1389-99.
183. Wade, P.A., et al., *Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin Remodelling and histone deacetylation*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 62-6.
184. Xue, Y., et al., *NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-Remodelling and histone deacetylase activities*. Mol Cell, 1998. **2**(6): p. 851-61.
185. Zhang, Y., et al., *Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex*. Cell, 1997. **89**(3): p. 357-64.
186. Tong, J.K., et al., *Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome Remodelling complex*. Nature, 1998. **395**(6705): p. 917-21.
187. Ballestar, E., et al., *A Drosophila MBD family member is a transcriptional Corepressor associated with specific genes*. Eur J Biochem, 2001. **268**(20): p. 5397-406.
188. Bouazoune, K., et al., *The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization*. Embo J, 2002. **21**(10): p. 2430-40.
189. Marhold, J., A. Brehm, and K. Kramer, *The Drosophila methyl-DNA binding protein MBD2/3 interacts with the NuRD complex via p55 and MI-2*. BMC Mol Biol, 2004. **5**(1): p. 20.
190. Marhold, J., et al., *The Drosophila MBD2/3 protein mediates interactions between the MI-2 chromatin complex and CpT/A-methylated DNA*. Development, 2004. **131**(24): p. 6033-9.

191. Zhang, Y., et al., *The dermatomyositis-specific autoantigen Mi-2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome Remodelling activities*. Cell, 1998. **95**(2): p. 279-89.
192. Srinivasan, S., et al., *The Drosophila trithorax group protein Kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by RNA Polymerase II*. Development, 2005. **132**(7): p. 1623-35.
193. Kennison, J.A. and J.W. Tamkun, *Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 8136-40.
194. Daubresse, G., et al., *The Drosophila kismet gene is related to chromatin-Remodelling factors and is required for both segmentation and segment identity*. Development, 1999. **126**(6): p. 1175-87.
195. Therrien, M., et al., *A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in Drosophila*. Genetics, 2000. **156**(3): p. 1231-42.
196. Verheyen, E.M., et al., *Analysis of dominant enhancers and suppressors of activated Notch in Drosophila*. Genetics, 1996. **144**(3): p. 1127-41.
197. Go, M.J. and S. Artavanis-Tsakonas, *A genetic screen for novel components of the notch signaling pathway during Drosophila bristle development*. Genetics, 1998. **150**(1): p. 211-20.
198. Ghaemmaghami, S., et al., *Global analysis of protein expression in yeast*. Nature, 2003. **425**(6959): p. 737-41.
199. Shen, X., et al., *A chromatin Remodelling complex involved in transcription and DNA processing*. Nature, 2000. **406**(6795): p. 541-4.
200. Ebbert, R., A. Birkmann, and H.J. Schuller, *The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of Saccharomyces cerevisiae required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex*. Mol Microbiol, 1999. **32**(4): p. 741-51.
201. Kagalwala, M.N., et al., *Topography of the ISW2-nucleosome complex: insights into nucleosome spacing and chromatin Remodelling*. Embo J, 2004. **23**(10): p. 2092-104.

202. Peterson, C.L. and J. Cote, *Cellular machineries for chromosomal DNA repair*. Genes Dev, 2004. **18**(6): p. 602-16.
203. Cairns, B.R., *Around the world of DNA damage INO80 days*. Cell, 2004. **119**(6): p. 733-5.
204. van Attikum, H., et al., *Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin Remodelling with DNA double-strand break repair*. Cell, 2004. **119**(6): p. 777-88.
205. Papamichos-Chronakis, M., J.E. Krebs, and C.L. Peterson, *Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin Remodelling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage*. Genes Dev, 2006. **20**(17): p. 2437-49.
206. van Vugt, J.J., et al., *The ins and outs of ATP-dependent chromatin Remodelling in budding yeast: biophysical and proteomic perspectives*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1769**(3): p. 153-71.
207. Tsukuda, T., et al., *Chromatin Remodelling at a DNA double-strand break site in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2005. **438**(7066): p. 379-83.
208. Bakshi, R., et al., *Characterization of a human SWI2/SNF2 like protein hINO80: demonstration of catalytic and DNA binding activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(1): p. 313-20.
209. Korber, P. and W. Horz, *SWRred not shaken; mixing the histones*. Cell, 2004. **117**(1): p. 5-7.
210. Krogan, N.J., et al., *A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1565-76.
211. Zhang, H., et al., *The Yaf9 component of the SWR1 and NuA4 complexes is required for proper gene expression, histone H4 acetylation, and Htz1 replacement near telomeres*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9424-36.
212. Kobor, M.S., et al., *A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin*. PLoS Biol, 2004. **2**(5): p. E131.
213. Raisner, R.M., et al., *Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin*. Cell, 2005. **123**(2): p. 233-48.

