

Regulation der Transkriptionsaktivität in primären humanen T-Zellen

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

von
Barbara Günzler
aus Kösching
2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn PD Dr. M. Meisterernst betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München,

Dissertation eingereicht am 2. April 2004

1. Gutachter: PD Dr. M. Meisterernst

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Cramer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2004

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich allen Personen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Michael Meisterernst, in dessen Labor ich meine Dissertation anfertigen durfte. Er gab mir immer neue Ideen und wertvolle Tips für meine Arbeit und nahm sich viel Zeit für anregende Diskussionen. Ich danke ihm auch für die Möglichkeit, auf internationalen Kongressen Teilergebnisse meiner Arbeit zu präsentieren und dabei sehr wertvolle Erfahrungen zu sammeln.

Herrn Prof. Dr. Cramer danke ich dafür, dass er trotz seiner knapp bemessenen Zeit als Gutachter für die vorliegende Arbeit und als Vorsitzender der Prüfungskommission fungiert.

Frau Dr. Elisabeth Kremmer und Ihrer Arbeitsgruppe danke ich für die Herstellung der weltbesten Antikörper.

Herrn Dr. T. Kouzarides, Herrn Dr. L. Tora, Herrn Dr. M. Vigneron, Frau Dr. E. Golemis, Herrn Dr. P. Cook und Herrn Dr. G. Dreyfuss gilt mein Dank dafür, dass sie mir wertvolle Proben ihrer Antikörper zur Verfügung gestellt haben. Ebenso danke ich Herrn Dr. H. Lochmüller für die Bereitstellung primärer humaner Hautfibroblasten.

Beim Team um Herrn Dr. Giegler und Schw. Anne vom Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in München möchte ich mich herzlich bedanken, dass sie mir über einen langen Zeitraum hinweg Buffy Coats zur Verfügung gestellt haben.

Ich danke all meinen derzeitigen und ehemaligen Kollegen für das freundschaftliche Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft, den Zusammenhalt und den Spaß. Besonderer Dank gilt Gertraud Stelzer, die mich auf den ersten Schritten im Labor begleitet hat, und Gerhard Mittler, der mir als „wandelndes Lexikon“ bei allen Problemen geduldig weitergeholfen hat. Ich bedanke mich herzlich bei Stefan Jünemann für das Durchlesen und Korrigieren dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mich unermüdlich unterstützt und bestärkt haben.

Schließlich möchte ich Oliver für die Geduld an langen Arbeitstagen, den Trost, die Motivation und die moralische Unterstützung während der letzten Jahre danken.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis Juni 2003 im Labor von PD Dr. Michael Meisterernst am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München und am Hämatologikum der GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München angefertigt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden folgende Veröffentlichungen angefertigt:

Berti, L., Mittler, G., Przemeck, G. K. H., Stelzer, G., Günzler, B., Amati, F., Conti, E., Dallapiccola, B., Hrabé de Angelis, M., Novelli, G. und Meisterernst, M. (2001) Isolation and characterization of a novel gene from the DiGeorge chromosomal region that encodes for a mediator subunit. *Genomics*, **74**, 320–332.

Günzler, B., Jünemann, S., Kremmer, E. Leimbacher, M. und Meisterernst, M. (In Vorbereitung) Trimethylation of lysine 4 on histone H3 and recruitment of Brg1 correlate during T cell stimulation.

Abkürzungen

II _A	große Untereinheit der RNA-Polymerase II in hypophosphorylierter Form
II _O	große Untereinheit der RNA-Polymerase II in hyperphosphorylierter Form
AP	alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAF	Brg oder Brm assoziierte Faktoren
bp	Basenpaar(e)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-4-indolylphosphat
bidest.	bidestilliert
BRE	<i>TFIIB recognition element</i>
Brg1	<i>Brahma-related gene 1</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CBP	CREB bindendes Protein
CD \mathcal{X}	<i>cluster of differentiation</i> \mathcal{X}
CD25	Interleukin-2 Rezeptor α -Kette
CDK \mathcal{X}	<i>cyclin dependent kinase</i> \mathcal{X}
cDNA	zur RNA komplementäre DNA (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Fadenwurm)
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \cdot 10^{10}$ radioaktive Zerfälle pro Sekunde)
CREB	<i>cAMP-response-element binding protein</i>
CTD	carboxyterminale Domäne der großen Untereinheit der RNA Polymerase II
Da	Dalton
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
DCK	Deoxycytidinkinase
dCTP	2'-Deoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-triphosphat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruchtfliege)
DMEM	<i>Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium</i>

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Deoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DOC	Natrium-Deoxycholat
DPE	<i>downstream promoter element</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Deoxyuracil-5'-phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
Fcp1	TFIIF-assoziierte CTD-Phosphatase
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GTF	genereller Transkriptionsfaktor
H	Histon, d.h. H2A, H2B, H3 und H4
HAT	Histonacetyltransferase
hBrm	<i>human Brahma</i>
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMTase	Histonmethyltransferase
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse-radish peroxidase</i>)
hRPB \mathcal{X}	Untereinheit \mathcal{X} der menschlichen RNA Polymerase II (<i>human RNA polymerase B</i>)
kb	Kilobasenpaar(e)
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IL- \mathcal{X}	Interleukin- \mathcal{X}
IL-2R α	Interleukin-2 Rezeptor α -Kette, auch CD25
INF- γ	Interferon- γ
Inr	<i>initiator</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NBT	Nitroblautetrazolium
NC	negativer Cofaktor
NF- κ B	nukleärer Faktor κ -B
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NF-Y	nukleärer Transkriptionsfaktor Y
NPV	<i>nuclear pellet volume</i>
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat

OD _λ	Optische Dichte bei der Wellenlänge λ
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	positiver Cofaktor
PCAF	p300/CBP-assoziiierter Faktor
PCQAP	<i>PC2-glutamine/Q-rich-associated protein</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCV	<i>packed cell volume</i>
PHA	Phytohämagglutinin
PIC	Präinitiationskomplex (<i>pre-initiation complex</i>)
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol II	RNA Polymerase II
Pol II _A	RNA Polymerase II in hypophosphorylierter Form
Pol II _O	RNA Polymerase II in hyperphosphorylierter Form
PRMT	Protein-Arginin-N-Methyltransferase
P-TEFb	positiver Transkriptions-Elongationsfaktor b
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAP	RNA-Polymerase II-assoziiertes Protein, TFIIIF-Untereinheit
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPB _X	Untereinheit X der RNA Polymerase B bzw. der RNA Polymerase II
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
rRNA	ribosomale RNA (<i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Spaltheife)
SAM	S-Adenosyl-methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SNF	<i>sucrose non-fermenting</i>
snRNA	kleine kernlokalisierte RNA (<i>small nuclear ribonucleic acid</i>)
SWI	<i>mating type switching</i>
TAF	TBP-assoziiierter Faktor
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TCR _β	β-Kette des T-Zellrezeptors

TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFII	Transkriptionsfaktor der Klasse-II-Transkription
Tris	Trishydroxymethyl-aminoethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure (<i>transfer ribonucleic acid</i>)
U	Enzymeinheit (<i>unit</i>)
ü/N	über Nacht
USA	<i>upstream factor stimulatory activity</i>
(v/v)	Volumenanteil einer Flüssigkeit in einer Lösung (<i>volume per volume</i>)
(w/v)	Gewichtsanteil eines Stoffes in einer Lösung (<i>weight per volume</i>)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Transkription in Eukaryonten	1
1.1.1	Regulationssequenzen von eukaryontischen Klasse-II-Genen	1
1.1.2	RNA-Polymerase II	2
1.1.3	Die generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs)	3
1.1.4	Transkriptionscofaktoren	6
1.1.4.1	TBP-assoziierte Faktoren (TAFs)	6
1.1.4.2	Generelle Transkriptionscofaktoren	8
1.1.4.3	Mediatorkomplexe	9
1.1.5	Chromatin modifizierende Cofaktoren	9
1.1.5.1	Chromatin als Transkriptionsregulator – Histon- modifikationen	9
1.1.5.2	Histon modifizierende Enzyme	12
1.1.5.3	ATP-abhängige <i>chromatin remodeling</i> Komplexe	15
1.2	Primäre T-Zellen als Modellsystem für Transkriptionsaktivierung	17
1.2.1	T-Zellen	17
1.2.2	Aktivierung von T-Zellen	18
1.2.3	Transkription in T-Zellen	21
1.3	Fragestellung	22
2	Material	23
2.1	Geräte und Hilfsmittel	23
2.2	Verbrauchsmaterial	24
2.3	Chemikalien und Biochemikalien	25
2.4	Radiochemikalien	28
2.5	Lösungen, Puffer und Kulturmedien	28
2.6	Enzyme	28
2.7	Antikörper	29
2.7.1	Primärantikörper	29
2.7.2	Sekundärantikörper	31
2.7.3	Immobilisierte Antikörper	31
2.8	Oligodesoxyribonukleotide	32
2.9	Peptide	32

2.10	Eukaryontische Zelllinien	33
2.11	Humanes Zellmaterial	33
2.12	Protein-Längenstandards	33
3	Methoden	35
3.1	Eukaryontische Zellkultur	35
3.1.1	Zellvermehrung eukaryontischer Zelllinien und primärer Zellen	35
3.1.2	Anlegen von Dauerkulturen	36
3.1.3	Isolierung primärer humaner T-Lymphozyten	36
3.1.4	Aufreinigung naiver humaner T-Lymphozyten	37
3.1.5	Aktivierung primärer humaner T-Lymphozyten	38
3.2	DNA- und RNA-Arbeitstechniken	38
3.2.1	Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäurelösung	38
3.2.2	Chloropane-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren	39
3.2.3	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	39
3.2.3.1	Amplifizierung von DNA	39
3.2.3.2	<i>Real time PCR</i>	40
3.2.4	Isolierung von RNA aus Säugerzellen	41
3.2.5	Reverse Transkription	41
3.3	Gel-Elektrophorese	42
3.3.1	Agarosegel-Elektrophorese	42
3.3.2	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese)	42
3.3.2.1	Herstellung von Gelen	42
3.3.2.2	Elektrophorese	44
3.3.2.3	Coomassie-Brillantblau-Färbung	44
3.4	Proteinchemische Arbeitsmethoden	44
3.4.1	Herstellung von Kernextrakten	44
3.4.2	Herstellung von Kernextrakten aus Jurkat Zellen (NAM-Protokoll)	46
3.4.3	Herstellung von Gesamtzellextrakten	47
3.4.4	Herstellung von Zellfraktionen	48
3.4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	49
3.5	Immunchemische Methoden	49
3.5.1	Western Blot zum Nachweis filtergebundener Proteine	49
3.5.2	Immunaffinitätschromatographie	52
3.5.3	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen für die Analyse mit dem konfokalen Mikroskop	53
3.5.4	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer	54
3.6	Zellzyklus-Analyse	54
3.7	Methyltransferase-Aktivitätstest	55

3.7.1	Test mit Histonen	55
3.7.2	Peptidtest	56
3.8	ChIP (Chromatinimmunpräzipitation)	56
3.8.1	Herstellung von quervernetzten Zellextrakten	56
3.8.2	Immunpräzipitation	57
3.9	Promotoranalyse <i>in silico</i>	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Das Modellsystem: humane primäre T-Lymphozyten	59
4.1.1	Die Anreicherung humaner T-Zellen	60
4.1.2	Effekte der Aufreinigung naiver T-Lymphozyten	62
4.1.3	Stimulierung von T-Lymphozyten	65
4.2	Untereinheiten der basalen Transkriptionsmaschine während der T-Zellaktivierung	66
4.2.1	Expressionserhöhung vieler allgemeiner Transkriptionsfaktoren nach T-Zellstimulierung	66
4.2.2	Analyse der RNA-Polymerase II	68
4.2.2.1	Regulierte Expression der Untereinheiten von RNA-Polymerase II während der T-Zellaktivierung	68
4.2.2.2	Zunahme der CTD-Phosphorylierung an Serin 2 und Serin 5 nach T-Zellaktivierung.	69
4.2.2.3	Erhöhte Expression von CTD-Kinasen während der T-Zellaktivierung	70
4.3	Histonmethyltransferasen in T-Lymphozyten	73
4.3.1	Induktion einer Histon-H4-Methyltransferase-Aktivität während der T-Zellaktivierung	73
4.3.1.1	T-zellspezifische Induktion von PRMT1 bzw. einer H4-MTase	74
4.3.1.2	Induktion von PRMT1 und einer H4-MTase-Aktivität durch verschiedene Stimuli	76
4.3.1.3	Induktion von PRMT1 auf mRNA-Ebene	79
4.3.2	Methylierung von hnRNP A1 in T-Zellen und Anstieg seiner Expression	81
4.4	Histonmodifikationen in T-Zellen	84
4.4.1	Gleichbleibende Niveaus der Histonmodifikationen nach T-Zellstimulierung	84
4.4.2	Lokalisierung der H3 K4-Methylierung in offenen und dicht angrenzenden Chromatinregionen aktivierter T-Zellen	86
4.5	Chromatin verändernde Cofaktoren	90
4.5.1	Induktion von Brg1 und CBP nach T-Zellaktivierung	90
4.5.2	Anstieg der Brg1-Besetzung und der H3 K4-Trimethylierung auf aktiven Genen	93

4.5.3	Die Lokalisierung von Cofaktoren während der T-Zellaktivierung	99
4.5.3.1	Lokalisierung von Brg1 und CBP in offenen Chromatinregionen aktivierter T-Zellen	99
4.5.3.2	Partielle Colokalisierung von Brg1 und CBP in aktivierten T-Zellen	99
4.5.3.3	Partielle Colokalisierung von Brg1 mit H3 K4-Tri-methylierung	101
5	Diskussion	105
5.1	Die basale Transkriptionsmaschine in der T-Zellaktivierung	105
5.1.1	Allgemeine Transkriptionsfaktoren	105
5.1.2	RNA-Polymerase II	106
5.1.2.1	Mögliche Limitierung aktiver RNA-Polymerase II in nicht aktivierten Lymphozyten über die Menge einzelner Untereinheiten	106
5.1.2.2	Einfluss der CTD-Phosphorylierung auf die allgemeine Transkriptionsaktivität	107
5.1.2.3	CTD-Kinasen in T-Lymphozyten	109
5.2	PRMT1 in der T-Zellaktivierung	110
5.2.1	Spezifische Induktion der PRMT1-Expression nach T-Zellstimulierung	110
5.2.2	Mögliche Funktionen von PRMT1 während der T-Zellaktivierung	111
5.3	Histonmodifikationen und Chromatinumordnung während der T-Zellstimulierung	114
5.3.1	Lokale Änderungen der Histonmodifikationen während der T-Zellaktivierung	114
5.3.2	CBP als genspezifische Histonacetyltransferase oder als allgemeiner Cofaktor mit der Aufgabe eines Brückenmoleküls	117
5.3.3	H3 K4-Methylierung in der T-Zellaktivierung	118
5.3.4	Die Änderung der Chromatinstruktur in der T-Zellaktivierung	121
5.4	Der SWI/SNF-Komplex in der T-Zellstimulierung	122
5.4.1	Mögliche Aufgaben von SWI/SNF-Komplexen bei der T-Zellaktivierung	122
5.4.2	Potentielle Wege der Rekrutierung von SWI/SNF	124
5.4.3	Modell für die Funktion von Brg1 in T-Lymphozyten	126
6	Zusammenfassung	129
	Literaturverzeichnis	132

Kapitel 1

Einleitung

Einer der Grundvorgänge des Lebens ist die Umwandlung der genetischen Information eines Lebewesens in seine zentralen Bausteine, die Proteine. Die genetische Information ist in jeder Zelle in Form der Nukleinsäure DNA gespeichert. Zunächst werden die in der DNA kodierten Informationseinheiten, die Gene, in die Nukleinsäure RNA umgeschrieben (transkribiert). In Eukaryonten müssen informationslose Teile entfernt und die Enden des RNA-Moleküls modifiziert werden. Bei diesem Vorgang, den man Prozessierung nennt, wird die prä-mRNA zur mRNA (Boten- oder *messenger* RNA) umgeformt. Mit Hilfe der Ribosomen werden die prozessierten mRNA-Moleküle in Proteine übersetzt (translatiert). Das Repertoire der exprimierten Gene kann stark variieren, zum einen in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen, zum anderen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Organismus und vom Gewebe, dem eine Zelle angehört. Besonders in höheren Organismen, wie Eukaryonten, wird die Genexpression durch ein komplexes Netzwerk von Signalwegen, Aktivatoren und Repressoren reguliert.

1.1 Transkription in Eukaryonten

1.1.1 Regulationssequenzen von eukaryontischen Klasse-II-Genen

In Eukaryonten unterscheidet man je nach der zuständigen RNA-Polymerase drei Klassen von Genen. RNA-Polymerase I transkribiert die ribosomalen RNAs (rRNAs), Bausteine der Ribosomen, RNA-Polymerase II die mRNAs der Protein kodierenden Gene und RNA-Polymerase III die sogenannte 5S rRNA und die Transfer-RNAs (tRNAs), die als Adaptermoleküle bei der Proteinsynthese dienen. Besonders die Expression der Klasse-II-Genen, die bei weitem die vielfältigste Gruppe darstellen, wird von einer Vielzahl spezifischer Transkriptionsfaktoren kontrolliert.

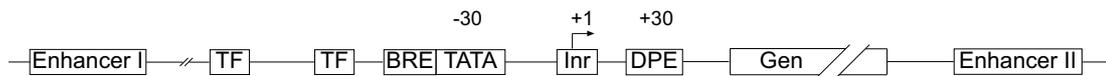


Abbildung 1.1: **Struktur eines Klasse-II-Modellgens.** +1: Transkriptionsstartpunkt; TF: Bindungsstelle für einen spezifischen Transkriptionsfaktor; BRE: TFIIB-Erkennungssequenz; TATA: TATA-Box; Inr: *initiator*; DPE: *downstream promoter element*.

Die Regulationssequenz eines typischen Klasse-II-Gens setzt sich aus dem Promotor und *enhancer*- und *silencer*-Elementen zusammen. Die minimalen oder *core* Promotorelemente sind jene DNA-Sequenzen, die die Bindung der sogenannten basalen Transkriptionsmaschine, bestehend aus der RNA-Polymerase II und den Initiationsfaktoren, ermöglichen. Zu ihnen zählen die TATA-Sequenz ca. 30 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstarts, das BRE (*TFIIB recognition element*) direkt oberhalb der TATA-Box, das pyrimidinreiche Inr (*initiator*)-Element in der Umgebung des Transkriptionsstarts und das DPE (*downstream promoter element*) etwa 30 Basenpaare unterhalb des Transkriptionsstarts (Übersicht in Butler und Kadonaga, 2002; Kadonaga, 2002). Diese einzelnen Elemente sind nicht immer vorhanden und treten in den einzelnen Promotoren in verschiedenen Kombinationen auf. Die wenigsten Gene enthalten alle Elemente. Zusätzlich befinden sich in einem Klasse-II-Promotor proximale Bindungsstellen für regulierende Transkriptionsfaktoren. Die *enhancer* und *silencer*-Elemente enthalten Bindungsstellen für Aktivatoren bzw. Repressoren. Sie können oberhalb oder unterhalb des Promotors im Abstand von bis zu mehreren Kilobasenpaaren und auch in den Intronsequenzen des Gens liegen. Ihr Effekt ist unabhängig von ihrer Orientierung bezüglich des Gens. Innerhalb des Genoms wird ihr Wirkungsbereich durch sogenannte *boundary*- oder *insulator*-Elemente eingegrenzt (Übersicht in West et al., 2002). Die Skizze eines Klasse-II-Modellgens ist in Abb. 1.1 zu sehen.