214. Millar, C.B. and M. Grunstein, *Genome-wide patterns of histone modifications in yeast*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 657-66.
215. Wu, W.H., et al., *Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(12): p. 1064-71.
216. Shen, X., et al., *Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin Remodelling*. Mol Cell, 2003. **12**(1): p. 147-55.
217. Olave, I.A., S.L. Reck-Peterson, and G.R. Crabtree, *Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin Remodelling*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 755-81.
218. Szerlong, H., A. Saha, and B.R. Cairns, *The nuclear actin-related proteins Arp7 and Arp9: a dimeric module that cooperates with architectural proteins for chromatin Remodelling*. Embo J, 2003. **22**(12): p. 3175-87.
219. Braun, A., et al., *Drosophila immunity: analysis of larval hemocytes by P-element-mediated enhancer trap*. Genetics, 1997. **147**(2): p. 623-34.
220. Saget, O., et al., *Needs and targets for the multi sex combs gene product in Drosophila melanogaster*. Genetics, 1998. **149**(4): p. 1823-38.
221. Orlando, V. and R. Paro, *Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns*. Curr Opin Genet Dev, 1995. **5**(2): p. 174-9.
222. ME, L.L., et al., *New p53 related genes in human tumors: significant downregulation in colon and lung carcinomas*. Oncol Rep, 2006. **16**(3): p. 603-8.
223. Hobbs, C.A., et al., *Tip60 Protein Isoforms and Altered Function in Skin and Tumors that Overexpress Ornithine Decarboxylase*. Cancer Res, 2006. **66**(16): p. 8116-22.
224. Logan, I.R., et al., *Human PIRH2 enhances androgen receptor signaling through inhibition of histone deacetylase 1 and is overexpressed in prostate cancer*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(17): p. 6502-10.
225. Sapountzi, V., I.R. Logan, and C.N. Robson, *Cellular functions of TIP60*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(9): p. 1496-509.
226. Sun, Y., et al., *Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation*. FEBS Lett, 2006. **580**(18): p. 4353-6.

227. Deuring, R., et al., *The ISWI chromatin-Remodelling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 355-65.
228. Kehle, J., et al., *dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression*. Science, 1998. **282**(5395): p. 1897-900.
229. Tsukiyama, T. and C. Wu, *Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome Remodelling factor*. Cell, 1995. **83**(6): p. 1011-20.
230. Bao, Y. and X. Shen, *INO80 subfamily of chromatin Remodelling complexes*. Mutat Res, 2007. **618**(1-2): p. 18-29.
231. Rogakou, E.P., et al., *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo*. J Cell Biol, 1999. **146**(5): p. 905-16.
232. Paull, T.T., et al., *A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage*. Curr Biol, 2000. **10**(15): p. 886-95.
233. Goldberg, M., et al., *MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint*. Nature, 2003. **421**(6926): p. 952-6.
234. Stucki, M., et al., *MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1213-26.
235. Downs, J.A., N.F. Lowndes, and S.P. Jackson, *A role for Saccharomyces cerevisiae histone H2A in DNA repair*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 1001-4.
236. Shroff, R., et al., *Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break*. Curr Biol, 2004. **14**(19): p. 1703-11.
237. Downs, J.A., et al., *Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites*. Mol Cell, 2004. **16**(6): p. 979-90.
238. Madigan, J.P., H.L. Chotkowski, and R.L. Glaser, *DNA double-strand break-induced phosphorylation of Drosophila histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(17): p. 3698-705.
239. Eissenberg, J.C., M. Wong, and J.C. Chrivia, *Human SRCAP and Drosophila melanogaster DOM are homologs that function in the notch signaling pathway*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(15): p. 6559-69.

240. Meneghini, M.D., M. Wu, and H.D. Madhani, *Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin*. Cell, 2003. **112**(5): p. 725-36.
241. Babiarz, J.E., J.E. Halley, and J. Rine, *Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 2006. **20**(6): p. 700-10.
242. Qi, D., et al., *Drosophila Reptin and other TIP60 complex components promote generation of silent chromatin*. Genetics, 2006. **174**(1): p. 241-51.