1.1.2 RNA-Polymerase II

Das Herz der basalen Transkriptionsmaschine ist die RNA-Polymerase II, ein Multiproteinkomplex mit 12 Untereinheiten und einer Größe von über 500 kDa. Innerhalb der RNA-Polymerasen I, II und III sind die drei größten Untereinheiten und RPB11 (Untereinheit 11 der RNA-Polymerase B bzw. der RNA-Polymerase II) stark konserviert, fünf andere Untereinheiten sogar identisch (Hampsey, 1998). Nur die Untereinheiten RPB4, RPB7 und RPB9 sind einzigartig für RNA-Polymerase II. Die größten Untereinheiten, RPB1 und RPB2, bilden das Kernstück des Enzyms, das das aktive Zentrum mit einem Mg^{2+} -Ion und den positiv geladenen Spalt zur Bindung der Matrizen-DNA enthält. Das *jaw*, bestehend aus den Untereinheiten RPB1, RPB5 und RPB9, fixiert die unterhalb des aktiven Zentrums gelegene Matrizen-DNA. Zusätzlich werden die bereits transkribierte DNA

und die neu entstandene RNA von der sogenannten Klammer (*clamp*) festgehalten, die von den Untereinheiten RPB1, RPB2 und RPB6 gebildet wird (Cramer et al., 2000; Cramer et al., 2001). Eine besondere Stellung nehmen die Untereinheiten RPB4 und RPB7 ein, die in der RNA-Polymerase II aus *S. cerevisiae* nur substöchiometrisch vorliegen. Den beiden Untereinheiten wird eine wichtige Rolle in der Stressantwort der Hefe zugeschrieben (Choder und Young, 1993). Die größte Untereinheit der RNA-Polymerase II weist im Gegensatz zu ihren Homologen in den RNA-Polymerasen I und III eine Besonderheit auf, die carboxyterminale Domäne oder CTD (Übersicht in Dahmus, 1996). Diese Domäne besteht je nach Organismus aus 26–27 (Bäckerhefe) bis 52 (Mensch) aufeinander folgenden Wiederholungen der Konsensussequenz Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser und kann stark phosphoryliert werden. Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen zwei Erscheinungsformen der RNA-Polymerase II, der hypophosphorylierten Pol II_A und der hyperphosphorylierten Pol II_O. In *in vitro* Experimenten stellte man fest, dass Pol II_A bevorzugt an den Präinitiationskomplex der Transkription bindet (Lu et al., 1991). Beim Übergang von der Initiation zur Elongation wird dann die hypophosphorylierte CTD von einer Untereinheit des generellen Transkriptionsfaktors TFIID an Ser5 phosphoryliert. Im weiteren Verlauf der Elongation kann der Faktor P-TEFb, bestehend aus CDK9 und einer Cyclin T Isoform, die Transkription durch Phosphorylierung an Ser2 oder auch Ser5 positiv beeinflussen. Weitere CTD-Kinasen sind die Mediatoruntereinheiten CDK8/Cyclin C (Ser2 und Ser5) und c-abl (Tyr1) (Übersicht in Kobor und Greenblatt, 2002). Neben der Elongation reguliert die Phosphorylierung der RNA-Polymerase II auch die Bindung von RNA prozessierenden Proteinen an die CTD und ihre Aktivität (Übersicht in Bentley, 1999; Hirose und Manley, 2000), wodurch Transkription und Prozessierung eng miteinander verknüpft sind. RNA-Polymerase II, die während der Elongation überwiegend als Pol II_O vorliegt, wird vor einer erneuten Transkriptionsrunde von der Phosphatase Fcp1 dephosphoryliert (Cho et al., 1999).

1.1.3 Die generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs)

Für die basale Transkription, d. h. die korrekte Transkription ausgehend von *core* Promotoren in *in vitro* Systemen ohne Aktivatoren, sind neben der RNA-Polymerase II die sogenannten generellen Transkriptionsfaktoren oder Transkriptionsinitiationsfaktoren (GTFs) notwendig (Übersicht in Roeder, 1996; Hampsey, 1998). Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts stellte man fest, dass die exakte Transkription mit gereinigter RNA-Polymerase II von einer DNA-Matrize den Zusatz von Zellextrakt erfordert (Weil et al., 1979). Die Auftrennung von Säugerzellextrakten ermöglichte im Folgenden die Identifizierung der verschiedenen notwendigen Aktivitäten, der GTFs (Matsui et al., 1980). Aufbauend auf *in vitro* Experimenten, bei denen gereinigte Faktoren eingesetzt wurden, entwickelte man ein Modell, das die Reihenfolge beschreibt, in welcher die GTFs an den

Promotor binden, um den Präinitiationskomplex (*preinitiation complex*, PIC) zu bilden (Roeder, 1996; s. Abb. 1.2). Dieser erste Schritt in der Transkription kann durch zahlreiche Aktivatoren, Repressoren und Cofaktoren beeinflusst werden, so dass er ein wichtiger Punkt in der Transkriptionsregulierung ist.

Als erstes bindet der Faktor TFIID an die TATA-Box des Promotors. TFIID ist ein Multiproteinkomplex mit einer Masse von etwa 700 kDa, der aus dem TATA-Box bindenden Protein, TBP, und den TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) besteht. Während TBP alleine für die PIC-Bildung und die basale Transkription ausreicht, werden für die aktivatorabhängige Transkription zusätzlich die TAFs benötigt (Übersicht in Burley und Roeder, 1996). Diese Faktoren üben einerseits Cofaktor-Funktion aus, andererseits sind sie für die PIC-Bildung an TATA-losen Promotoren wichtig (siehe 1.1.4.1). Die zentrale Untereinheit, TBP, hat die Form eines Sattels und bindet mit der konkaven Seite die TATA-Box in der kleinen Rinne (*minor groove*) der DNA (Kim et al., 1993a; Kim et al., 1993b), während die konvexe Seite der Bindung der TAFs und weiterer GTFs dient. Durch die ungewöhnliche Bindung in der kleinen Rinne induziert TBP einen Knick von etwa 100° in der DNA, der möglicherweise der Stabilisierung des PIC dient und Interaktionen von Transkriptionsfaktoren mit dem PIC erleichtert (Burley und Roeder, 1996).

Ein umstrittenes Mitglied der GTFs ist TFIIA. Es ist nicht sicher, inwieweit dieser heterotrimere Faktor zur basalen Transkription benötigt wird (Hampsey, 1998). TFIIA zeigt sowohl Cofaktor- als auch Antirepressoreigenschaften, Funktionen, die auf die verschiedenen Untereinheiten aufgeteilt sind (Ma et al., 1996). Zudem wurde berichtet, dass TFIIA die Bindung von TBP an die TATA-Box stabilisiert (Imbalzano et al., 1994).

Nach der Bindung von TBP assoziiert TFIIB mit dem PIC. Wie TFIIA stabilisiert auch TFIIB die Bindung von TBP an die TATA-Box (Imbalzano et al., 1994) und ist zudem wichtig für die Rekrutierung der RNA-Polymerase II (Buratowski et al., 1989). Darüber hinaus hat TFIIB einen entscheidenden Einfluss auf die korrekte Auswahl des Transkriptionsstarts (Hawkes und Roberts, 1999), wie als erstes in *S. cerevisiae* gezeigt wurde (Pinto et al., 1992).

Zusammen mit RNA-Polymerase II bindet schließlich TFIIF an den PIC. TFIIF hat einige Eigenschaften, die an den bakteriellen σ -Faktor erinnern, nämlich die starke Interaktion mit RNA-Polymerase II, die Unterdrückung unspezifischer Bindung von RNA-Polymerase II an DNA und die Stabilisierung des PIC (Conaway und Conaway, 1993; Hampsey, 1998). Neben seiner Rolle in der Initiation ist TFIIF auch für die Elongation wichtig. Hier wurde gezeigt, dass TFIIF transiente Pausen der Polymerase verhindert (Bengal et al., 1991; Izbán und Luse, 1992).

Zur Vervollständigung des PIC binden zuletzt noch TFIIE und TFIIF an den PIC. Neben seiner Rolle bei der Rekrutierung von TFIIF (Flores et al., 1992) wurde für TFIIE gezeigt, dass es die ATPase- und Kinase-Aktivitäten von TFIIF stimuliert (Lu et al., 1992; Ohkuma und Roeder, 1994). TFIIF ist ein sehr

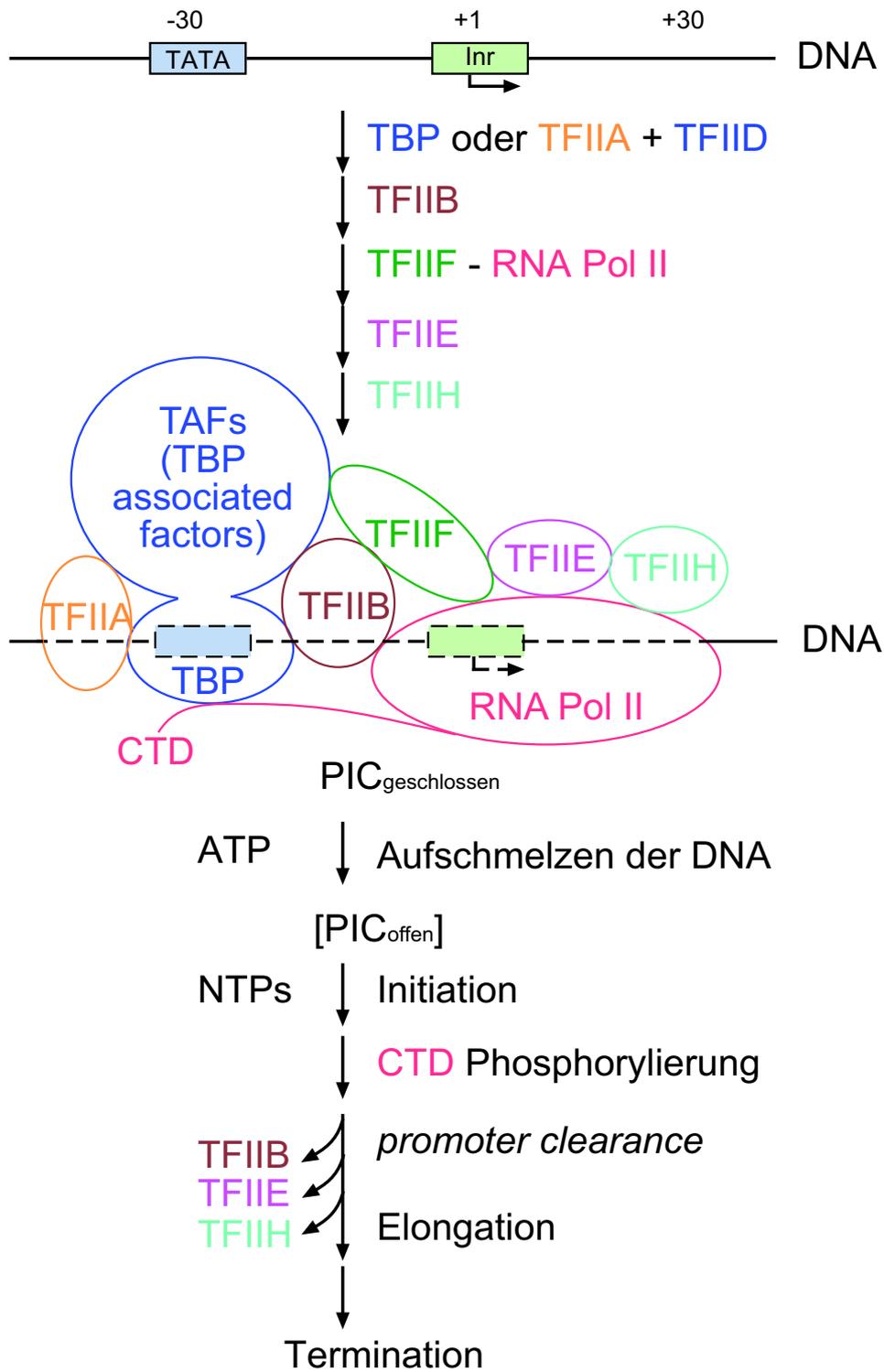


Abbildung 1.2: Modell für die Bildung des Präinitiationskomplexes. Das Modell der PIC-Bildung und nachfolgender Transkriptionsschritte wurde nach Roeder (1996) skizziert.

komplexer Transkriptionsfaktor. In Säugerzellen setzt sich der Multiproteinkomplex aus einem *core* oder Kernkomplex mit sechs Untereinheiten und einem Subkomplex mit drei Untereinheiten zusammen (Übersicht in Svejstrup et al., 1996). Der Subkomplex, auch CAK (*CDK-activating kinase*) genannt, besteht aus CDK7, Cyclin H und MAT1, und ist die CTD phosphorylierende Aktivität von TFIID. Ohne Assoziation an den restlichen TFIID-Komplex ist CAK für die Aktivierung von CDKs (*cyclin-dependent kinases*) wichtig (Übersicht in Harper und Elledge, 1998). Neben der Phosphorylierung der CTD ist TFIID bei der Transkription für das Schmelzen des Promotors (*promoter melting*) (Holstege et al., 1996) und das Räumen des Promotors (*promoter clearance*) (Dvir et al., 1997; Moreland et al., 1999) verantwortlich. Beide Schritte sind von ATP und von der Helikase-Aktivität XPB abhängig (Tirode et al., 1999; Moreland et al., 1999). Durch das Aufschmelzen des Promotors entsteht die sogenannte Transkriptionsblase, ein einzelsträngiger Bereich um den Transkriptionsstart, der als Matrize zur RNA-Polymerisierung dient. Nach der anschließenden Ausbildung der ersten Phosphodiesterbindungen ist die RNA-Polymerase II, wenn sie durch ATP-Entzug in *in vitro* Systemen angehalten wird, meist blockiert (Dvir et al., 1996). Zur Überwindung dieser Blockade der frühen Elongation, d. h. zur *promoter clearance*, wird die Helikase-Aktivität von XPB benötigt.

1.1.4 Transkriptionscofaktoren

In den letzten beiden Abschnitten wurden die Elemente der Transkriptionsmaschine, die RNA-Polymerase II und die GTFs, vorgestellt. Sie ermöglichen zwar basale Transkription, nicht aber durch Aktivatoren stimulierte Transkription. Eine weitere Gruppe von Faktoren, die sogenannten Cofaktoren, werden benötigt, um die Funktion eines sequenzspezifisch bindenden Aktivators oder Repressors an die Transkriptionsmaschine zu übermitteln. Cofaktoren können in drei Gruppen eingeteilt werden: TBP-assoziierte Faktoren (TAFs), generelle Cofaktoren und Mediatorkomplexe (Kaiser und Meisterernst, 1996). Sie sollen im Folgenden kurz erläutert werden und sind in einer Übersichtsskizze (Abb. 1.3) dargestellt. In den letzten Jahren hat darüber hinaus eine weitere Gruppe von Cofaktoren Aufmerksamkeit erregt, nämlich Cofaktoren, die weniger als Adapter zwischen Aktivatoren und der Transkriptionsmaschine dienen, sondern vielmehr die Chromatinstruktur modifizieren. Auf diese Gruppe soll später eingegangen werden (s. 1.1.5).

1.1.4.1 TBP-assoziierte Faktoren (TAFs)

Die erste Gruppe der Cofaktoren, die TAFs, sind Untereinheiten des generellen Transkriptionsfaktors TFIID, der sich aus TBP und 8–12 TAFs zusammensetzt (Albright und Tjian, 2000). TAFs haben Cofaktor- bzw. Coaktivatorfunktion, wirken beim Erkennen des Promotors mit und haben zusätzlich enzymatische Ak-

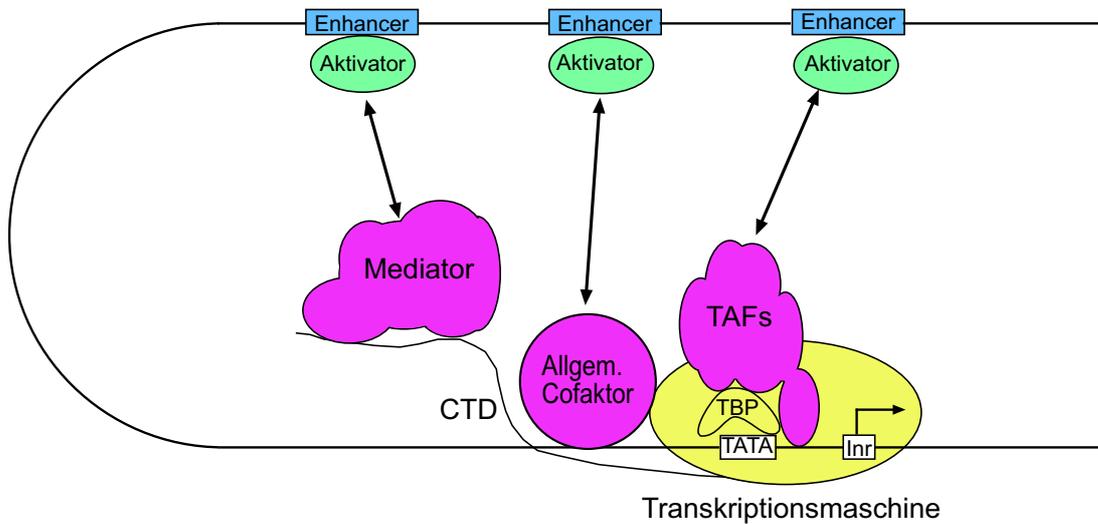


Abbildung 1.3: **Funktion von Cofaktoren.** Die drei Arten von Transkriptionscofaktoren wirken als „Brückenmoleküle“ zwischen der basalen Transkriptionsmaschine und den Transkriptionsaktivatoren.

aktivitäten. Für eine Reihe von TAFs wurde eine direkte Wechselwirkung mit spezifischen Transkriptionsaktivatoren entdeckt (Burley und Roeder, 1996, und Referenzen dort), was ihre Rolle als Coaktivatoren bestätigt. Man denkt, dass TFIID mit Hilfe von Aktivatoren verstärkt an den Promotor rekrutiert wird und dadurch die Transkriptionsaktivität zunimmt. Allerdings sind die Zusammenhänge aufgrund der anderen Funktionen und Aktivitäten von TAFs wohl komplizierter. TAF1¹, der größte TAF, besitzt in Metazoen Histonacetyltransferase(HAT)-, Serinkinase- und Ubiquitinligaseaktivität (Mizzen et al., 1996; Dikstein et al., 1996; Pham und Sauer, 2000). Die HAT-Aktivität, die auch in Hefe gefunden wurde, ist spezifisch für das Lysin 14 von Histon 3 sowie für TFIIE (Mizzen et al., 1996; Imhof et al., 1997). Möglicherweise stimuliert die Acetylierung der Histonen durch TAF1 die Transkription, indem sie den Zugang von TFIID an chromatinverpackte Promotoren erleichtert (siehe auch 1.1.5). Als Substrat der Kinase-Aktivität wurde bislang nur die große Untereinheit von TFIIF, RAP74, identifiziert, als Substrat der Ubiquitinligase Histon H1. TAF2 zeichnet sich durch spezifische DNA-Bindung im Bereich des *initiators* aus (Verrijzer et al., 1994), während man annimmt, dass TAF6 und TAF9 das DPE im *core* Promotor binden (Burke und Kadonaga, 1997). Wahrscheinlich wird das Erkennen des Promotors durch die kooperative Bindung mehrerer TFIID-Untereinheiten verstärkt (Albright und Tjian, 2000). Einige TAFs wurden nicht nur als Untereinheiten von TFIID, sondern auch von den HAT-Komplexen SAGA in Hefe und PCAF und TFTC in Säugern entdeckt. Dies lässt darauf schließen, dass sie auch außerhalb

¹Die TAFs werden hier entsprechend der neuen Nomenklatur bezeichnet (Tora, 2002).

von TFIID eine Rolle in der Transkription spielen (Grant et al., 1998; Ogryzko et al., 1998; Wieczorek et al., 1998). Darüber hinaus fand man gewebespezifische TAFs in *D. melanogaster* und in Säugern, die kritisch für die Regulation bestimmter Genexpressionsprogramme und Entwicklungsprozesse sind (Übersicht in Verrijzer, 2001). TFIID scheint also je nach Gewebe oder Entwicklungsabschnitt auch mit unterschiedlichen TAF-Repertoires zu wechselwirken.

1.1.4.2 Generelle Transkriptionscofaktoren

Die Gruppe der generellen Cofaktoren wurde 1991 in einer Fraktion aus Säugerkernextrakten, USA (*upstream factor stimulatory activity*), entdeckt (Meisterernst et al., 1991). Man stellte fest, dass die aktivatorabhängige Transkription in *in vitro* Systemen (mit gereinigten GTFs und RNA-Polymerase II) nicht so gut stimuliert werden kann wie in weniger aufgereinigten Systemen. Als fehlendes Element erwies sich die USA, aus der in der Folgezeit einige Cofaktoren isoliert werden konnten. Man unterschied zunächst zwischen positiven (PCs) und negativen Cofaktoren (NCs), wobei diese Unterscheidung nach der Wirkungsweise nicht mehr so eindeutig ist und inzwischen auch andere Proteine zu den generellen Cofaktoren zählen.

In der Gruppe der positiven Cofaktoren findet man PC1, später als PARP identifiziert, PC2, PC3 bzw. Topoisomerase I, PC4, PC5 und PC6. Diese Aktivitäten sind bis heute unterschiedlich gut charakterisiert und identifiziert (Übersicht in Kaiser und Meisterernst, 1996). PC2 fällt in die Gruppe der Mediator Komplexe (Kretzschmar et al., 1994; Malik et al., 2000; siehe 1.1.4.3). Für PC3 wurde sowohl eine reprimierende Funktion bei der basalen Transkription als auch eine stimulierende bei der aktivatorabhängigen Transkription entdeckt (Kretzschmar et al., 1993). Über den Cofaktor PC4, der über die Phosphorylierung durch Caseinkinase II reguliert wird, ist am meisten bekannt. In der unphosphorylierten Form stimuliert er die aktivatorabhängige Transkription während der TFIIA-TFIID-Komplexbildung mit DNA. Daneben kann sowohl die unphosphorylierte als auch die phosphorylierte Form an geschmolzene, einzelsträngige Promotor-DNA binden und dadurch die Transkription reprimieren (Kaiser et al., 1995; Werten et al., 1998). Dieser reprimierenden Aktivität kann TFIIH entgegenwirken.

Die negativen Cofaktoren umfassen NC1 und NC2. Man weiß, dass NC1 die basale Transkription reprimiert, indem es an den TFIID-DNA-Komplex bindet. Diese Bindung kann durch TFIIA kompetitiert werden (Meisterernst et al., 1991). Auch das Heterodimer NC2 bindet an den TFIID-DNA-Komplex und inhibiert so die Bindung von TFIIB und die weitere PIC-Bildung (Goppelt et al., 1996). Umstritten ist im Augenblick das Modell, nach dem NC2 auch positive Cofaktorfunktion haben soll (Geisberg et al., 2001; Willy et al., 2000). Unter den Cofaktoren mit Repressorfunktion findet man außerdem HMG1 (*high mobility group*), HMG2 und Ada1/Mot (Kaiser und Meisterernst, 1996).

1.1.4.3 Mediatorkomplexe

Als letzte der drei Cofaktorgruppen sollen die Mediatorkomplexe vorgestellt werden. Hinweise auf Aktivitäten, die zwischen sequenzspezifischen Transkriptionsaktivatoren und der basalen Transkriptionsmaschine vermitteln, fand man zunächst in Extrakten aus *S. cerevisiae* und dann auch in Extrakten aus menschlichen Zelllinien (Übersicht in Myers und Kornberg, 2000). Aus Hefe wurde der Mediator schließlich als Teil eines RNA-Polymerase II Holoenzym aufgereinigt (Thompson et al., 1993; Koleske und Young, 1994; Kim et al., 1994). In menschlichen Zelllinien fand man eine Reihe Komplexe, die homolog zum Hefe-Mediator sind, deren Zusammensetzung sich aber bezüglich einzelner Untereinheiten unterscheidet (Übersicht in Rachez und Freedman, 2001). Die Heterogenität der humanen Mediatorkomplexe beruht möglicherweise auf der Existenz von Subkomplexen und/oder auf der Existenz zellspezifischer Untereinheiten (Myers und Kornberg, 2000).

Vor wenigen Jahren wurde die Struktur von freien und an RNA-Polymerase II gebundenen Mediatorkomplexen mittels Elektronenmikroskopie analysiert (Asturias et al., 1999; Dotson et al., 2000). Obwohl die Untereinheiten der Mediatorkomplexe aus Hefe, Maus und Mensch nur zum Teil homolog sind, ist die Struktur der Komplexe sehr ähnlich (Dotson et al., 2000). Im gebundenen Zustand sind die drei Domänen des Mediators, der Kopf, der Mittelteil und der Schwanz, linear angeordnet. Neben dem Gal11-, dem Med9/10- und dem Srb4-Modul, die diesen Domänen entsprechen, können der Hefe-Mediator und humane Mediatorkomplexe das Srb10-Modul enthalten (Übersicht in Boube et al., 2002). Diesem Subkomplex, der unter anderem Cdk8 (Srb10) und Cyclin C (Srb11) enthält, werden reprimierende Eigenschaften zugeschrieben (Hengartner et al., 1998).

Die Hauptaufgabe des Mediators ist die Brückenfunktion zwischen Transkriptionsaktivatoren und der Transkriptionsmaschine – insbesondere der RNA-Polymerase II. Kim und Kollegen zeigten, dass der Hefe-Mediator sowohl die basale als auch die aktivatorabhängige Transkription stimuliert. Daneben verstärkt er die CTD-Kinaseaktivität von TFIIF *in vitro* (Kim et al., 1994). Zusätzlich zur Funktion eines Coaktivators spielt der Hefe-Mediator auch eine Rolle bei der Reinitiation der Transkription (Yudkovsky et al., 2000). In humanen Zellen fand man ebenfalls eine allgemeine Aufgabe des Mediators. Mittler und Kollegen entdeckten, dass die Präsenz des sogenannten B-Mediators, eines definierten Mediatorkomplexes, für die basale Transkription in Zellextrakten *in vitro* unbedingt notwendig ist (Mittler et al., 2001).

1.1.5 Chromatin modifizierende Cofaktoren

1.1.5.1 Chromatin als Transkriptionsregulator – Histonmodifikationen

Bisher wurde ein wichtiger Aspekt der Transkriptionsregulation vernachlässigt, das Chromatin. In eukaryontischen Zellen liegt die DNA im Zellkern als kom-

pakte, verdichtete Struktur, das sogenannte Chromatin, vor. Die kleinste Einheit des Chromatins bilden Nucleosomen, deren Struktur im Detail 1997 aufgeklärt werden konnte (Luger et al., 1997). In ihnen ist ein etwa 146 bp langer Teil des DNA-Strangs 1,65 mal um ein Histonoctamer gewunden. Ein Histonoctamer setzt sich aus einem Tetramer der Histone H3 und H4 und zwei daran bindenden Dimeren der Histone H2A und H2B zusammen. Dieses Element tritt etwa alle 200 ± 40 bp auf (McGhee und Felsenfeld, 1980). Zwischen den Nucleosomen bindet das Linker-Histon H1 an die DNA und verdichtet die Struktur zusätzlich. Auch andere Nichthiston-Proteine, wie z. B. HMG- oder SIR-Proteine, erzeugen eine kompakte, übergeordnete Struktur (Näär et al., 2001).

Die zentralen Proteine des Chromatins, die *core* oder Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4, sind in Eukaryonten stark konserviert und bestehen aus einer globulären Domäne und einem N-terminalen, unstrukturierten Schwanz. Schon in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckten Allfrey und Kollegen, dass Histone posttranslational modifiziert (acetyliert und methyliert) werden und dass ihre transkriptionsreprimierende Aktivität durch Acetylierung abgeschwächt wird (Allfrey et al., 1964). Der zentralen Rolle der Histone und ihrer Modifikationen in der Transkriptionsregulation wurde allerdings erst Beachtung geschenkt, als die Histon modifizierenden Aktivitäten einiger Transkriptionscofaktoren entdeckt wurden (Bannister und Kouzarides, 1996; Brownell et al., 1996; Ogryzko et al., 1996). Man weiß heute, dass besonders die N-terminalen Schwänze der Histone durch Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung modifiziert werden (Übersicht in Berger, 2002; s. Abb. 1.4). Weniger untersuchte Modifikationen sind Ubiquitinierung und ADP-Ribosylierung.

Da DNA im Chromatin sehr kompakt und unzugänglich vorliegt, stellt sich die Frage, wie Transkriptions-, Replikations- und Reparaturproteine Zugang zu ihren Zielsequenzen erlangen. Die Modifikation der N-terminalen, freiliegenden Histonchwänze bietet eine Lösungsmöglichkeit. Lange vermutete man, dass die Acetylierung von Histonen die Ladung dieser stark basischen Proteine neutralisiert und dadurch die DNA-Histon-Wechselwirkungen abschwächt und die DNA zugänglicher macht. Dieses Modell wurde jedoch verfeinert, als man entdeckte, dass ein Teil des N-terminalen H4-Schwanzes mit einem benachbarten Nucleosom interagiert. Diese Interaktion begünstigt eine übergeordnete Chromatinstruktur. Die Acetylierung des H4-N-Terminus stört die Wechselwirkung und schwächt damit die übergeordnete Struktur (Luger und Richmond, 1998).

Ein noch komplexeres Modell der Wirkungsweise von Histonmodifikationen bietet der sogenannte Histon-Code (Strahl und Allis, 2000; Jenuwein und Allis, 2001). In diesem Modell sind Histonmodifikationen Erkennungsmerkmale für Proteine, die einen aktiven oder reprimierten Zustand bestimmter Chromatinregionen herbeiführen, beibehalten und bei der Zellteilung weitergeben können. Verschiedene Histonmodifikationen verstärken einander, während sich andere gegenseitig ausschließen. Die Kombination verschiedener Histonmodifikationen erzeugt eine Bindungsplattform für Proteine, die die Chromatinstruktur verändern oder in

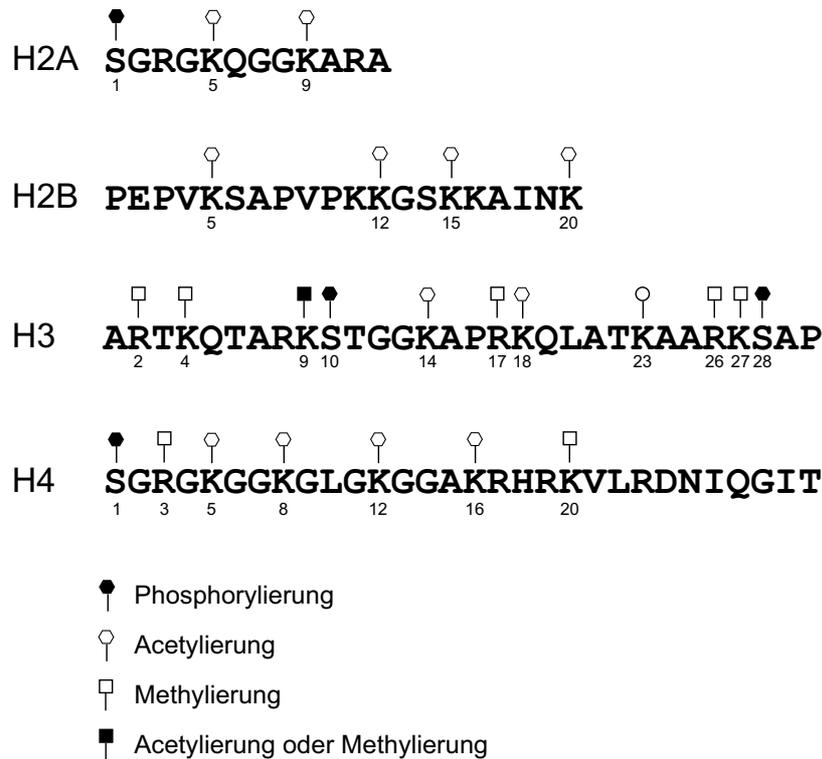


Abbildung 1.4: **Modifikationen der N-Termini von Histonen.** Die Modifikationen der N-terminalen Histonschwänze wurden den Veröffentlichungen von Zhang und Reinberg (2001) und Jaskelioff und Peterson (2003) entnommen.

einem bestimmten Zustand „einfrieren“ können. Beispiele für Domänen, die spezifisch an Histonmodifikationen binden können, sind die Bromodomäne, die an acetylierte Lysine bindet (Dhalluin et al., 1999), und die Chromodomäne, die mit dem methylierten Lysin 9 auf Histon H3 (H3 K9)² interagiert (Bannister et al., 2001). Entsprechend dem Histon-Code kann man Histonmodifikationen bestimmte Zustände des Chromatins zuordnen. Die Acetylierung der H3- und H4-Schwänze entspricht im Allgemeinen aktiv transkribierten Regionen. Die Acetylierung breiter Bereiche kennzeichnet transkriptionskompetente Bereiche des Genoms, während speziell die Acetylierung von Promotor- und Enhancersequenzen mit Transkriptionsaktivierung in Verbindung gebracht wird (Eberharter und Becker, 2002). Die Phosphorylierung von H3 S10 ist sowohl für die Kondensierung der Chromosomen während der Mitose als auch für die Induktion von sehr frühen Genen notwendig (Berger, 2002). Genauso wie Phosphorylierung ist auch Methylierung in unterschiedlichen Zuständen zu finden. Methylierung von H3 K9 ist ein typisches Kennzeichen für transkriptionell inaktives Heterochromatin (Lachner et

²Im Folgenden werden spezifische Aminosäurereste auf Histonen mit der Nennung des Histons in Kurzform (z. B. H3), der Aminosäure im Einbuchstaben-Code und der Position der Aminosäure abgekürzt. Für Lysin 9 auf Histon H3 steht also H3 K9.

al., 2001), während die Methylierung von H3 K4 eher mit aktiven Genen in Verbindung gebracht wird (Strahl et al., 1999; Santos-Rosa et al., 2002). Ebenso tritt die Methylierung von Argininen typischerweise im Zusammenhang mit Transkriptionsaktivierung auf (Kouzarides, 2002). Obwohl inzwischen vielen Histonmodifikationen eine Bedeutung bezüglich des Chromatinzustandes zugewiesen werden kann, ist der Histon-Code auch heute kaum entschlüsselt.

1.1.5.2 Histon modifizierende Enzyme

Histonacetyltransferasen (HATs)

Die Erforschung der Histonacetyltransferasen und ihrer Rolle in der Transkriptionsregulation begann mit der Entdeckung, dass der Transkriptionscofaktor Gcn5p aus *S. cerevisiae* HAT-Aktivität besitzt (Brownell et al., 1996). In den folgenden Jahren wurde zahlreichen weiteren Transkriptionsfaktoren HAT-Aktivität zugeschrieben, so dass es heute eine große Gruppe dieser Enzyme gibt, die in mehrere Familien eingeteilt werden (Übersicht in Marmorstein, 2001). Neben den nukleären TypA HATs, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird, gibt es die cytoplasmatischen TypB HATs, die die Histone vor dem Zusammenbau der Nucleosomen acetylieren (Grunstein, 1997).

Die Prototyp-Familie umfasst Gcn5 und PCAF, die als Transkriptionscoaktivatoren spezieller Aktivatoren funktionieren. Sie besitzen neben der HAT-Domäne auch eine Bromodomäne, die acetyliertes Lysin bindet (Dhalluin et al., 1999). Auch die Mitglieder der CBP/p300-Familie weisen diese Domänen auf, wenn auch in unterschiedlicher Anordnung. CBP und p300 sind globale Transkriptionscoaktivatoren, die in zahlreichen physiologischen Prozessen wie Zellzyklus, Differenzierung, Apoptose und Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielen (Übersicht in Chan und La Thangue, 2001). Ihre Funktion als Transkriptionscoaktivatoren kann durch verschiedene Mechanismen erklärt werden. Einmal dienen CBP und p300 als Brückenmoleküle, die Transkriptionsaktivatoren mit der basalen Transkriptionsmaschine verbinden. Zusätzlich bilden sie eine Interaktionsplattform für viele weitere Cofaktoren, so dass sie zahlreiche Signale integrieren können. Schließlich beeinflusst ihre HAT-Aktivität die Transkription, erstens durch die Acetylierung von Histonschwänzen und zweitens durch die Acetylierung anderer Transkriptionsfaktoren. CBP und p300 können selbst durch posttranslationale Modifikationen wie Methylierung und Phosphorylierung reguliert werden (Xu et al., 2001; Chevillard-Briet et al., 2002; Übersicht in Chan und La Thangue, 2001). In der relativ neuen MYST-Familie findet man sowohl Transkriptionscoaktivatoren als auch Faktoren, die Transkriptionsrepression regulieren. Eine Besonderheit vieler Mitglieder der MYST-Familie ist eine N-terminale Chromodomäne, die speziell im Fall von MOF mit RNA-Bindung in Zusammenhang gebracht wurde (Akhtar et al., 2000). Weitere Vertreter von HAT-Familien sind TAF1, der vielfältige Enzymaktivitäten auf sich vereinigt (siehe 1.1.4.1), und ATF-2, die einzige bekannte HAT, die spezifisch an DNA bindet.

Die meisten Histonacetyltransferasen sind Untereinheiten von Multiproteinkomplexen, deren andere Untereinheiten die Spezifität der HAT beeinflussen können (Kouzarides, 1999). Zum Beispiel verstärkt die Einbindung von Gcn5p in den Ada- oder in den SAGA-Komplex seine Fähigkeit, nucleosomale Histone zu acetylieren, und erweitert seine Substratspezifität innerhalb des Histons H3 (Grant et al., 1997; Grant et al., 1999). Daneben können HATs auch untereinander wechselwirken, wie z. B. CBP, das PCAF und SRC-1 binden und dadurch verschiedene HAT-Spezifitäten kombinieren kann (Kouzarides, 1999).

Histondeacetylasen (HDACs)

Genauso wie bei den HATs nimmt die Anzahl ihrer „Gegenspieler“, der HDACs, seit ihrer Entdeckung im letzten Jahrzehnt ständig zu. Im Augenblick unterscheidet man drei Klassen von HDACs, basierend auf der Homologie zu den in *S. cerevisiae* identifizierten Genen (Übersicht in Marks et al., 2001; Grozinger und Schreiber, 2002). Zur Klasse I, die zu Rpd3 homolog ist, gehören die humanen Enzyme HDAC1 bis HDAC3 und HDAC8. HDAC4 bis HDAC7 und HDAC9 finden sich in der Klasse II wieder, die durch das Hefeenzym Hda1 begründet wird. Die HDACs beider Klassen sind Untereinheiten von Multiproteinkomplexen, die mit Hilfe von Repressoren und Corepressoren an die entsprechenden Gene rekrutiert werden. Ihre Aktivität kann durch Trichostatin A inhibiert werden. Mitglieder der Klasse III sind zu Sir2 homolog, und ihre enzymatische Aktivität ist vom Coenzym NAD⁺ abhängig (Übersicht in Denu, 2003). In *S. cerevisiae* spielen Sir-Proteine bei der Transkriptionsrepression an den Telomeren, am *mating-type* Locus und den rDNA-Genen eine Rolle.

Ein wichtiger Komplex in Säugern ist der Sin3 Komplex, dessen enzymatische Aktivitäten HDAC1 und HDAC2 sind (Ng und Bird, 2000). Er wird z. B. durch die Corepressoren SMRT oder NCoR an nukleäre Hormonrezeptoren ohne Liganden gebunden und reprimiert die Transkription. Der NuRD-Komplex enthält neben HDAC1 und HDAC2 die ATPase-Untereinheit Mi-2, durch die er zum *chromatin remodeling* Komplex wird (Xue et al., 1998; Zhang et al., 1998; s. a. 1.1.5.3). Vor kurzem wurde ein neuer Komplex aus Säugerzellen identifiziert, der zugleich HATs und HDACs enthält (Yamagoe et al., 2003).

Histonmethyltransferasen (HMTasen)

Die SET-Familie Histone können an Lysin- und an Arginin-Resten methyliert werden. Seit der Entdeckung der ersten Lysin-Methyltransferase SUV39H1 (Rea et al., 2000) wurden mit großer Geschwindigkeit zahlreiche Histonmethyltransferasen in vielen Organismen identifiziert. Die lysinspezifischen Methyltransferasen tragen alle, bis auf eine Ausnahme (Feng et al., 2002), die konservierte SET-Domäne, die das Merkmal der SET-Familie ist. Sie regulieren Transkriptionsrepression bzw. -aktivierung (Übersicht in Lachner und Jenuwein, 2002).