## 6 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ACF	ATP-utilizing chromatin assembly and remodelling factor
APS	Ammoniumpersulfat
ARP	Actin related protein
ATP	Adenosintriphosphat
BAF	BRG1 associated factor
BAP	Brahma associated protein
Bdf1	Bromo domain factor 1
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Bovine Serum Albumin
BRCA1	Breast cancer 1
BRG1	Brahma related gene 1
BRK	Breast tumor kinase
BRM	Brahma
c	centi
°C	Grad Celsius
CAF1	Chromatin assembly factor 1
CenH3	Centromer Histone H3
cDNA	copy DNA
CHD	Chromodomain-helicase-DNA-binding
CHRAC	Chromatin accessibility complex
chromo	Chromatin organisation modifier
Ci	Curie
c-Myb	myeloblastosis viral oncogene homolog
c-Myc	cellular myelocytomatosis oncogene
DBINO	DNA binding domain of INO80
dCHD	<i>Drosophila</i> CHD
dMi-2	<i>Drosophila</i> Mi-2

DNA	Desoxyribonucleic acid
dNURF	<i>Drosophila</i> NURF
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DSB	Doppelstrangbruch
dTip60	<i>Drosophila</i> Tip60
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetate
E2F	Elongation factor 2
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FPLC	Fast performance liquid chromatography
FT	Flow through (Durchlauf)
g	Gramm
x g	x Erdbeschleunigung
h	Stunde
HAT	Histon Acetyltransferase
H2Abd	Histon 2A barr body deleted
H2AvD	Histon 2A Variante <i>Drosophila</i>
hCHRAC	human CHRAC
HDAC	Histon Deacetylase
hDomino	human Domino
HEMG	HEPES/EDTA/MgCl <sub>2</sub> /Glycerol
HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-H <sup>+</sup> )-(2-ethanesulfonic acid)
HDM	Histon Demethylase
hINO80	human INO80
His	Histidin
HMG	High mobility group
HMT	Histon Methyltransferase
HMR	Hybrid male rescue
hNURD	human Nucleosomal remodelling and histone deacetylase
hNURF	human Nucleosome Remodelling Factor

## *Abkürzungen*

HP1	Heterochromatin Protein 1
Hsp	Heat shock protein
hSWI/SNF	human Switch/sucrose non-fermenting
Htz1	Histonvariante H2A.Z in Hefe
IP	Input (Auftrag)
ISWI	Imitation Switch
Lys	Lysin
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KIS	kismet
rpm	rotations per minute
l	Liter
μ	mikro
m	Meter
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flying
MDa	Megadalton
Mi-2	Mitchell autoimmune antibody 2
min	Minute
MLL	Mixed Lineage Leukaemia
Mnase	Micrococcal Nuclease
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NaMBS	Natrium Metabisulfit
NEB	New England Biolabs
NRD	Nucleosome remodelling and deacetylating complex
NuA4	Nucleosome acetyltransferase of histone H4
NURD	Nucleosomal remodelling and histone deacetylase
NURF	Nucleosome Remodelling Factor

PI3KK	Phosphatidylinositol 3-Kinase-like Kinase
p53	Protein 53 kDa
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PBAF	Polybromo-associated BAF
PBAP	Polybromo-associated BAP
Pc-G	Polycomb group proteins
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHD	Plant homeo domain
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
PolII	Polymerase II
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
Arg	Arginin
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleic acid
RbAp48	Rb-associated protein 48
RSC	Remodels the Structure of Chromatin
RSF	Remodelling and Spacing Factor
RT	Raumtemperatur
Rvb1/Rvb2	RuvB-like protein 1/2
Ser	Serin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SANT	SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIB B
SLIDE	SANT-like ISWI domain
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SNF2	Sucrose non-fermenting protein 2
SNF5	Sucrose non-fermenting protein 5
SNF2H	Sucrose non-fermenting protein 2 homolog
SNF2L	Sucrose non-fermenting protein 2-like
SWI/SNF	Switch/sucrose non-fermenting
SWR	Swi2/Snf2-related
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