Der Prototyp für SET-Proteine, SUV39H1 aus Mensch, und seine Homologen aus Maus und *S. pombe* wurden als H3 K9-spezifische HMTasen entdeckt (Rea et al., 2000). Diese Modifikation ist eine Bindungsstelle für HP1 (*heterochromatin binding protein 1*) und ermöglicht somit die Einführung und Verbreitung von Heterochromatin (Jenuwein, 2001). Man findet H3 K9-Methylierung jedoch auch in euchromatischen Bereichen, wo SUV39H1, im Komplex mit HP1, von Rb zur Repression von Genen rekrutiert wird, die den Zellzyklus kontrollieren (Nielsen et al., 2001). Neben SUV39H1 haben auch G9a aus Mensch und ASH1 aus *D. melanogaster* H3 K9-Methyltransferase-Aktivität. Ihre Spezifität ist bei G9a auf H3 K27 und bei ASH1 auf H3 K4 und H4 K20 erweitert (Tachibana et al., 2001; Beisel et al., 2002). Da ASH1 eine Rolle bei der Erhaltung aktiv transkribierter Regionen zugeschrieben wird, steht methyliertes H3 K9 in Verbindung mit anderen Modifikationen möglicherweise auch mit Transkriptionsaktivierung in Zusammenhang. Auch H3 K4-Methylierung wurde sowohl als Merkmal für aktives wie auch für reprimiertes Chromatin beschrieben. In *S. cerevisiae* stellten Briggs und Kollegen fest, dass H3 K4-Methylierung wichtig für die Repression von rDNA-Genen ist (Briggs et al., 2001). Inzwischen gibt es jedoch einige Studien in Hefen und in Metazoen, die in H3 K4-Methylierung ein Merkmal für aktiv transkribiertes oder zumindest transkriptionskompetentes Chromatin sehen (Noma et al., 2001; Santos-Rosa et al., 2002; Strahl et al., 1999; Litt et al., 2001). In Hefe ist Set1 für die H3 K4-Methylierung zuständig, während man im Menschen Set7/Set9 identifiziert hat. Unter anderem fand man in Säugerzellen noch die H4 K20-spezifische HMTase SET8/PR-Set7 und in *S. cerevisiae* Dot1, das H3 K79 methyliert und keine SET-Domäne besitzt (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b; Feng et al., 2002).

Lysin-Methylierung gilt als äußerst stabile Histonmodifikation, da bis heute keine Demethylase gefunden wurde. Da Lysin-Methylierung jedoch nicht nur in konstitutivem Heterochromatin sondern auch bei der transienten Transkriptionsregulation eine Rolle spielt, ist die Existenz von Demethylasen nicht unwahrscheinlich. Methylierte Histone können neben dem „Ausdünnen“ durch die Replikation auch über den Ersatz durch nichtmodifizierte Histone außerhalb des Zellzyklus oder durch proteolytische Degradation der Histonschwänze entfernt werden (Bannister et al., 2002).

Die PRMT-Familie Die Methylierung von Proteinen an Argininresten wird von der PRMT-Familie katalysiert. Bisher sind in Säugern sechs Mitglieder bekannt (Frankel et al., 2002), die alle eine konservierte, enzymatisch aktive Domäne tragen und entsprechend ihrem Produkt in zwei Klassen aufgeteilt werden (Übersicht in Zhang und Reinberg, 2001; Kouzarides, 2002). PRMTs der Klasse I können Monomethyl- und asymmetrisches Dimethylarginin katalysieren, während das Produkt des einzigen Klasse-II-Vertreters, PRMT5, Monomethyl- und symmetrisches Dimethylarginin ist.

Als Substrat wurden bisher vor allem RNA bindende Proteine für die Klasse I und MBP (*myelin basic protein*) für die Klasse II gefunden, während Histone nur von PRMT1, PRMT4/CARM1 und PRMT5/JBP1 methyliert werden (Übersicht in Zhang und Reinberg, 2001; Kouzarides, 2002). Für PRMT5, das die Histone H4 und H2A methyliert, wurde vor kurzem eine Rolle bei der Repression des Cyclin E1-Promotors entdeckt (Fabbrizio et al., 2002). CARM1 methyliert die Arginine 2, 17 und 26 auf Histon H3. In seiner Funktion als Coaktivator von nukleären Hormonrezeptoren wird es von p160 rekrutiert. Wahrscheinlich liegt die Coaktivatorfunktion in der Methyltransferase-Aktivität von CARM1, da methyliertes H3 R17 nur an aktiven Promotoren entdeckt wurde (Ma et al., 2001; Bauer et al., 2002). Auch PRMT1 kann als Transkriptionscoaktivator für nukleäre Hormonrezeptoren dienen, wobei es im Gegensatz zu CARM1 die Methylierung von H4 R3 katalysiert. Diese Methylierung begünstigt die Transkriptionsaktivierung wohl dadurch, dass sie die folgende Acetylierung durch p300 erleichtert (Wang et al., 2001b). Daneben spielt PRMT1 im Interferon-Signalweg eine Rolle, wo es STAT1 methyliert und dadurch dessen Funktion als Transkriptionsaktivator verstärkt (Mowen et al., 2001). Schließlich scheint PRMT1 auch die Prozessierung und den Transport von mRNAs zu beeinflussen, da zahlreiche RNA bindende Proteine aus diesen Prozessen durch das Enzym methyliert werden. In *S. cerevisiae* stellte man fest, dass das PRMT1-Homolog Hmt1 für den Kernexport der mRNA bindenden Proteine Npl3p und Hrp1p wichtig ist (Shen et al., 1998). Die Ergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass Arginin-Methyltransferasen die Expression von Genen auf verschiedenen Ebenen sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell beeinflussen können.

1.1.5.3 ATP-abhängige *chromatin remodeling* Komplexe

Die kompakte Struktur des Chromatins kann zum einen durch die Modifikation der Histonschwänze (siehe 1.1.5.1), zum anderen auch durch die Aktivität ATP-abhängiger *chromatin remodeling* Komplexe verändert werden. Diese Enzyme verändern die Position von Nucleosomen, stören Wechselwirkungen zwischen DNA und Histonen und destabilisieren möglicherweise die übergeordnete Chromatinstruktur (Peterson, 2002). *Chromatin remodeling* Komplexe können entsprechend ihrer ATPase-Untereinheit in drei Hauptgruppen eingeteilt werden, die SWI/SNF-, die ISWI- und die Mi-2/CHD-Gruppe. Daneben gibt es neuere Vertreter, wie den INO80-Komplex und den Cockayne Syndrom B Faktor, die bislang weniger gut untersucht sind (Übersicht in Becker und Hörz, 2002; Peterson, 2002; Tsukiyama, 2002).

SWI/SNF-Komplexe spielen meist in der Transkriptionsaktivierung eine Rolle, wobei inzwischen in Hefe und in menschlichen Zellen auch Beweise für Repressorfunktion gefunden wurden (Übersicht in Martens und Winston, 2003). Diese doppelte Funktion kann durch zwei Mechanismen erklärt werden. Entweder kann SWI/SNF die Chromatinstruktur sowohl zugänglich machen als auch „schlie-

ßen“. Oder aber der Komplex „öffnet“ das Chromatin immer, aber es binden je nach Situation Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren (Tsukiyama, 2002). In menschlichen Zellen existieren mindestens zwei unterschiedliche SWI/SNF-Komplexe, die jeweils eine der homologen ATPase-Untereinheiten, hBrm oder Brg1, enthalten (Wang et al., 1996). In Übereinstimmung mit ihrer reprimierenden Funktion können SWI/SNF-Komplexe aus Menschen auch mit dem Transkriptionscorepressor mSin3A wechselwirken (Sif et al., 2001). In Säugern scheinen diese *chromatin remodeling* Faktoren eine wichtige Rolle als Tumorsuppressoren und in frühen Entwicklungsstadien zu spielen (Dunaief et al., 1994; Bultman et al., 2000). Daneben wurde gezeigt, dass SWI/SNF-Komplexe in Säugern die Entwicklung von T-Zellen in die Subtypen CD4⁺ und CD8⁺ regulieren (Chi et al., 2002). Die ATPase-Untereinheit der SWI/SNF-Komplexe zeichnet sich durch eine Bromodomäne aus (siehe 1.1.5.1). Möglicherweise wird durch sie die Bindung von SWI/SNF an acetyliertes Chromatin stabilisiert (Agalioti et al., 2000).

Die ATPasen der ISWI-Komplexe dagegen besitzen eine SANT-Domäne. Diese Domäne könnte der Interaktion mit N-terminalen Histonschwänzen und/oder mit anderen Proteinen dienen (Boyer et al., 2002; Sterner et al., 2002). Die Komplexe der ISWI-Gruppe wurden vor allem mit Transkriptionsrepression in Verbindung gebracht. Daneben scheinen sie eine Art Grundzustand des Chromatins aufrecht zu erhalten (Varga-Weisz, 2001). Auch für die Mi-2/CHD-Gruppe der *chromatin remodeling* Faktoren nimmt man eine Funktion in der Transkriptionsrepression an, was durch die Beobachtung gestützt wird, dass Mi-2 im Komplex mit HDACs auftritt (Tong et al., 1998; Xue et al., 1998; Zhang et al., 1998; s. a. 1.1.5.2). Allerdings ist Chd1 aus *D. melanogaster* in aktiven Chromatinregionen lokalisiert, wodurch wiederum eine Rolle der CHD-Gruppe in der Transkriptionsaktivierung impliziert wird (Stokes et al., 1996). Die ATPasen der Mi-2/CHD-Gruppe enthalten eine Chromodomäne (siehe 1.1.5.1). Bisher wurde jedoch keine spezifische Bindung an methylierte Lysine auf Histonen beobachtet. Vielmehr verhindert die Methylierung von H3 K4 die Bindung des NuRD-Komplexes (Zegermann et al., 2002).

Die Frage, wie *chromatin remodeling* Komplexe an ihr Ziel gebracht werden, hat zur Entdeckung mehrerer möglicher Mechanismen geführt (Übersicht in Becker und Hörz, 2002). In vielen Fällen werden die Komplexe mit Hilfe von promotor-spezifischen, DNA bindenden Proteinen rekrutiert. Auch Faktoren, die methylierte DNA binden, können diese Aufgabe übernehmen. Durch actinverwandte Proteine, die in den Komplexen teilweise enthalten sind, werden die *chromatin remodeling* Faktoren wahrscheinlich am Zellkerngerüst angereichert. Es ist offensichtlich, dass der Prozess des *chromatin remodeling*, der einen wichtigen Teil der Transkriptionsregulation darstellt, schon auf der Stufe der Rekrutierung vielfältig kontrolliert wird.

1.2 Primäre T-Zellen als Modellsystem für Transkriptionsaktivierung

1.2.1 T-Zellen

Zur Abwehr von Krankheitserregern haben sich in der Entwicklung zwei Arten der Immunabwehr herausgebildet, die angeborene und die adaptive Immunabwehr. Die adaptive Immunabwehr, eine spezifische Antwort auf das Eindringen von bestimmten Erregern, basiert zum großen Teil auf den Lymphozyten. B- und T-Lymphozyten können mit Hilfe ihrer Antigenrezeptoren Krankheitserreger erkennen und zu sogenannten Effektorzellen differenzieren, die mit Hilfe verschiedener Mechanismen Erreger bekämpfen (Übersicht in Janeway und Travers, 1995).

B- und T-Zellen gehen aus den gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen hervor, die wiederum aus den hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks entstehen. B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark weiter, während die Entwicklung der unreifen Thymozyten zu reifen T-Lymphozyten im Thymus stattfindet. Zunächst durchlaufen die Thymozyten eine Phase starker Proliferation. Dabei werden die Gene für den T-Zellrezeptor (TCR), der sich aus der α - und der β -Kette zusammensetzt, umgelagert. T-Zellen erlangen ihr enormes Repertoire an unterschiedlichen TCRs vor allem durch die Umordnung ihrer TCR-Gene. Das Gen jeder Kette setzt sich aus wiederholten variablen Einheiten zusammen, die während der Entwicklung rekombiniert werden. Die fertig umgeordneten Gene ergeben durch die Kombination der α - und der β -Kette etwa 10^6 unterschiedliche TCRs. Mit der Umordnung der β -Kette beginnt die Expression der CD4- und CD8-Oberflächenmoleküle. Sie sind in späteren Entwicklungsstufen kennzeichnend für die jeweilige T-Zelllinie, aber in dieser Stufe gleichzeitig auf der Membran präsent. Wenn schließlich funktionelle TCRs auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert werden, durchlaufen die Zellen die positive und die negative Selektion. Bei der positiven Selektion sterben diejenigen Zellen ab, die eigene MHC-Komplexe nicht erkennen. Die MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) dienen in den Antigen präsentierenden Zellen (APC, *antigen presenting cell*) der Bindung der Antigene und wechselwirken als MHC-Peptid-Komplex mit dem TCR. Die Erkennung der körpereigenen MHC-Moleküle ist die Grundvoraussetzung für die Aktivierung einer T-Zelle durch APCs. Bei der negativen Selektion sterben Zellen, die körpereigene Antigene erkennen und dadurch Autoimmunreaktionen auslösen könnten. Nach der Selektion wird die Expression eines der beiden Oberflächenmoleküle CD4 oder CD8 beendet. Die T-Zellen sind nun reife, ruhende Lymphozyten, die sich im Blut- und Lymphkreislauf befinden (Übersicht in Janeway und Travers, 1995).

T-Zellen werden aktiviert, wenn ihre Rezeptoren in den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, Mandeln, Peyersche Plaques) von APCs

gebundene Antigene erkennen. Sie bleiben in diesen Organen zurück und durchlaufen einen umfangreichen Aktivierungsprozess (siehe 1.2.2), der letztendlich zur Differenzierung in verschiedene Effektorzellen führt. Man unterscheidet T-Lymphozyten zunächst nach dem exprimierten Corezeptormolekül CD4 oder CD8. CD8⁺ T-Zellen werden zu cytotoxischen Zellen, die in virusinfizierten Zellen Apoptose auslösen. CD4⁺ Zellen entwickeln sich je nach Cytokin-Umgebung zu T_H1- oder T_H2-Effektorzellen. Die inflammatorischen T_H1-Zellen aktivieren Makrophagen, damit diese intrazelluläre Erreger vernichten können. T_H2-Helferzellen wiederum induzieren die Differenzierung und Antikörperproduktion von B-Zellen, so dass extrazelluläre Mikroorganismen zerstört werden (Übersicht in Janeway und Travers, 1995). Daneben gibt es noch sogenannte Suppressor-T-Zellen, die die Marker CD4 und CD25 tragen und die Aktivierung von naiven, also ungeprägten, CD4⁺ T-Zellen unterdrücken (Taams et al., 2001). Außerdem können sich aktivierte T-Zellen – anstatt schließlich zu sterben – zu Gedächtniszellen weiterentwickeln, die bei erneuten Infektionen sehr schnell und effizient aktiviert werden (Übersicht in Dutton et al., 1998).

1.2.2 Aktivierung von T-Zellen

Trifft ein naiver T-Lymphozyt auf eine APC, deren präsentiertes Antigen vom TCR erkannt wird, so kann die T-Zelle aktiviert werden. Die Aktivierung ist jedoch nicht nur von der Wechselwirkung zwischen TCR und MHC/Peptid-Komplex abhängig, sondern erfordert die Interaktion von Corezeptoren beider Zellen, wie z. B. CD28 und B7. Falls die T-Zelle nur ein Signal über den TCR enthält, wird sie anergisch, d. h. sie kann auf diese und folgende Aktivierungen nicht mehr antworten (Jenkins et al., 1987). Anergie ist ein Schutzmechanismus des Körpers gegen Autoimmunreaktionen, die durch jene T-Lymphozyten ausgelöst werden könnten, die bei der negativen Selektion „übersehen“ wurden.

Der zentrale Rezeptor der T-Zellaktivierung, der TCR, setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen. Die α - und die β -Kette sind über Disulfidbrücken vernetzt und bilden vor allem den extrazellulären Teil des Komplexes, der mit dem MHC/Peptid-Komplex interagiert. Mit diesen Proteinen assoziieren die CD3-Moleküle als Dimereinheiten, als CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ und CD3 $\zeta\zeta$ (Davis, 2002). Im ersten Schritt der Aktivierung werden die ITAMs (*immuno-receptor tyrosine-based activation motifs*) in den intrazellulären Domänen der CD3-Moleküle von Lck phosphoryliert. Mehrere Mechanismen können diesen Schritt unterstützen bzw. herbeiführen. Zum einen können TCRs durch die Ligandenbindung sogenannte Cluster bilden (Boniface et al., 1998). Durch die Bindung eines Liganden kann aber auch der Corezeptor CD8, der mit Lck interagiert, mit dem TCR heterodimerisieren (Delon et al., 1998). Schließlich können gebundene TCRs an kinasereiche Membranregionen (*lipid rafts*) rekrutiert werden (Montixi et al., 1998; Xavier et al., 1998). Die phosphorylierten ITAMs bewirken die Bindung und Aktivierung einer weiteren Tyrosinkinase, ZAP-70. Die Substrate von ZAP-70, wie LAT und

SLP-76, rekrutieren in phosphoryliertem Zustand wiederum Proteine, die in den nachfolgenden Ereignissen eine Rolle spielen: Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) und von ras, Mobilisierung von Ca^{2+} und Umorganisation des Cytoskeletts (Übersicht in Lin und Weiss, 2001). Eine neuere Hypothese besagt, dass die T-Zellaktivierung zum Teil durch eine konformationelle Änderung von CD3 ϵ ausgelöst wird (Gil et al., 2002).

Ein durch die Rekrutierung an LAT aktiviertes Enzym ist die Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1). PLC γ 1 katalysiert die Umwandlung von Phosphatidylinositol (PIP $_2$) in Diacylglycerin (DAG) und 1,4,5-Inositol-Triphosphat (IP $_3$). Während DAG unter anderem PKC und ras aktiviert, ist IP $_3$ für die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich. IP $_3$ bindet an seinen Rezeptor am endoplasmatischen Reticulum, wodurch das dort gespeicherte Ca^{2+} freigesetzt wird. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration wird zusätzlich verstärkt und aufrecht erhalten, indem Ca^{2+} an die CRACs (*Ca²⁺-release activated channels*) der Zellmembran bindet und den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} ermöglicht. Ca^{2+} bindet an Calmodulin (Cm) und aktiviert so die Calmodulin regulierte Phosphatase Calcineurin. Eine der wichtigsten Funktionen von Calcineurin in T-Zellen ist die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT, die seine Translokation in den Zellkern bewirkt (Übersicht in Crabtree und Clipstone, 1994; Lin und Weiss, 2001).

Die Aktivierung des PKC- und des ras-Signalweges sind weniger gut aufgeklärt als die Ca^{2+} -Mobilisierung. Bei den Rezeptoren von Wachstumsfaktoren überträgt der Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos die Signale vom Rezeptor auf ras. In T-Zellen jedoch scheint die Signalübertragung komplizierter zu sein (Rudd, 1999). Aktiviertes ras wiederum induziert Raf-1 und die nachfolgende MAP-Kinase-Signalkaskade. Die aktivierten MAP-Kinasen ERK1, ERK2, JNK und p38 können direkt Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und so die Transkription beeinflussen (Übersicht in Weiss und Littman, 1994; Lin und Weiss, 2001).

Neben NFAT ist NF- κ B ein sehr wichtiger Transkriptionsfaktor in T-Zellen. Die Aktivierung von NF- κ B ist sowohl vom TCR-Signal als auch vom costimulierenden Signal von CD28 abhängig. Durch eine Phosphorylierungskaskade wird der I κ B-Kinasekomplex aktiviert, der den Inhibitor I κ B phosphoryliert und NF- κ B dadurch freisetzt. Ohne die Bindung an seinen Inhibitor kann NF- κ B in den Zellkern eindringen und die Transkription von Zielgenen aktivieren (Übersicht in Lin und Weiss, 2001).

Obwohl inzwischen viele Signalwege in T-Zellen aufgeklärt sind, bleibt die Aktivierung von T-Lymphozyten ein komplexer Prozess, in dem viele Details unbekannt sind. In Abb. 1.5 findet sich eine vereinfachte Übersicht der T-Zellaktivierung.

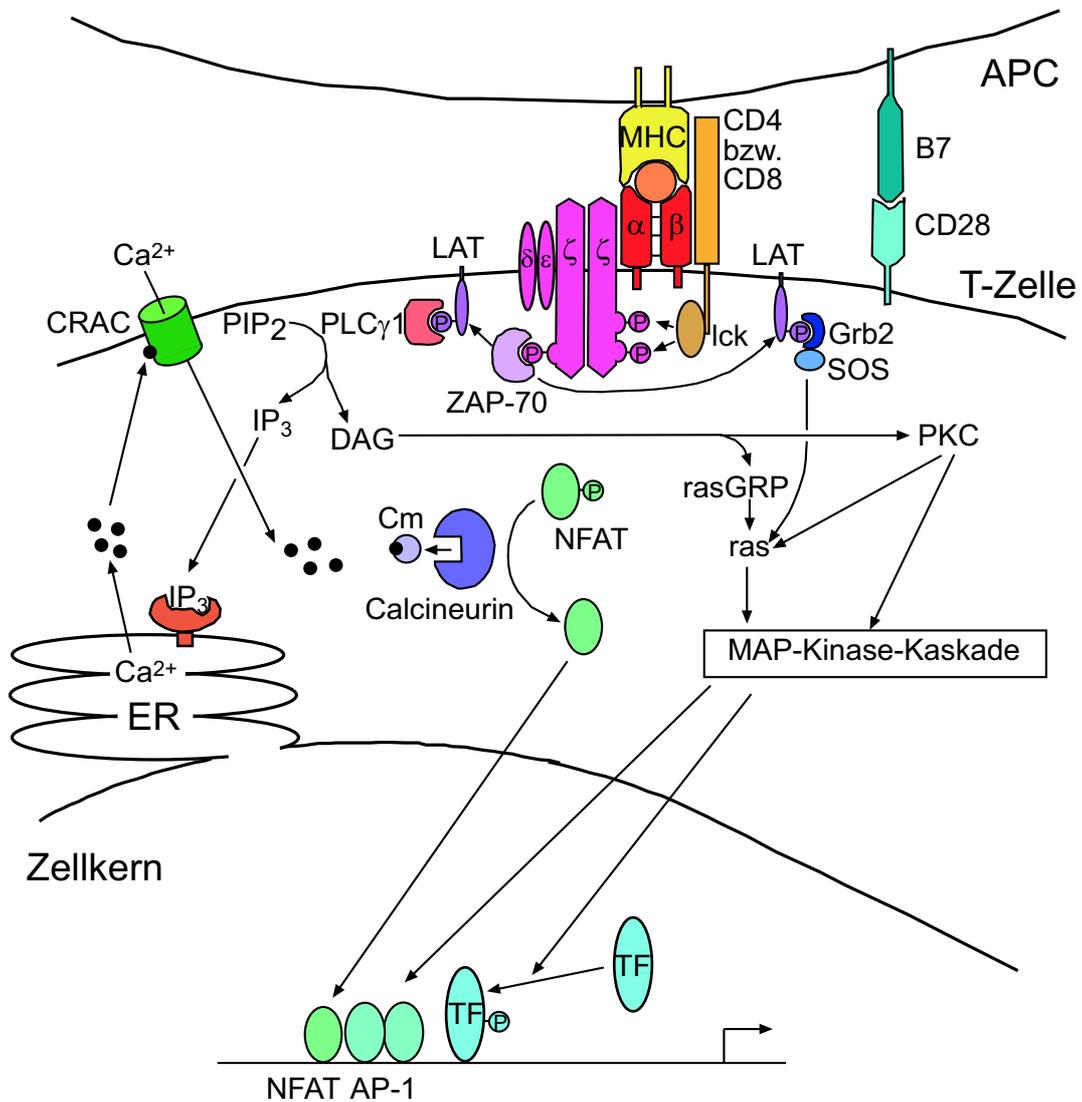


Abbildung 1.5: **Die T-Zellaktivierung.** Signalwege der T-Zellaktivierung wurden vereinfacht nach Lin und Weiss (2001) dargestellt. Die Signalwege ausgehend von CD28 und die Aktivierung von NF- κ B wurden in der Skizze nicht berücksichtigt.

1.2.3 Transkription in T-Zellen

Schon in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts beobachtete man, dass die Aktivierung von Lymphozyten mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) zum Anstieg der RNA- und Proteinsynthese führt (Cooper, 1966; Mueller und Le Mathieu, 1966; Kay, 1968). Neben einer deutlichen Zunahme der rRNA-Synthese durch RNA-Polymerase I induziert die Stimulierung von Lymphozyten auch die Transkription von mRNA durch Polymerase II (Cooke und Kay, 1973; Jagus-Smith und Kay, 1976; Tillyer und Butterworth, 1978). Man denkt, dass diese Transkriptionsaktivierung zum einen durch eine erhöhte Aktivität der RNA-Polymerase II verursacht wird. Diese kann durch eine größere Menge des Enzyms oder aber durch die Regulation der Enzymaktivität mit Hilfe von Aktivatoren oder Repressoren ausgelöst werden (Jaehning et al., 1975). Daneben kann auch die Beschaffenheit des *templates*, des Chromatins, eine Rolle spielen. So entdeckte man, dass Kerne aus PHA-aktivierten Lymphozyten *in vitro* ein besseres Substrat für RNA-Polymerase aus *E. coli* sind als Kerne aus nicht aktivierten Lymphozyten (Hirschhorn et al., 1969).

In den letzten Jahren hat sich das Bild von den ruhenden, metabolisch inaktiven T-Lymphozyten gewandelt. Man weiß, dass auch in nicht aktivierten T-Zellen RNA-Synthese stattfindet. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass sich die Anzahl der transkribierten Gene in T-Zellen nach Aktivierung kaum ändert, wohl aber deren Spektrum (Teague et al., 1999). Trotzdem haben die Autoren in Übereinstimmung mit älteren Veröffentlichungen gefunden, dass der Gesamtgehalt an RNA zunimmt. Man nimmt daher an, dass neben der spezifischen Induktion von Genen die globale Transkriptionsaktivität nach der Stimulierung erhöht wird (Teague et al., 1999).

Die Aktivierung von T-Zellen zeichnet sich neben den umfassenden Änderungen auf molekularer Ebene auch durch morphologische Veränderungen aus. Unter dem Elektronenmikroskop sieht man, dass nach der Stimulierung von Lymphozyten ihr Kern- und Cytoplasmavolumen zunimmt, ihr stark kondensiertes Chromatin sich öffnet und Nucleoli entstehen (Tokuyasu et al., 1968; Kaczmarek et al., 1987). Diese Effekte beginnen sich bei frisch isolierten Lymphozyten 24 Stunden nach der Aktivierung abzuzeichnen und sind nach 72 Stunden deutlich ausgeprägt (Kaczmarek et al., 1987). Zwischen den morphologischen und den molekularen Auswirkungen der T-Zellaktivierung lassen sich gut Parallelen ziehen. So kann man die Entstehung von Nucleoli mit der verstärkten Synthese von rRNA und das angewachsene Cytoplasma mit erhöhter Proteinsynthese korrelieren. Die Dekondensierung des Chromatins lässt sich mit der Erhöhung der Transkriptionsaktivität in Verbindung bringen, wobei es hierfür keine direkten Beweise gibt. Es scheint jedoch logisch, dass eine erhöhte Transkriptionsaktivität durch die „Öffnung“ von stark kondensiertem Chromatin, d. h. durch *chromatin remodeling*, erreicht werden kann.

Auf der Ebene einzelner Gene kennt man einige Beispiele, bei denen die Induktion der Transkription nach T-Zellaktivierung mit einer Veränderung der Chromatinstruktur zusammenfällt. So wird in der proximalen Promotorregion des Interleukin-2-Gens (IL-2) nach der Stimulierung die Chromatinstruktur verändert, bevor die Konzentration der IL-2 mRNA stark ansteigt (Siebenlist et al., 1986; Rao et al., 2001). Nach der T-Zellaktivierung werden ebenso die Loci der Gene Interleukin-4 (IL-4) und Interferon- γ (IFN- γ) verändert, was sich in einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber DNase I und in der Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 zeigt (Agarwal und Rao, 1998; Avni et al., 2002; Fields et al., 2002). Je nach T-Zelllinie, die sich aus den Zellen entwickelt, bleibt der IL-4-Lokus nur bei T_H2-Zellen in seiner aktiven, hyperacetylierten Struktur und der IFN- γ -Lokus nur bei T_H1-Zellen. Diese „aktivierte“ Chromatinstruktur wird auch in Zellen beibehalten, die die Cytokine nicht mehr transkribieren. Man nimmt daher an, dass diese Struktur eher ein Zeichen von Transkriptionskompetenz als von Transkriptionsaktivität ist (Fields et al., 2002).

Inzwischen gibt es auch Hinweise auf eine allgemeine Regulation des *chromatin remodeling* in T-Zellen. Zhao und Kollegen haben beobachtet, dass der BAF-Komplex, das menschliche Homolog des SWI/SNF Komplex, nach der Aktivierung von T-Lymphozyten innerhalb von Minuten an die Kernmatrix bzw. das Chromatin rekrutiert wird (Zhao et al., 1998).

1.3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Mechanismen zu finden, mit denen die globale Transkriptionsaktivität während der Stimulierung primärer humaner T-Lymphozyten reguliert werden kann. Dazu sollte zunächst die basale Transkriptionsmaschine im Hinblick auf Konzentrations- oder Modifikationsänderungen während der T-Zellaktivierung untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt waren Veränderungen im Chromatin. Zum einen sollten Chromatin modifizierende Enzyme identifiziert werden, deren Aktivität, Konzentration oder Lokalisation sich während der T-Zellstimulierung verändert und die somit Einfluss auf die Transkriptionsaktivität nehmen können. Daneben war von Interesse, ob solche Enzyme tatsächlich globale Veränderungen im Chromatin von aktivierten T-Lymphozyten verursachen und inwieweit sich Chromatinmodifikationen auf der Ebene einzelner Gene nach der T-Zellstimulierung beobachten lassen.

Kapitel 2

Material

2.1 Geräte und Hilfsmittel

Apparaturen für die Elektrophorese von Acrylamidgelen	SE 250, SE 280 and SE 600, Amersham Biosciences
Analysenwaagen	AE 100 und 163, Mettler
Autoradiographiekassetten	SBC32, SPB55 und SPB63, Scaltec
<i>Direct Imager</i>	Appligene, Amersham Biosciences
Durchflusszytometer	Instant Imager, Packard
Entwicklermaschine	FACSCalibur, Becton Dickinson
Elektroblotmaschine	Hyperprocessor, Amersham Biosciences
Gefrierschränke	Curix 60, Agfa
Geigerzähler	Trans-Blot SD, BioRad
Heizblöcke	HFU686 und HFU630, Heraeus
Heizrührgeräte	LB122, Berthold
Homogenisator	Thermomixer compact, Eppendorf
Inkubatoren	Blockthermostat TCR 100, Roth
Konduktometer	RCT basic, IKA Labortechnik
Konfokales Mikroskop	Dounce, Wheaton
Kühlschränke	WJ311, Forma Scientific
Lichtmikroskop	Unequip, Unitherm
Netzteile	B6200, Heraeus
	Typ 703, Knick
	TCS SP2, Leica
	Liebherr
	IM35 und Axiovert, Zeiss
	EPS 2A200, Amersham Biosciences
	Model 3000 XiPowerPac 200 und 3000, BioRad
	E432 und E734, Consort

Magnetrührer	ECPS 3000/150 and EPS 3500, Pharmacia
PCR-Thermocycler	PS250-2, Sigma REO, IKAMAG GeneAmp 2400, Applied Biosystems T Gradient, Biometra Mastercycler Personal, Eppendorf Robocycler, Stratagene
pH-Meter	Calismatic 760, Knick
Pipetten	Pipetman P2, P20, P200, P1000, Abimed
Pipettierhilfe	Akku-jet, Brand
Reaktionsgefäßschüttler	Thermomixer 5437, 5438 und compact, Eppendorf
<i>Real time PCR</i> -Gerät	GeneAmp 5700 Sequence Detector, Applied Biosystems
Rollermixer	SRT1, Stuart Scientific
Rotoren	SS34, GSA, GS3, Sorvall SW41, 70.2Ti, J6, Beckman
Schüttelinkubator	ISF-1-V, Adolf Kühner AG Innova 4400 und Innova 4430, New Brunswick Scientific
Sonifikator	W250 und 250-D, Branson
Spektrophotometer	GeneQuant pro, Amersham Biosciences DU-640, Beckman BioPhotometer, Eppendorf
Sterile Werkbänke	Typ UVF 6.12 S und 200, BDK
Szintillationszähler	LS 5000TA, Beckman
Taumler	3011, GFL KS50, IKAMAG
Überkopfschüttler	REAX2, Heidolph
Ultrazentrifugen	L7 und L8-M, Beckman
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Wasserbäder	RTE 101, Neslab Memmert
Zentrifugen	5417, 5415C und 5415R, Eppendorf Varifuge 3.0R, Biofuge 28RS und Multifuge 3L-R, Heraeus EBA 3S und Rotanta/RPC, Hettich 5B Plus und 5C Plus, Sorvall

2.2 Verbrauchsmaterial

ECL Western Blot Kit

NEN

Einwegplastikmaterial	Greiner, Nunc, TPP
Filme X-OMAT, BioMax	Kodak
Gel Drying Kit	Promega
Histogel Eindeckmedium	Linaris
Human T Cell Enrichment Column Kit	R&D Systems
LSC-Cocktail zur Szintillationsmessung	Roth
Rotiszint eco plus	
Luciferase Cell Culture Lysis Buffer	Promega
MACS Separation Columns (VS ⁺ columns)	Miltenyi Biotech
Messflaschen für Szintillationszähler	Roth
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates	Applied Biosystems
Micro-FastTrack mRNA Isolation Kit	Invitrogen
MicroSpin Gefäße mit PVDF-Membran (0,45 µm Porendurchmesser)	membraPure GmbH, Millipore/Amicon
Nitrocellulosemembran (0,45 µm Porendurchmesser)	BioRad
OpticalCaps (8 Caps/Strip)	Applied Biosystems
P81 Chromatographiepapier	Whatman
PCR Reaktionsgefäße	Biozym, Applied Biosystems
Poly-L-Lysin-Objektträger	Sigma
PVDF-Membran Hydrobond-P	Amersham Biosciences
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Silikonisierte Reaktionsgefäße	Sorenson Bioscience Inc.
SYBR Green PCR Core Reagents	Applied Biosystems
Whatman 3MM Papier	Whatman

2.3 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid	Fluka
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 30% (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Acrylamidlösung 30% (Rotiphorese Gel A)	Roth
Amidoschwarz	Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Roth
Ammoniumsulfat	Merck
Aprotinin	Roche
Benzamidin	Sigma
Bicoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml)	Biochrom
Bisacrylamidlösung 2% (Rotiphorese Gel B)	Roth
Bradford Reagenzlösung	BioRad
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	Peqlab
Bromphenolblau	Sigma

BSA (10 mg/ml)	New England Biolabs
Cäsiumchlorid	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Calcium-Ionophor A23187	Sigma
Chloroform	Merck
Coomassie-Brillantblau R-250	Sigma
Deoxycholat (DOC)	Sigma
Desoxyribonukleotidtriphosphate	Amersham Biosciences
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylpimelimidat (DMP)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DMEM-Medium (high glucose)	Gibco BRL
EDTA	Merck
EGTA	Merck
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck, Riedel-de Haën
Ethanolamin	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, PAA, PAN Systems
Gelatine (aus Kaltwasserfisch)	Sigma
Glucose	Merck
L-Glutaminlösung (200 mM)	Gibco BRL
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Glykogen (aus Austern)	Sigma
Harnstoff	Roth
HEPES	Biomol
Histone (aus Kalbsthymus)	Roche
IGEPAL CA630 (NP-40)	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Lachssperma-DNA	Sigma
N-Laurylsarcosin	Sigma
Leupeptin	Roche
Lithiumchlorid	Sigma
Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH
Magnesiumchlorid	Merck

β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck, Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Sigma
Natriumborat	Roth
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Roth
Natriumfluorid	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natrium-ortho-vanadat	Sigma
Nitroblautetrazolium (NBT)	Peqlab
<i>Non essential amino acids</i> MEM (100x)	Gibco BRL
Oligo(dT) ₁₅ -Primer	Roche
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin/Streptomycinlösung (100x)	Biochrom
Pepstatin A	Roche
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Biomol, Roth
Phenol (TE-gesättigte Lösung)	Roth
Phorbolmyristylester (PMA)	Sigma
Phytohämagglutinin-M (PHA-M)	Roche, Sigma
PIPES	Biomol
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat(Tween 20)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Protein A-Sepharose	Amersham Biosciences
Protein G-Sepharose	Amersham Biosciences
Reaktionspuffer (5x) für M-MuLV- Reverse-Transkriptase	Promega
Ribonukleaseinhibitor	Invitrogen, Stratagene
Roti-Phenol/Chloroformlösung (TE-gesättigt)	Roth
RPMI 1640-Medium	Gibco BRL
Saccharose	Merck, Roth
Salzsäure (37%)	Merck, Roth
5-Sulfosalicylsäure	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Sigma
Trichloressigsäure	Fluka
Triton-X100	Sigma
Trishydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Sigma
Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	Gibco BRL

2.4 Radiochemikalien

S-Adenosyl-[Methyl-¹⁴C]-L-Methionin Amersham Biosciences, NEN
S-Adenosyl-[Methyl-³H]-L-Methionin Amersham Biosciences, NEN

2.5 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

BCX-Puffer \mathcal{X} mM KCl (0–2000 mM)
20 mM Tris-HCl (pH 7,3)
0,2 mM EDTA (pH 8,0)
10–20% (v/v) Glycerin

20x PBS 160 g NaCl
4 g KCl
23 g Na₂HPO₄·2H₂O
4 g KH₂PO₄
H₂O ad 1000 ml
pH 7,2

RIPA 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
150 mM NaCl
0,1% (w/v) SDS
0,5% (w/v) DOC
1% (v/v) IGEPAL CA630

TE 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA

10x TGS 250 mM Tris
1,92 M Glycin
1% (w/v) SDS

2.6 Enzyme

DNase I (RNase-frei)	Promega
M-MuLV-Reverse-Transkriptase	Promega
Proteinase K	Roche
RNase A	Roche
Taq DNA-Polymerase	MBI Fermentas

2.7 Antikörper

2.7.1 Primärantikörper

Acetyl-Histon H3 (Lys9)	06-942	Kaninchen	Upstate Biotechnology
Acetyl-Histon H3 (Lys14)	06-911	Kaninchen	Upstate Biotechn.
acetyliertes Histon H3	06-599	Kaninchen	Upstate Biotechn.
acetyliertes Histon H4	06-866	Kaninchen	Upstate Biotechn.
β -Actin	sc-1616 (I-16)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
β -Actin	sc-1615 (C-11)	Ziege	Santa Cruz Biotechn.
Arginine N-Methyl Transferase (PRMT1)	ab7027	Maus	Abcam
BAF170	sc-9744 (C-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechn.
Brg1	sc-10768 (H88)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
Brg1	sc-8749 (N-15)	Ziege	Santa Cruz Biotechn.
CBP (HAT)	6D6	Ratte	E. Kremmer, München
CBP	sc583 (C-20)	Kaninchen	Santa-Cruz Biotechn.
CD3	26 II G5	Maus	E. Kremmer, München
CD45RA	31261A (HI100)	Maus	Pharmingen
CD45RO	31301A (Uchl1)	Maus	Pharmingen
CDK7	sc-529 (C-15)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
CDK8	sc-1521 (C-10)	Ziege	Santa Cruz Biotechn.
CREB-1	sc-186 (C-21)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
CTD (Phospho- Ser2-Epitop)	H5 (IgM)	Maus	Babco
CTD (Phospho- Ser5-Epitop)	H14 (IgM)	Maus	Babco
Cyclin T1	sc-10750 (H-245)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
Dimethyl-Arginine	ab413 (21C7)	Maus	Abcam
Dimethyl-Histon H3 (Lys4)	07-030	Kaninchen	Upstate Biotechn.
Dimethyl-Histon H3 (Lys4)	ab7766 ab7317	Kaninchen	Abcam
Dimethyl-Histon H3 (Lys9)	07-212	Kaninchen	Upstate Biotechn.
Dimethyl-Histon H3 (Lys9)	ab7658	Kaninchen	Abcam