## Abkürzungen

Tip60	HIV-1 Tat interacting protein, 60kDa
TRAX	<i>Drosophila</i> nuclear extracts
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
V5	V5 Epitop des pib/V5-His Vektors (Invitrogen)
v/v	volume per volume
W601	200 bp Fragment der Widom 601 Sequenz
WAC	WSTF/Acf1/Cbp146
WAKZ	WSTF/Acf1/KIAA0314/ZK783.4
WCRF	Williams syndrome transcription factor related Chromatin Remodelling Factor
WT	Wildtyp
w/v	weight per volume
xISWI	<i>Xenopus</i> ISWI
<i>Xenopus</i>	<i>Xenopus laevis</i>

## Angelika Loiberstetter – Lebenslauf

### Persönliches

---

Kontakt	Emil-Dittler-Str. 23a 81479 München Tel.: (0175) 9055452 E-Mail: <a href="mailto:Angelika.Loiberstetter@med.uni-muenchen.de">Angelika.Loiberstetter@med.uni-muenchen.de</a>
Geburtstag/-ort:	2. Januar 1980 in Haag i. Obb.

### Schule und Studium

---

06/2007	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Ø 2,16
03/2003	Physikum Ø 2,66
Seit 03/2001	<b>Ludwig-Maximilians-Universität München</b> Studium der Humanmedizin
09/1996 - 06/1999	<b>Luitpold Gymnasium</b> , Wasserburg a. Inn, Abitur Ø 2,2
09/1990 - 06/1996	<b>Gymnasium Gars</b> , Gars a. Inn

### Praktisches Jahr (02/2006 - 01/2007)

---

Neurologie	<b>Klinikum der Universität München: Neurologische Klinik und Poliklinik - Großhadern</b>
Innere Medizin	<b>Harvard Medical School</b> , Boston, USA Core Clerkship - 3 Monate am Brigham & Women´s Hospital Emergency Medicine - 1 Monat am Brigham & Women´s Hospital/Massachussets General Hospital
Chirurgie	<b>Klinikum Neuperlach:</b> Klinik für Allgemein-/Viszeralchirurgie und Coloproktologie

### Berufserfahrung

---

Seit 07/07	<b>Assistenzärztin</b> in der <b>Neurologischen Klinik und Poliklinik - Großhadern, Klinikum der Universität München</b>
------------	--

## Dissertation

---

Seit 03/2003 **Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Molekularbiologie**, Prof. Dr. Peter B. Becker  
Promotion, experimentelle Arbeit im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ zum Thema:  
„Charakterisierung der ATPasen Domino A und Domino B in *Drosophila melanogaster*“

## Praktische Erfahrung/Nebentätigkeiten

---

05/2007 **CASUS-Schulung** zum Thema: Schreiben eines medizinischen Online-Falls, Medizinische Klinik, Innenstadt

03/2007 **MeCuM-Workshop „Verbesserung der Prüfungsqualität“** in Frauenchiemsee

02/2007 **Lehrtätigkeit als Dozentin** in Veranstaltungen der Blockpraktika Neurologie und Neurochirurgie (Tutorials)

Seit 03/2007 **Mitarbeit an der Etablierung eines „Skills Labs“** in der Innenstadt - Schwerpunkt Modul 4, insbesondere Neurologie

Seit 04/2007 **Mitarbeit im Bereich Studium und Lehre** für die Fächer Neurologie und Neurochirurgie unter der Leitung von Dr. Ennes Auerswald und Prof. Michael Strupp

10/2006 **Tutorin** im „Crashkurs“ für Anamnese und körperliche Untersuchung

2001 - 2003 **Schwesternhilfskraft** im Kreiskrankenhaus Wasserburg a. Inn, Innere Medizin

08/1999 **Erdbebenhilfe** in Düsçe, Türkei

1995 - 2007 **Nebentätigkeit** in Verkauf und Gastronomie

## Stipendien

---

2006	Stipendium der <b>München-Harvard Alliance for Medical Education</b> , PJ Tertial in der Inneren Medizin an der Harvard Medical School
2003 - 2005	Stipendium des <b>Förderprogramms für Forschung und Lehre</b> , Promotion am Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Molekularbiologie, Prof. Dr. Peter B. Becker

## Sonstige Fähigkeiten

---

Sprachen	Deutsch	Muttersprache
	Englisch	Fließend in Wort und Schrift
	Latein	Großes Latinum
	Italienisch	Grundkenntnisse
	Französisch	Grundkenntnisse
	Türkisch	Grundkenntnisse
Computer	MS Office, Windows, Mac OS X	

## Hobbys

---

Tennis, Joggen, Radfahren, Skifahren, Lesen, Musik