Dimethyl-Histon H3 (Lys27)	8H2	Ratte	E. Kremmer, München
Dimethyl-Histon H4 (Arg3)	07-213	Kaninchen	Upstate Biotechn.
Dimethyl-Histon H4 (Lys20)	2B8	Ratte	E. Kremmer, München
HDAC1	sc-6298 (C-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechn.
HDAC2	sc-7899 (H-54)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
hGcn5	2GC-2C11	Maus	L. Tora, Illkirch-Straß- burg
hnRNP A1	sc-10032 (Y-15)	Ziege	Santa Cruz Biotechn.
hnRNP U	3G6	Maus	G. Dreyfuss, Philadel- phia (Dreyfuss et al., 1984)
hRPB1	sc-899 (N-20)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
hRPB3		Kaninchen	M. Vigneron, Illkirch- Straßburg (Acker et al., 1997)
hRPB4		Kaninchen	E. Golemis, Philadel- phia (Khazak et al., 1998)
hRPB5	4H7	Maus	M. Vigneron, Illkirch- Straßburg (Nguyen et al., 1996)
hRPB7		Kaninchen	E. Golemis, Philadel- phia (Khazak et al., 1998)
hRPB8	B8-1	Maus	P. Cook, Oxford (Jones et al., 2000)
hSnf2H	sc-8759 (N-17)	Ziege	Santa Cruz Biotechn.
IL-2R α	sc-664 (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
IL-2R α	MA251	Maus	E. Kremmer, München
Ini1	sc-9749 (N-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechn.
Lamin B	sc-6217 (M-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechn.
Mi-2	sc-11378 (H-242)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
Mono- und Di- methyl-Arginin	ab412 (7E6)	Maus	Abcam
NC2 α	4G7	Ratte	E. Kremmer, München
NC2 α	6G8	Ratte	E. Kremmer, München
NF- κ B p65	sc-372X (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
OKT3		Maus	Eigenproduktion
PCQAP	6C9	Ratte	E. Kremmer, München
PC1/PC4		Kaninchen	Eigenproduktion

PCAF	sc-8999 (H-369)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
Set9	07-314	Kaninchen	Upstate Biotechn.
STAT5	sc-835 (C-17)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
TCR		Maus	Hoechst, unverkäuf.
TFIIB	sc-225 (C-17)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
TFIIE α	sc-237 (C-17)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
TFIIE β	sc-238 (C-21)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
TFIIF RAP74	sc-234 (N-16)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
TFIIH (p62)		Kaninchen	Eigenproduktion
TFIIH (p89)	sc-293 (S-19)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechn.
Trimethyl-Histon H3 (Lys4)		Kaninchen	T. Kouzarides, Cambridge (Santos- Rosa et al., 2002)
Trimethyl-Histon H3 (Lys4)	ab8580	Kaninchen	Abcam

2.7.2 Sekundärantikörper

Esel <i>anti-Ziege</i> IgG (sc-2022)	AP-Konjugat	Santa Cruz Biotechnology
Esel <i>anti-Ziege</i> IgG H+L (705-035-147)	Cy TM 5-Konjugat	Jackson Laboratories
Esel <i>anti-Ziege</i> IgG H+L (705-096-147)	FITC-Konjugat	Jackson Labs.
Esel <i>anti-Ziege</i> IgG (sc-2022)	HRP-Konjugat	Santa Cruz Biotechn.
Maus <i>anti-Kaninchen</i> IgG H+L (211-095-109)	FITC-Konjugat	Jackson Labs.
Rind <i>anti-Ziege</i> IgG (sc-2350)	HRP-Konjugat	Santa Cruz Biotechn.
Schaf <i>anti-Maus</i> IgG H+L (515-095-062)	FITC-Konjugat	Jackson Labs.
Ziege <i>anti-Kaninchen</i> IgG Fc (S3731)	AP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Kaninchen</i> IgG H+L (W4011)	HRP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Maus</i> IgG H+L (S3721)	AP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Maus</i> IgG H+L (W4021)	HRP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Ratte</i> IgG H+L (S3831)	AP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Ratte</i> IgG H+L (112-035-068)	HRP-Konjugat	Jackson Labs.

2.7.3 Immobilisierte Antikörper

CD45RO MicroBeads Miltenyi Biotec

2.8 Oligodesoxyribonukleotide

Name	Sequenz
beta-actin do	TAAATCCTGAGTCAAGCCAAAAAAA
beta-actin up	TCTAGGCGGACTATGACTTAGTTGC
CD25 lower	CTTGTGGGTCCATCCAGTCTCTAT
CD25 upper	TGAGGAAGAGAGTGCTAGGCAGTT
CD25-5 do	GAGACAAGGTTGCCACTGCC
CD25-5 up	ATGAAGCCCAAGTGAAATCAAAG
DCK lower	AGCCAGATCCTGACCTGCCG
DCK upper	CCCGCCAGTGTCCCTCAGCT
EF-1-alpha.do	GAGCCAGTACACGACATCACTTTC
EF-1-alpha.up	CCACAGTCCCCGAGAAGTTG
IL-2 lower	AAGAGATGCAATTTTATACTGTTAATTCTGG
IL-2 upper	TAAAGAAATTCCAAAGAGTCATCAGAAG
IL2-3 up	CTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAG
IL2-RT do	TTCAGAAATTCTACAATGGTTGCTG
IL-2-5 do	CCTGATATGTTTTAAGTGGGAAGCA
IL-2-5-up	CAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAA
PRMT1-2 do	TCCATGTAGAACGTATGATT
PRMT1-2 up	CGTTCTGCCTGCAAGTGAAG
TCRb-locus-3_for	CTTTCGCCGTCTCTGCTCTC
TCRb-locus-3_rev	AGGATGGTGGCAGACAGGAC
TCRb-locus-8_for	TGGGATTTTCAGCCATCCTG
TCRb-locus-8_rev	CTGCCCAGCACCTTTTTAAAA
Venh.endo_for	ACTGGAGCCCTGACACCTGT
Venh.endo_rev	GATTCAGGGCCACTCTCCTTT

2.9 Peptide

Name	Sequenz	Herkunft
H4	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL RDC	G. Arnold, München
H4 R3A	SGAGKGGKGLGKGGAKRHRKVL RDC	G. Arnold, München
H4 K20methyl.	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL RDC	G. Arnold, München
Kontrolle	MDVSGQETDWRST AFC	Eurogentec

2.10 Eukaryontische Zelllinien

Jurkat J6 humane leukämische T-Zell-Lymphoblasten
MRC5 fötale humane Lungenfibroblasten

2.11 Humanes Zellmaterial

Buffy Coats Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München
BRK München, Klinikum Großhadern, München
humane Hautfibroblasten H. Lochmüller, München

2.12 Protein-Längenstandards

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

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

Kapitel 3

Methoden

3.1 Eukaryontische Zellkultur

3.1.1 Zellvermehrung eukaryontischer Zelllinien und primärer Zellen

Alle Arbeiten werden unter Laminarfluss mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, autoklavierten Glaswaren und mit vom Hersteller entkeimten Kunststoffmaterialien sowie Nährmedien durchgeführt. Das FCS wird zur Inaktivierung des Komplementsystems vor Gebrauch bei 56°C im Wasserbad 30 min inkubiert.

Jurkat J6 Zellen werden in RPMI 1640-Medium gehalten, das mit 10% FCS (v/v), 1000 U/l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin und 2 mM L-Glutamin supplementiert ist. Man inkubiert die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Kultur erfolgt in horizontal gelagerten Zellkulturflaschen bei einer Zelldichte zwischen 0,2 und 1·10⁶ Zellen/ml. Dazu werden die Zellen alle 1–2 Tage verdünnt. Bei logarithmischem Wachstum verdoppelt sich die Zelldichte in ca. 20 h. Die Zellen werden in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop gezählt.

Mononukleäre Zellen, d. h. B-Zellen und Monozyten, die bei der Isolierung von T-Lymphozyten abgetrennt worden sind (s. 3.1.3), werden ebenfalls in RPMI 1640-Medium gehalten. Auch hier ist das Medium mit 10% FCS (v/v), 1000 U/ml Penicillin, 100 mg/l Streptomycin und 2 mM L-Glutamin supplementiert. Die Stimulierung erfolgt mit 20 ng/ml PMA.

Die Kultur humaner Hautfibroblasten erfolgt in DMEM-Medium (mit 4500 mg/l Glucose), das mit 10% (v/v) FCS, 1000 U/ml Penicillin und 100 mg/l Streptomycin supplementiert ist. Zellen von dichtgewachsenen Platten werden 1:2–1:5 verdünnt. Dazu entfernt man das Medium und wäscht die Zellen in 1x PBS. Den Zellen wird 2–4 ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben, und die Platten werden einige Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen werden in der entsprechenden Menge Medium resuspendiert, die dann auf Zellkulturschalen verteilt

wird. Trypsininhibitor, der im FCS des Mediums enthalten ist, stoppt die enzymatische Reaktion. Das Medium wird alle 2–3 Tage ausgewechselt, auch wenn die Zellen dabei nicht verdünnt werden. Dadurch vermeidet man eine Kontamination der Zellen.

Platten mit Zellen, die durch *serum starvation* in die G₀-Phase des Zellzyklus gebracht werden sollen, werden zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend werden sie mit DMEM-Medium versetzt, das mit 0,5% (v/v) FCS, 1000 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin supplementiert ist. Nach 48 h werden die Zellen restimuliert, indem man das „Hungermedium“ gegen normales Kulturmedium austauscht, das 10% (v/v) FCS enthält.

MRC5 Zellen werden genauso wie humane Hautfibroblasten behandelt, das Kulturmedium enthält jedoch zusätzlich 1x MEM (nicht-essentielle Aminosäuren). Auch das *starving*-Medium ist im Vergleich zum Medium der humanen Hautfibroblasten zusätzlich mit 1x MEM supplementiert.

Alle kontaminierten Einwegmaterialien werden autoklaviert und dann dem Restmüll zugeführt. Mediumreste werden autoklaviert oder mit Hypochlorid-Lösung sterilisiert.

3.1.2 Anlegen von Dauerkulturen

Für Dauerkulturen aus Jurkat J6 Zellen wird eine logarithmisch wachsende Suspensionskultur abzentrifugiert (200 g, 10 min). $3 \cdot 10^7$ Zellen werden in 0,9 ml supplementiertem RPMI 1640-Medium resuspendiert und auf 0,9 ml eiskaltes 30% (v/v) DMSO in FCS in einem 2 ml Kryogefäß geschichtet. Nach vorsichtigem Mischen werden die Zellen sofort auf Eis gestellt und zunächst 5 h bei -20°C unter guter Wärmeisolierung langsam abgekühlt. Die Aliquots werden dann 48 h bei -80°C und endgültig in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen werden die Zellen rasch auf 37°C erwärmt, mit 10 ml komplettem Medium vermischt, abzentrifugiert (200 g, 10 min) und in 10 ml frischem Medium resuspendiert.

Adhärenz wachsende Zellen (70–90% Konfluenz) werden durch Trypsin-EDTA-Behandlung (s. 3.1.1) abgelöst und abzentrifugiert (200 g, 10 min). Die Zellen werden in eiskaltem Freeze-Medium aufgenommen und wie beschrieben kryokonserviert.

Freeze-Medium 10% (v/v) DMSO
90% (v/v) FCS

3.1.3 Isolierung primärer humaner T-Lymphozyten

Buffy Coat Fraktionen, d. h. lymphozytenreiche Fraktionen des Blutes, von jeweils 500 ml Blut werden durch Zugabe von Puffer A/B auf 200 ml Gesamtvolumen verdünnt. Puffer A/B wird jedes Mal frisch aus den Lösungen A und B im Verhältnis 1:9 hergestellt. Je 25 ml der verdünnten Zellsuspension werden vorsichtig auf

20 ml Bicolllösung (Dichte 1,077 g/ml) geschichtet. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 1830 g, 21°C und minimaler Bremsstufe setzen sich die mononukleären Zellen in einer Interphase ab. Am Boden des Gefäßes befinden sich die Erythrozyten und Granulozyten und in der oberen Schicht das Plasma mit Blutplättchen (Bøyum, 1968). Die Interphase wird vorsichtig mit einer Kanüle abgenommen. Man pelletiert die Zellen der Interphase nach Verdünnen mit dem Puffer A/B bei 200 g und 10 min. Nach zweimaligem Waschen in Puffer A/B werden die Zellen in 300 ml RPMI 1640 mit 10% (v/v) FCS, 1000 U/l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin und 2 mM L-Glutamin resuspendiert. Nach einer Inkubation von 60–90 min bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit adhäriert der größte Teil der Monozyten. Die suspendierten T-Zellen, die noch B-Lymphozyten enthalten, werden vorsichtig in eine frische Zellkulturflasche abdekantiert. Die Zellen werden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Falls sie ü/N inkubiert werden, dekantiert man die T-Lymphozyten vor der Stimulierung noch einmal ab, um weitere Monozyten zu entfernen.

Puffer A	5,5 mM D-Glucose	Puffer B	0,14 M NaCl
	50 nm CaCl ₂		
	0,98 mM MgCl ₂		
	5,4 mM KCl		
	0,145 M Tris		

3.1.4 Aufreinigung naiver humaner T-Lymphozyten

Zur Aufreinigung naiver primärer T-Zellen bedient man sich des Oberflächenmarkers CD45. Auf naiven T-Zellen wird dessen Spleißform CD45RA, auf Gedächtniszellen und aktivierten T-Zellen die Form CD45RO exprimiert. Beim Aufreinigen werden CD45RO⁺ Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert, die an Magnetpartikel gekoppelt sind. In sterilen Stahlwollensäulen, die magnetisiert sind, werden markierte Zellen zurückgehalten, während unmarkierte Zellen durch die Säule fließen.

Die angereicherten T-Lymphozyten (s. 3.1.3) werden zunächst mit Hilfe einer *Human T Cell Enrichment Column* (R&D Systems) nach Angaben des Herstellers weiter aufgereinigt, um restliche Monozyten und B-Zellen zu entfernen. Da auch nicht aktivierte B-Zellen CD45RA exprimieren (Poppema et al., 1996), könnten sie die weitere Aufreinigung stören.

Anschließend werden die Zellen in 1x PBS gewaschen und sedimentiert (200 g, 10 min, RT). Die Zellen werden mit einer Konzentration von 10⁷/80 µl in Bindungspuffer aufgenommen, mit 20 µl anti-CD45RO-Magnetpartikel (Miltenyi Biotec) pro 10⁷ Zellen gemischt und 15 min bei 4°C unter Rollen inkubiert. Nach Zugabe des 10–20 fachen Volumens an Bindungspuffer zum Auswaschen überflüssiger Partikel werden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 200 g, 4°C). Eine VS⁺-Säule (Miltenyi Biotec) wird mit 3 ml Bindungspuffer gewaschen und an einem geeigneten Magneten (Miltenyi Biotec) befestigt. Die Zellen werden in

1 ml Bindungspuffer resuspendiert und auf die Säule aufgetragen. Die Säule wird dann fünfmal mit je 3 ml Bindungspuffer gewaschen. Diese Waschfraktionen und der Durchfluss enthalten die gewünschten CD45RO⁻, naiven T-Lymphozyten. Die Zellen werden sedimentiert (200 g, 10 min, RT) und in einer entsprechenden Menge Medium aufgenommen.

Auch die Gedächtniszellen und evtl. aktivierte Zellen können aus der Säule zurückgewonnen werden. Dazu entfernt man die Säule aus dem Magneten und trägt 5 ml Bindungspuffer auf. Mit Hilfe eines Spritzenkolbens spült man die CD45RO⁺ Gedächtniszellen aus der Säule. Die Zellen werden sedimentiert (200 g, 10 min, RT) und in einer entsprechenden Menge Medium aufgenommen.

Bindungspuffer 1x PBS
0,5% (w/v) BSA
2 mM EDTA

3.1.5 Aktivierung primärer humaner T-Lymphozyten

Zur Stimulierung werden im Allgemeinen 2,5 µg/ml PHA und 20 ng/ml PMA (gelöst in in DMSO) verwendet. Alternativ wurden je nach Angabe 2,5 µg/ml PHA alleine, 20 ng/ml PMA alleine, 20 ng/ml PMA und 1 µM Calcium-Ionophor, 40 ng/10⁴ Zellen anti-TCR-Antikörper oder anti-CD3-Antikörper (26 II G5) benutzt. Außerdem wurde in einigen Fällen ca. 0,3 µg/10⁶ Zellen Protein aus OKT3-Hybridoma-Überstand, das an Protein A-Sepharose angereichert worden war, zusammen mit 20 ng/ml PMA verwendet.

Für die Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper (26 II G5) wird der Boden einer Zellkulturflasche mit 20 µg/ml Antikörper in sterilem 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,5) beschichtet und 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dem Absaugen der Lösung werden die adhärenierten Antikörper mit RPMI 1640-Medium/10% (v/v) FCS 30 min neutralisiert und geblockt. Anschließend wird die Zellsuspension zugegeben.

3.2 DNA- und RNA-Arbeitstechniken

3.2.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäurelösung

Die Konzentration einer DNA-Lösung wird über ihre Absorption bei 260 nm ermittelt. Dabei entspricht 1 OD₂₆₀ einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml. Als Kriterium für die Reinheit einer DNA-Lösung wird das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ herangezogen. Für reine DNA schwankt dieser Wert je nach G/C-Gehalt der Probe zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Quotienten zeigen Proteinverunreinigungen an, höhere lassen auf die Anwesenheit von RNA schließen. Bei RNA-Lösungen entspricht 1 OD₂₆₀ einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

3.2.2 Chloropane-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Die Chloropane-Extraktion ist eine Routinemethode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Lösungen von Nukleinsäuren und Proteinen. Wenn nicht anders beschrieben, wird die Nukleinsäure-Lösung mit einem Volumenanteil Chloropane versetzt, auf dem Vortex vermischt und für 3 min bei RT zentrifugiert (16100 g). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumenanteil Chloroform gemischt und erneut für 3 min zentrifugiert (16100 g). Der wässrige Überstand wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Restliches Chloropane wird durch anschließende Ethanol-Fällung der DNA entfernt. Bei der Zugabe von Alkohol kommt es in Gegenwart relativ hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen zur Aggregation der Nukleinsäure-Moleküle und zur nachfolgenden Präzipitation. Niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze bleiben dabei in Lösung. Die Nukleinsäuren werden aus der Lösung durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 2,5 Volumenanteilen eiskaltem absolutem Ethanol gefällt. Der Ansatz wird vermischt und 2 h bei -20°C oder 30 min bei -80°C inkubiert. Nach einer dreißigminütigen Zentrifugation (16100 g, 4°C) wird das Präzipitat mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Es wird nochmals für 5 min zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Schließlich wird die DNA in einem geeigneten Volumen TE gelöst. Die Isopropanolfällung einer DNA-Lösung erfolgt durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 0,8 Volumenanteilen eiskaltem Isopropanol. Inkubation, Zentrifugation und Waschen des DNA-Präzipitats erfolgen analog zur Ethanol-Fällung.

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

3.2.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

3.2.3.1 Amplifizierung von DNA

Zur Amplifizierung von cDNA (*complementary DNA*) oder bestimmter Bereiche genomischer DNA über die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1988) wird die Taq-Polymerase verwendet. Alternativen stellen die Pfu- oder die Vent-DNA-Polymerase dar, die eine $3' \rightarrow 5'$ -*proofreading*-Exonukleaseaktivität besitzen, welche im Vergleich zur Taq-DNA-Polymerase zu einer zehnfach höheren Genauigkeit der DNA-Synthese führt. Die Polymerisationsgeschwindigkeit der Taq-Polymerase (ca. 1000 Nukleotide/min) ist allerdings höher als die der *proofreading*-Polymerasen (500 Nukleotide/min). Ein weiterer Unterschied zur Taq-DNA-Polymerase besteht darin, dass die Reaktionsprodukte der Pfu- und der Vent-DNA-Polymerase glatte Enden besitzen, was eine nachfolgende Klonierung erleichtert.

Ein Reaktionsansatz enthält jeweils 20 pmol Primer, 50–100 ng Plasmid-DNA oder cDNA, 250 μM jeden dNTPs, 5 μl des vom Hersteller mitgelieferten 10x PCR-Puffers und die vom Hersteller empfohlene Menge an thermostabiler DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 μl . Der Ansatz wird auf Eis zusammenpipettiert. Die Reaktion kann durch Zugabe des Enzyms bei 94°C im Thermocycler gestartet werden, um unspezifische Paarungen der Primer in der ersten Amplifizierungsrunde zu vermeiden (*hot start PCR*). Für die Bestimmung der Hybridisierungstemperatur zieht man folgende Formeln heran:

$$T_H[^\circ\text{C}] = (\text{GC}) \times 4 + (\text{AT}) \times 2 \quad (3.1)$$

T_H Hybridisierungstemperatur
 (GC) Anzahl der GC-Basenpaare
 (AT) Anzahl der AT-Basenpaare

$$T_H[^\circ\text{C}] = 81,5 + 16,6 \lg[\text{Na}^+] + 0,41 \times (\% \text{GC}) - \frac{600}{\text{Länge in bp}} \quad (3.2)$$

T_H Hybridisierungstemperatur
 $[\text{Na}^+]$ Konzentration an Na^+ -Ionen bzw. an anderen einwertigen Ionen
 (%GC) prozentualer Anteil an GC-Basenpaaren

Allerdings sollte die Hybridisierungstemperatur bei Bedarf durch eine PCR mit einem Temperaturgradienten experimentell bestimmt werden. Primer sollten im Idealfall so ausgewählt werden, dass der GC-Gehalt möglichst bei 50% liegt, die Primer nicht selbst miteinander hybridisieren, keine intramolekularen Haarnadelschleifen ausgebildet werden und das 3'-Nukleotid kein Purin ist. Zur Vorhersage von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen wird das Programm OLIGO 4.0S (Molecular Biology Insights Inc., <http://oligo.net/>) benutzt. Optimale Hybridisierungstemperaturen bewegen sich zwischen 50°C und 60°C.

Im Folgenden ist ein Beispiel für ein Temperaturprogramm zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten mit Hilfe der Taq-Polymerase bis zu 1 kb angegeben. Dabei werden im Elongationsschritt des letzten Zyklus eventuell noch nicht fertig synthetisierte Produkte aufgefüllt.

Zyklennummer	1	2–25	26
Denaturierung	94°C 3–5 min	94°C 30 s	94°C 30 s
Hybridisierung		56°C 30 s	56°C 30 s
Elongation		72°C 60 s	72°C 10 min

3.2.3.2 *Real time PCR*

Real time PCR ist eine PCR-Reaktion, bei der die entstehenden Produkte über ein Fluoreszenzsignal zu jedem Zeitpunkt der Reaktion quantifiziert werden. Eine solche Reaktion wird mit den *SYBR Green PCR Core Reagents* durchgeführt. *SYBR Green* ist ein Färbereagenz, dessen Fluoreszenz bei der Wechselwirkung

mit doppelsträngiger DNA zunimmt. Das Fluoreszenzsignal ist zur Menge der entstehenden DNA-Fragmente korreliert und wird aufgezeichnet.

Die Reaktion wird in Volumina von jeweils 25 μ l durchgeführt. Man bereitet eine Grundmischung bei RT vor, die 1x *SYBR Green* Puffer, 3 mM MgCl₂, je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und 0,4 mM dUTP (entspricht 1 mM der dNTP-Mischung), 7,5 pmol der jeweiligen Primer, 0,025 U *AmpliTaq Gold*, H₂O (bidest.) und je nach Bedarf 0,01 U *AmpErase uracil-N-glycosylase* enthält. Die dNTP-Mischung enthält dUTP anstelle von dTTP, damit die Uracil-N-Glycosylase uridinhaltige PCR-Produkte abbauen kann, die die Mischung eventuell aus einer früheren PCR verunreinigen. Das Enzym ist während des Aufwärmens des Thermocyclers aktiv und wird im ersten Denaturierungsschritt deaktiviert bzw. ist bei Temperaturen über 55°C inaktiv. Die Mischung wird dann in spezielle 96-well-Platten aliquotiert. Dazu gibt man die zu untersuchenden Proben, wobei jede Probe in zwei oder drei Ansätzen analysiert wird. Der Start der Reaktion erfolgt automatisch im PCR-Gerät, da die DNA-Polymerase erst durch den ersten Denaturierungsschritt bei 95°C aktiviert wird. Ein typisches Programm für das Gerät sieht folgendermaßen aus:

Zyklenzahl	1	40
Uracil-N-Glycosylase-Schritt	50°C 2 min	
Denaturierung	95°C 10 min	95°C 15 s
Hybridisierung und Elongation		58°C 1 min

3.2.4 Isolierung von RNA aus Säugerzellen

PolyA-haltige RNA wurde mit dem *Micro-FastTrack mRNA isolation kit* (Invitrogen) aus primären humanen T-Lymphozyten nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.5 Reverse Transkription

Zur Quantifizierung exprimierter mRNA mittels PCR muss zunächst cDNA mit Hilfe von reversen Transkriptasen, also RNA-abhängigen DNA-Polymerasen, hergestellt werden. Die cDNA kann dann in einer *real time PCR* analysiert werden (s. 3.2.3.2). Da reife mRNAs am 3'-Ende üblicherweise einen Poly(A)-Schwanz besitzen, können Oligo(dT)-Primer als Startstellen für die cDNA-Synthese durch reverse Transkriptase fungieren.

Vor der reversen Transkription wird die RNA zusammen mit dem Oligo(dT)-Primer 5 min bei 70°C inkubiert und dann auf Eis abgeschreckt, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen und das Anlagern des Primers zu ermöglichen. Der Reaktionsansatz enthält poly(A)⁺RNA aus etwa 1–2,5·10⁶ Zellen, 0,1–0,25 μ g Oligo(dT)₁₅-Primer, 1,25 mM dNTPs, 40 U Ribonukleaseinhibitor, H₂O (bidest.) und 200 U Moloney-Mäuseleukämievirus (M-MuLV)-Reverse

Transkriptase in einem Endvolumen von 25 μ l. Die Reaktion wird 60 min bei 42°C inkubiert.

3.3 Gel-Elektrophorese

3.3.1 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren wird in horizontalen Gelapparaturen durchgeführt. Je nach der Größe der zu trennenden Fragmente schwankt die Agarosekonzentration zwischen 0,7% und 2% (w/v). Als Laufpuffer dient 1x TBE, dass sich durch eine hohe Pufferkapazität auszeichnet. Die aufzutrennenden Proben werden in 1x Auftragspuffer aufgetragen. Um die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar zu machen, wird der Gellösung unmittelbar vor dem Gießen Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml Endkonzentration) zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Feldstärke von 5–8 V/cm.

10x TBE	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA
----------------	--

5x Auftragspuffer	30% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) BPB 0,25% (w/v) XC
--------------------------	---

3.3.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt unter denaturierenden Bedingungen (0,1% (w/v) SDS) über eine eindimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Laemmli, 1970).

3.3.2.1 Herstellung von Gelen

Zum Gießen von SDS-Polyacrylamid-Gelen und für den Gellauf werden Gelapparaturen, Abstandshalter und Kämmen der Firma Hoefer verwendet. Zwei gut gereinigte Glasplatten werden mit zwei Abstandshaltern in einer Gießapparatur vertikal fixiert. Für kleine Gele benutzt man Platten mit den Maßen 10 cm×8 cm oder 10 cm×12 cm mit Abstandshaltern der Dicke 0,75 mm oder 1,0 mm. Große Gele werden mit Platten der Maße 16 cm×18 cm und Abstandshaltern der Dicke 1,0 mm hergestellt. Ein ca. 0,5 cm hoher Sockel Trenngel muss zunächst zwischen den beiden Glasplatten gegossen werden, um die Apparatur abzudichten. Man lässt den Sockel 5 min auspolymerisieren und füllt das Trenngel (ca. 10 ml für kleine Gele und ca. 30 ml für große Gele) bis zu einer Höhe von ca. 5,5 cm bzw. 9,5 cm für kleine Gele und 15 cm für große Gele zwischen beiden Glasplatten auf. Das Gel wird rasch mit wenig H₂O (bidest.) vorsichtig überschichtet, um

eine glatte Gelfront zu erhalten. Die Polymerisation des Trenngels ist bei kleinen Gelen nach ca. 30 min, bei großen Gelen nach ca. 3 h beendet. Bei kleinen Gelen wird nach Abgießen des Wassers das Sammelgel (ca. 2,5 ml) 2,5 cm hoch über das Trenngel gegossen, und der Kamm wird sofort eingesetzt. Bei großen Gelen setzt man nach Abgießen des Wassers den Kamm ein und füllt dann das Sammelgel (ca. 5 ml) bis zum Erreichen des Glasrands auf. Nach etwa 15 min ist die Polymerisation des Sammelgels beendet. Der Kamm wird vorsichtig entfernt, und das Gel in eine vertikale Gelelektrophorese-Apparatur mit 1x TGS als Laufpuffer eingesetzt. Die Proteinlösungen werden vor dem Auftragen auf das Gel mit $\frac{1}{7}$ Volumenanteil 8x SDS-Auftragspuffer gemischt und 1 min bei 95°C erhitzt. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation abgetrennt (1 min, 16100 g, RT).

Trenngellösung	10% (170:1)	12% (170:1)	15% (170:1)
H ₂ O (bidest.)	11,3 ml	9,2 ml	6 ml
30% (w/v) Acrylamid	9,9 ml	11,9 ml	14,9 ml
2% (w/v) Bisacrylamid	0,9 ml	1,1 ml	1,3 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
10% (w/v) SDS	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
10% (w/v) APS	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl

Trenngellösung [15% (30:0,8)] 6,9 ml H₂O (bidest.)
 15,0 ml Rotiphorese Gel 30
 7,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
 0,3 ml 10% (w/v) SDS
 300 µl 10% (w/v) APS
 12 µl TEMED

Trenngellösung [18% (200:1)] 5,4 g Acrylamid
 1,35 ml 2% (w/v) Bisacrylamidlösung
 15 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
 0,3 ml 10% (w/v) SDS
 100 µl 10% (w/v) APS
 30 µl TEMED
 H₂O (bidest.) ad 30 ml

Sammelgellösung 6,2 ml H₂O (bidest.)
 1,7 ml 30% (w/v) Acrylamidlösung
 0,7 ml 2% (w/v) Bisacrylamidlösung
 1,25 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8)
 0,1 ml 10% (w/v) SDS
 50 µl 10% (w/v) APS
 25 µl TEMED

8x SDS-Auftragspuffer: 400 mM Tris-HCl (pH 6,8)
 8% (w/v) SDS
 40% (v/v) Glycerin

0,5% (w/v) Bromphenolblau
120 mM β -Mercaptoethanol oder 15 mM DTT

3.3.2.2 Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei kleinen Gelen bei konstanten 20–25 mA für ca. 1–2 h, bei großen Gelen bei konstanten 10–30 mA unter Wasserkühlung für ca. 6–13 h in 1x TGS-Puffer. Die Elektrophorese wird gestoppt, wenn das Bromphenolblau des Auftragspuffers den unteren Glasplattenrand erreicht hat. Anschließend wird das Gel auf eine Nitrocellulose- oder eine PVDF-Membran übertragen (s. 3.5.1) und/oder mit Coomassie-Brillantblau gefärbt (s. 3.3.2.3).

3.3.2.3 Coomassie-Brillantblau-Färbung

Zur Detektion werden Proteine nach erfolgter Polyacrylamid-Elektrophorese mit Coomassie-Brillantblau angefärbt. Das Gel wird zunächst 60 min in Färbelösung inkubiert. Anschließend wird es in Entfärbelösung unter mehrfachem Wechseln des Entfärbers geschwenkt, bis die Proteine als blaue Banden vor dem klaren Hintergrund sichtbar sind. Das Gel wird dann mehrere Stunden in Trocknungspuffer inkubiert, um Risse beim Trocknen zu vermeiden. Zum Trocknen wird das Gel luftblasenfrei zwischen zwei in Wasser getränkte, durchsichtige Cellophanfolien in einen Rahmen gespannt (*Gel Drying Kit*, Promega) und ca. 24 h vertikal aufgestellt. Die untere Nachweisgrenze dieser Färbung liegt bei ca. 200 ng Protein.

Färbelösung	0,25% (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250 40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Trocknungspuffer	10% (v/v) Essigsäure 2% (v/v) Glycerin

3.4 Proteinchemische Arbeitsmethoden

3.4.1 Herstellung von Kernextrakten

Kernextrakte werden in Anlehnung an ein Protokoll nach Olnes und Kurl (1994) hergestellt. Die Zellen werden zweimal in 1x PBS gewaschen und sedimentiert (200 g, 10 min, RT). Man resuspendiert sie dann in eiskaltem NEX A-Puffer mit Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, 2 μ g/ml Aprotinin, 2 μ g/ml Leupeptin) und bei Bedarf mit Phosphataseinhibitoren (1 mM NaF, 1 mM NaVO₃). Die Zelldichte beträgt etwa $3 \cdot 10^8$ /ml. Die Zellen werden ca. 10 min auf Eis inkubiert,

um sie anschwellen zu lassen. Danach wird 10% (v/v) IGEPAL CA630 bis zu einer Endkonzentration von 0,125% (v/v) vorsichtig zugegeben und untergemischt. Unter dem Mikroskop werden die Zellen auf Lyse der Zellmembran untersucht. Falls die Zellmembran noch nicht aufgelöst ist, werden die Zellen im vorgekühlten Dounce-Homogenisator mit dem Pistill B mit einigen Stößen bearbeitet. Dabei wird immer wieder überprüft, ob schon bloße Zellkerne vorliegen. Sobald dies der Fall ist, werden die Zellkerne sedimentiert (200 g, 5 min, 4°C). Der Überstand (Cytosol) wird mit 11 Volumenprozent 10x S100-Puffer mit Proteaseinhibitoren (siehe oben) gemischt und in der Ultrazentrifuge von Organellen, Membranüberresten und anderen festen Bestandteilen abgetrennt (100.000 g, 1 h, 4°C). Dies ergibt die sogenannte S100-Fraktion. Das Kernpellet wird bei Bedarf mit etwas kaltem NEX A-Puffer versetzt. Man gibt tropfenweise und unter vorsichtigem Mischen 1 Volumen eiskalten NEX B-Puffer mit Proteaseinhibitoren (siehe oben) zu. Die Kerne werden 30 min auf dem Drehrad bei 4°C extrahiert und anschließend sedimentiert (15000 g, 10 min, 4°C). Sowohl die S100-Fraktion als auch der Kernextrakt können bei Bedarf gegen kalten BC100-Puffer dialysiert werden. Die Fraktionen werden in flüssigem Stickstoff weggefroren und bei -80°C aufbewahrt. Falls die extrahierten Kernpellets noch weiter verarbeitet werden, bietet es sich an, sie in TGME-Puffer aufzunehmen und bei Bedarf mit einem Dounce-Homogenisator vollständig zu resuspendieren. Auch die Kernpellets werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

NEX A-Puffer	10 mM HEPES (pH 7,9) 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 mM DTT
NEX B-Puffer	20 mM HEPES (pH 7,9) 400 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT 10% (v/v) Glycerin
10x S100-Puffer	30 mM MgCl ₂ 300 mM Tris-HCl (pH 6,8 bei RT) 1,4 M KCl 10 mM DTT
TGME-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,3 bei RT) 25% (v/v) Glycerin 5 mM MgCl ₂ 0,2 mM EDTA

DTT und die Proteaseinhibitoren werden immer kurz vor Gebrauch frisch zugesetzt.

3.4.2 Herstellung von Kernextrakten aus Jurkat Zellen (NAM-Protokoll)

Nach dem Sedimentieren der Jurkat J6 Zellen (3000 rpm, Beckman J6, 15 min, 4°C) werden die Pellets mit wenig Überstand in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (200 g, 5 min, 4°C) wird der restliche Überstand entfernt. Die Zellen werden in ca. 45 ml 1x PBS gewaschen und erneut sedimentiert (200 g, 5 min, 4°C). Anschließend wird das Volumen des Pellets (PCV, *packed cell volume*) bestimmt.

Die nachfolgenden Schritte werden alle bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Die sedimentierten Zellen werden in 4 PCV Niedrigsalzpuffer aufgenommen und abzentrifugiert (200 g, 5 min, 4°C). Danach werden die Pellets in 2 PCV Niedrigsalzpuffer resuspendiert und solange inkubiert, bis die Zellen in dem hypotonischen Puffer angeschwollen sind, im Normalfall 15–30 min. Die Volumenzunahme wird regelmäßig unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Zellsuspension wird dann in einen vorgekühlten Glashomogenisator nach Dounce überführt und durch harte Stöße mit dem Pistill (Typ B) bearbeitet, bis die Cytoplasmamembran der Zellen platzt. Auch dieser Arbeitsschritt wird regelmäßig im Lichtmikroskop (Phasenkontrast) kontrolliert. Die Zellkerne müssen bei der Prozedur intakt bleiben. Sie werden anschließend sedimentiert (Heraeus Biofuge 2.0RS, 1540 rpm, 15 min, 4°C) und in einem halben Volumenteil des Pellets (NPV, *nuclear pellet volume*) an kaltem Niedrigsalzpuffer resuspendiert. Innerhalb von 30 min wird zu der Suspension langsam unter vorsichtigem Mischen 1,5 NPV Hochsalzpuffer zugetropft. Nach weiteren 60 min Inkubation auf dem Drehrad wird der Extrakt abzentrifugiert (Sorvall SS34, 17500 rpm, 30 min, 4°C). Der Kernextrakt (Überstand) wird in einen Dialyseschlauch überführt und gegen BC0 dialysiert, bis die Leitfähigkeit von BC100 erreicht ist, üblicherweise etwa 50 min. Nach einer weiteren Zentrifugation (Sorvall SS34, 18000 rpm, 20 min, 4°C) zum Klären des dialysierten Extrakts wird es in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Niedrigsalzpuffer 10 mM Tris-HCl (pH 7,3 bei RT)
1,5 mM MgCl₂
10 mM KCl

Hochsalzpuffer 20 mM Tris-HCl (pH 7,3 bei RT)
25% (v/v) Glycerin
420 mM NaCl
1,5 mM MgCl₂
0,2 mM EDTA

Zu allen Puffern werden 5 mM DTT, Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Leupeptin) und Phosphataseinhibitoren (1 mM NaVO₃, 1mM NaF) kurz vor Gebrauch frisch zugesetzt.

3.4.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Gesamtzellextrakte werden mit 2x Harnstoff/SDS-Puffer oder 2x SDS-Puffer hergestellt. Dazu werden die Zellen zweimal in 1x PBS gewaschen und sedimentiert (200 g, 10 min, RT). Die Zellen werden in einem Volumen 1x PBS resuspendiert, und ein Volumen des jeweiligen Puffers wird zugegeben. Die Endkonzentration beträgt $0,5\text{--}3\cdot 10^4$ Zellen pro ml. Nach gründlichem Mischen auf dem Vortex werden die Proben 5–10 min bei 95°C inkubiert und zwischendurch immer wieder gründlich gemischt. Falls die Zellen in 2x SDS-Puffer (Sambrook et al., 1989) lysiert wurden, sollten sie anschließend sonifiziert werden. Für das Sonifizieren mit dem Branson Sonifier 250–D muss das Probenvolumen mindestens 0,5 ml betragen (fünfmal 5 s bei einer Pulsstärke von 50%). Andernfalls können die Proben in einem Ultraschall-Wasserbad behandelt werden, bis sie dünnflüssig sind. Auch die Proben in Harnstoff/SDS-Puffer können bei Bedarf mit Ultraschall nachbehandelt werden. Gesamtzellextrakte in SDS- oder Harnstoff/SDS-Puffer können bei -20°C über Monate hinweg aufbewahrt werden.

Falls die Gesamtzellextrakte nicht nur für SDS-PAGE benutzt werden sollen, bietet sich die Verwendung eines anderen Lysis-Puffers an. Die Zellen werden hierfür einmal in 1x PBS gewaschen und abzentrifugiert (200 g, 10 min, RT). Nach Resuspension in etwa 1 ml 1x PBS werden die Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert (5 min, 4°C , 400–1500 g je nach Zellart). Die Zellen werden in einem Volumen 1x PBS resuspendiert, und ein Volumen 2x Lysis-Puffer wird zugegeben. Die Endkonzentration beträgt ca. $1,2\cdot 10^4$ Zellen pro μl . Die Proben werden gründlich auf dem Vortex gemischt und dann 10 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation werden sie immer wieder gründlich gemischt. Zur vollständigen Lysis werden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei 37°C wieder aufgetaut. Dieser Gefrier- und Auftau-Schritt wird einmal wiederholt. Noch übrige, feste Bestandteile werden in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C für 10 min sedimentiert. Die fertigen Gesamtzellextrakte werden bei -80°C gelagert.

2x SDS-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 6,8) 200 mM DTT 4% (w/v) SDS 0,2% (w/v) Bromphenolblau 20% (v/v) Glycerin
2x Harnstoff/SDS-Puffer	150 mM Tris-HCl (pH 6,8) 10 mM DTT oder 20 mM β -Mercaptoethanol 8 M Harnstoff 4% (w/v) SDS 0,5% (w/v) Bromphenolblau
1x Lysis-Puffer	25 mM Tris-Phosphat (pH 7,8) 2 mM DTT 2 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure

10% (v/v) Glycerin
1% Triton X-100

Der Lysispuffer ist als 5x *Luciferase Cell Culture Lysis Buffer* von der Firma Promega erhältlich.

3.4.4 Herstellung von Zellfraktionen

Zellfraktionen wurden ähnlich dem Protokoll von He et al. (1990) hergestellt. Im Unterschied zu diesem Protokoll wurde weniger DNase I eingesetzt, so dass im Pellet stark an Chromatin gebundene Proteine zurückbleiben.

Die Zellen werden zweimal in 1x PBS gewaschen, sedimentiert (200 g, 10 min, RT) und dabei in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Sediment wird in kaltem CSK-Puffer resuspendiert, so dass die Zelldichte ca. $1,65 \cdot 10^8$ Zellen pro ml beträgt. Nach dreiminütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen abzentrifugiert (5000 g, 4°C, 3 min). Im Überstand befinden sich lösliche Proteine aus dem Cytoplasma und Kern. Die Zellen werden in kaltem CSK-Puffer mit einer Konzentration von $1,24 \cdot 10^8$ pro ml aufgenommen. Zu den Proben werden 3,3 U DNaseI (RNase-frei) pro ml gegeben. Anschließend werden sie 15 min bei RT unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Dann wird langsam 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in CSK-Puffer bis zu einer Konzentration von 0,25 M zugefügt. Die Proben werden sedimentiert (30000 g, 4°C, 10 min). Der Überstand ist die Ammoniumsulfatfraktion. Zum Sediment wird langsam 2 M NaCl in kaltem CSK-Puffer zugegeben, so dass die Zelldichte $1,6 \cdot 10^8$ Zellen pro ml entspricht. Nach 5 min Inkubation auf dem Drehrad im Kühlraum werden die Proben sedimentiert (30000 g, 4°C, 5 min). Der Überstand ist die Waschfraktion. Das Sediment enthält stark an Chromatin gebundene Proteine und die nukleäre Matrix.

CSK-Puffer 10 mM PIPES (pH 6,8)
100 mM NaCl
300 mM Saccharose
3 mM MgCl_2
1 mM EGTA
0,5% (v/v) Triton X-100

Für die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - und die NaCl-Lösung wird als Grundlage ein CSK-Puffer ohne Triton X-100 benutzt.

Zu allen Puffern wird frisch 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin zugefügt. Zur Vermeidung von Dephosphorylierung werden die Phosphataseinhibitoren NaF (1 mM) und NaVO_3 (1 mM) zugesetzt.

3.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Proteingemischen kann nach der Methode von Bradford bestimmt werden. Der Nachweis beruht auf der Beobachtung von Bradford, wonach das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie-Brillantblau nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Zunächst wird eine Eichkurve mit BSA erstellt. Dafür werden 1–20 μg BSA mit 1 ml Farblösung (Coomassie-Brillantblau, Phosphorsäure, Methanol) gemischt, die zuvor 1:5 mit Wasser verdünnt und filtriert wurde. Nach fünfminütiger Inkubation wird die Extinktion bei 595 nm gegenüber dem Leerwert bestimmt. Mit den Proteinproben wird analog verfahren. Die Proteinkonzentrationen werden aus der Eichkurve abgelesen.

3.5 Immunochemische Methoden

3.5.1 Western Blot zum Nachweis filtergebundener Proteine

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

Zunächst werden die Proteinfraktionen über SDS-PAGE (s. 3.3.2) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird das Gel unter Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran gelegt, welche an allen vier Seiten des Gels 0,5 cm über dieses hinausragt. Zwischen zwei Doppellagen aus 3MM Papier (Whatman), das mit Transferpuffer angefeuchtet ist, werden die Proteine in einer *SemiDry* Elektrobplot-Apparatur (BioRad) auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer wird bei 15 V und 480 mA für 60–90 min bei Gelen mit einer Größe von 16 cm \times 18 cm und für 20–30 min bei Gelen mit einer Größe von 10 cm \times 10–12 cm durchgeführt. Dann wird die Membran kurz in H_2O (bidest.) geschwenkt. Die Nitrocellulosemembran sollte dabei und bei allen nachfolgenden Schritten ausschließlich mit einer Pinzette angefasst werden. Der erfolgreiche Transfer wird

durch das Anfärben des Blots mit 1x Ponceau S-Lösung überprüft, wobei die Banden des Protein-Molekulargewichtsstandards angezeichnet werden. Der Blot wird durch Waschen in 1x TBS wieder entfärbt. Die Behandlung mit Ponceau S fixiert gleichzeitig die Proteine auf der Membran.

Alternativ zu einer Nitrocellulosemembran kann auch eine PVDF-Membran verwendet werden. Der Transfer erfolgt so, wie für die Nitrocellulosemembran beschrieben wurde, außer dass die Membran zunächst mit Methanol benetzt werden muss, bevor sie mit Transferpuffer oder anderen wässrigen Lösungen in Kontakt kommt. Die Überprüfung des Transfers erfolgt dann nicht mit Ponceau S, sondern mit Amidoschwarz. Dazu wird die Membran sofort nach dem Transfer in H₂O (bidest.) gewaschen und dann in Amidoschwarzfärbelösung geschwenkt. Unspezifisch gebundenes Amidoschwarz wird in Entfärbelösung abgewaschen, und der Blot in 1x PBS neutralisiert. Zum Einscannen kann die Membran nun getrocknet werden. Der trockene Blot wird durch kurzes Waschen in Methanol wieder entfärbt. In den weiteren Schritten werden Nitrocellulose- und PVDF-Membran gleich behandelt. Zu beachten ist aber, dass eine trockene PVDF-Membran immer zunächst mit Methanol benetzt werden muss, bevor sie mit wässrigen Lösungen in Kontakt kommen darf.

Die Membran mit den gebundenen Proteinen wird zunächst 90 min in 1x TBS mit 6% (w/v) Magermilchpulver bei RT (alternativ 4°C ü/N) geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Matrix abzusättigen. Für die anschließende Inkubation mit dem ersten Antikörper (60 min) werden Verdünnungen von 1:500 bis 1:10000 in TBS-T verwendet. Die Membran wird zweimal je 30 min mit TBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper wird 1:2000 bis 1:5000 verdünnt in TBS-T eingesetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation wird die Membran zweimal 15–20 min für AP-gekoppelte Sekundärantikörper oder zweimal 1 h für HRP-gekoppelte Sekundärantikörper in TBS-T gewaschen. Anschließend folgt ein kurzer Waschschrift in TBS.

Nachweis der Proteine über Chemolumineszenz: Peroxidase(HRP)-gekoppelte Antikörper werden über eine photochemische Reaktion nachgewiesen. Zunächst wird die Membran kurz in bidestilliertem Wasser gewaschen, um Reste des Tris-Puffers (pH 7,6) zu entfernen. Tris-Puffer würde bei der anschließenden Detektion bei pH 8,5 stören. Danach wird die Membran kurz mit Papier (Kimwipes) abgetupft. Sie wird sofort feucht mit den 1:1 gemischten Reagenzienlösungen (*Enhanced ECL Western blotting reagents 1 und 2*, NEN) für 1 min inkubiert, wobei 0,125 ml/cm² Membran verwendet werden. Überschüssiges Reagenz lässt man abtropfen. Der Nachweis erfolgt durch Exposition (10 s–15 min) der in Frischhaltefolie eingewickelten Membran auf einem Film (X-OMAT, Kodak) in einer Autoradiographie-Kassette. Das emittierte Licht (428 nm) stammt aus der Oxidation von Luminol zu 3-Aminophtalsäure und molekularem Stickstoff in der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und p-Coumarsäure.

Nachweis der Proteine über Ausbildung eines schwerlöslichen Farbstoffes: Alkalische Phosphatase(AP)-gekoppelte Antikörper werden über die Bildung eines Farbstoffpräzipitats, bestehend aus einem Indigoderivat (blau) und Diformazan (purpur), nachgewiesen. Das Indigoderivat bildet sich nach Hydrolyse der Phosphatgruppe am 5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) durch Oxidation mit molekularem Sauerstoff. Bei dieser Reaktion entstehen zwei Protonen, die mit Nitroblautetrazolium (NBT) zum Diformazan reagieren. Die Membran wird in einer Färbelösung (AP-Puffer mit 33 μ l BCIP-Lösung/10 ml und 66 μ l NBT-Lösung/10 ml) 5–20 min inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen mit Wasser wird die Reaktion abgestoppt.

Falls eine Membran nacheinander mit verschiedenen Antikörpern analysiert werden soll, können die Antikörper durch entsprechende Behandlung entfernt werden. Allerdings ist dabei zu beachten, dass die weiteren Detektionen nicht mehr quantifiziert werden können, da möglicherweise gebundene Proteine von der Membran abgelöst werden. Zur Entfernung der Antikörper wird die Membran 30 min bei 70°C in *stripping* Puffer inkubiert und anschließend mehrmals zum Neutralisieren in 1x TBS gewaschen (Harlow und Lane, 1999).

Transferpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 20% (v/v) Methanol optional 0,03% (w/v) SDS
1x TBS	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 150 mM NaCl
TBS-T	0,05% (v/v) Tween-20 in TBS
10x Ponceau S	2% (w/v) Ponceau S 30% (w/v) Trichloressigsäure 30% (w/v) 5-Sulfosalicylsäure
Entfärbelösung	25% (v/v) Isopropanol 1% (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz-Färbelösung	0,1% (w/v) Amidoschwarz in Entfärbelösung
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP in 100% DMF, bei -20°C lagern
NBT-Lösung	100 mg/ml NBT in 70% (v/v) DMF, bei -20°C lagern
AP-Puffer	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM Tris-HCl (pH 8,8)
<i>stripping</i> Puffer	2% (w/v) SDS 50 mM DTT 50 mM Tris-HCl (pH 7,0)

3.5.2 Immunaффinitätschromatographie

Die Immunaффinitätschromatographie wird oft kurz als Immunpräzipitation (IP) bezeichnet. Bei dieser Methode werden Antikörper an einer Matrix als funktionelle Affinitätsgruppen immobilisiert. Wird das Säulenmaterial mit einem Proteingemisch inkubiert, interagieren nur solche Proteine, deren Epitope von der Antigenbindungsstelle des Antikörpers erkannt werden. Dies ermöglicht die gezielte Isolierung einzelner Proteine aus einem Gemisch. Als Matrix wird Protein G- oder Protein A-Sepharose verwendet, auf deren Oberfläche bakterielle Proteine (Protein G oder A) gebunden sind. Protein G oder A interagieren spezifisch mit der konstanten Region von Immunglobulinen (Antikörpern). Dies ermöglicht die Kopplung von beliebigen Antikörpern an das Säulenmaterial.

Für alle Arbeiten mit nativen Proteinen werden silikonisierte Reaktionsgefäße verwendet. Protein G- oder Protein A-Sepharose wird in aufeinander folgenden Schritten mit bidestilliertem Wasser und 1x PBS äquibriert. Die Konzentration des monoklonalen Antikörpers wird photometrisch bestimmt. Die Kopplungsreaktion findet in 1x PBS bei Raumtemperatur über Nacht statt. Antikörper können in unterschiedlicher Dichte auf der Säule immobilisiert werden, indem man das Verhältnis Säulenvolumen (ml) zur absoluten Antikörpermenge (mg) variiert. Dabei wird bis zu einer Dichte von 2 mg/ml davon ausgegangen, dass alle Antikörper quantitativ von Protein G oder A gebunden werden.

Nach der Inkubation wird durch Zentrifugation (Heraeus Varifuge 3.0R, 900 rpm, 2 min, 4°C) der Überstand abgetrennt, und das Säulenmaterial zweimal mit 1x PBS gewaschen. Um das Material gegen mikrobielle Kontamination zu schützen, kann 0,01% (w/v) NaN_3 zugegeben werden. Das Säulenmaterial wird als 1:5-Suspension in 1x PBS bei 4°C aufbewahrt.

Sollen die Antikörper gebundenen Proteine mit denaturierenden Chemikalien eluiert werden, bietet es sich an, die Antikörpermoleküle kovalent an das Säulenmaterial zu koppeln. Andernfalls enthält das Eluat oft Antikörperketten, die bei einer Färbung stören oder bei einer Western Blot Analyse (s. 3.5.1) Kreuzreaktionen verursachen können. Für die kovalente Kopplung äquibriert man die an Protein G- oder Protein A-Sepharose gebundenen Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 10 Säulenvolumen an 0,2 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH 9,0 bei RT). Die Säule wird dann in 10 Säulenvolumen Kopplungspuffer aufgenommen und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das Material mit 10 Säulenvolumen 0,2 M Ethanolamin gewaschen und zwei Stunden bei RT in 10 Säulenvolumen 0,2 M Ethanolamin inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBS kann das Säulenmaterial bei 4°C nach der Zugabe von 0,01% (w/v) NaN_3 gelagert werden.

Alle Arbeitsschritte einer Immunpräzipitation werden bei 4°C durchgeführt. Das Säulenmaterial wird in silikonisierten Reaktionsgefäßen vorgelegt und durch zweimaliges Waschen in IP-Puffer äquibriert. Das Material wird sedimentiert (Eppendorf 5147, 1000 rpm, 1 min, 4°C), und der Überstand vorsichtig entfernt. Die Proteinlösung bzw. der Kernextrakt wird zum Säulenmaterial pipettiert. Bewahrt

haben sich folgende Bedingungen: 10 μl des Säulenmaterials (1 mg Antikörper/ml Säulenmatrix) werden mit 100 μg Kernextrakt in einem Gesamtvolumen von 100 μl zwei Stunden bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Das Säulenmaterial wird dreimal mit 50 Säulenvolumen an kaltem IP-Puffer gewaschen und anschließend mit 1x SDS-Auftragspuffer (s. 3.3.2) 10 min bei 65°C eluiert. Für kleine Elutionsvolumina bzw. hohe Proteinkonzentrationen bietet sich die Elution in MicroSpin-Reaktionsgefäßen an. Die Proteinlösung bzw. der Kernextrakt kann mit reiner Protein G-Sepharose oder mit einem unspezifischen Kontrollantikörper, der an Protein G-Sepharose gekoppelt ist, vorinkubiert werden, um eine höhere Reinheit der isolierten Proteine zu erhalten. Der Durchfluss dieser Vorsäulen wird dann wie oben beschrieben mit der spezifischen Antikörpersäule inkubiert.

Kopplungspuffer 0,2 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH 9,0 bei RT)
20 mM Dimethylpimelimidat (DMP)

IP-Puffer 20 mM Tris-HCl (pH 7,3)
1 mM EDTA
150 mM KCl
20% (v/v) Glycerin

Zum Puffer werden frisch Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin) und Phosphataseinhibitoren (1 mM NaVO_3 , 1 mM NaF) zugegeben.

3.5.3 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen für die Analyse mit dem konfokalen Mikroskop

Da Suspensionszellen nicht auf Objektträgern adhären, werden für T-Zellen Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger benutzt, auf denen Zellen chemisch fixiert werden. Die Zellen werden gründlich in 1x PBS gewaschen, sedimentiert (200 g, 10 min, RT) und mit einer Konzentration von $1-2 \cdot 10^6/\text{ml}$ in 1x PBS resuspendiert. Die Suspension wird auf vorbereitete Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgetragen, auf die Felder mit einem Fettstift markiert wurden. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 37°C im feuchten Brutschrank werden die Objektträger vorsichtig in 1x PBS gewaschen. Zum Fixieren wird 3% (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS auf die Zellen getropft. Die Paraformaldehydlösung muss immer frisch hergestellt oder bei -20°C aufbewahrt werden. Die Zellen werden 10 min bei RT in Paraformaldehyd fixiert. Danach werden die Objektträger zweimal in 1x PBS gewaschen, und das restliche Paraformaldehyd wird durch dreißigminütige Inkubation bei RT mit 2% (w/v) Glycin in 1x PBS abgefangen. Nach weiteren zwei Waschschritten mit 1x PBS werden die Zellen 10 min mit 0,2% (v/v) Triton X-100 in 1x PBS permeabilisiert.

Alternativ können die Zellen auch 2 min mit -20°C kaltem Methanol fixiert werden. Der sogenannte *quenching*-Schritt mit Glycin und der Permeabilisierungsschritt entfallen dann.

Die Zellen werden anschließend bei RT 10 min mit 0,2% (v/v) Gelatine aus Kaltwasserfisch in 1x PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Nach Entfernen der Lösung wird der betreffende Antikörper unverdünnt oder bis zu einer Verdünnung von 1:100 in 1x PBS aufgetragen. Die Objektträger werden 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem gründlichen Waschen in 1x PBS werden die Zellen mit dem zweiten, an einen Farbstoff gekoppelten, Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:400 in 1x PBS 30 min bei RT in einer abgedunkelten, feuchten Kammer behandelt. Danach werden die Zellen drei- bis viermal in 1x PBS gewaschen. Falls die Zellkerne angefärbt werden sollen, wird 1–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A in 1x PBS auf die Proben aufgetragen. Nach 20 min Inkubation bei 37°C werden die Objektträger mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumiodid in 1x PBS 5 min bei RT behandelt. Es folgen vier letzte Waschschriffe mit 1x PBS. Dann wird Eindeckmedium auf die Proben gegeben, und die Objektträger werden vorsichtig mit Deckgläsern abgedeckt. Die Proben können nach Antrocknen des Eindeckmediums im Fluoreszenzmikroskop oder im konfokalen Mikroskop betrachtet werden. Die Objektträger sollten bei 4°C dunkel aufbewahrt werden und innerhalb weniger Tage nach der Färbung analysiert werden.

3.5.4 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer

Für die Analyse im Durchflusszytometer werden ca. $0,5$ bis $1,5 \cdot 10^7$ Zellen pelletiert, in 20 μl Medium aufgenommen und mit dem spezifischen Antikörper gemischt. Nach dreißigminütiger Inkubation im Kühlschrank werden die Zellen in 1x PBS gewaschen, erneut pelletiert und in 50 μl 1x PBS aufgenommen. Nach Zugabe des zweiten Antikörpers, der an einen Farbstoff gekoppelt ist, werden die Proben 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Die Zellen werden in 1x PBS gewaschen, in 50 μl 1x PBS resuspendiert und in 3 ml 3% (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS ü/N im Kühlschrank fixiert. Am nächsten Tag werden die Zellen erneut pelletiert und in 2% (w/v) Glycin in 1x PBS 10 min im Kühlschrank inkubiert, um überschüssiges Formaldehyd abzufangen. Für die Analyse im Durchflusszytometer werden die gefärbten Zellen in 1 ml 1x PBS resuspendiert.

3.6 Zellzyklus-Analyse

Die Phase des Zellzyklus, in der sich eine Zellpopulation befindet, kann durch das Anfärben von DNA für die Durchflusszytometrie bestimmt werden. In der G_1 - bzw. G_0 -Phase enthält eine Zelle den einfachen Chromosomensatz, in der G_2 -Phase und der Mitose den doppelten Chromosomensatz. Während der S-Phase wird die DNA verdoppelt, d. h. die DNA-Menge liegt zwischen dem einfachen und dem doppelten Chromosomensatz. Durch das Anfärben der DNA mit einem interkalierenden Färbereagenz kann die in der Zelle enthaltene DNA-Menge und

damit die Phase des Zellzyklus mit Hilfe eines Durchflusszytometers bestimmt werden.

$1-3 \cdot 10^6$ Zellen werden zweimal in 1x PBS gewaschen und jeweils bei 200 g und RT 10 min sedimentiert. Der Überstand wird bis auf 200 μ l entfernt. Die Zellen werden in der restlichen Flüssigkeit 10 s auf dem Vortex gemischt. 1 ml kaltes 70% (v/v) Ethanol wird Tropfen für Tropfen unter Mischen auf dem Vortex zugegeben. Die Zellen werden mindestens 12 h bei 4°C fixiert und können in diesem Zustand für mehrere Monate bei 4°C aufbewahrt werden. Nachdem die Zellen sedimentiert (1830 g, 5 min, RT) und der Überstand entfernt wurde, werden sie in wenig restlichem Ethanol auf dem Vortex resuspendiert. Die Färbelösung wird frisch angesetzt, und 1 ml wird zu den Zellen gegeben. Nach einer mindestens dreißigminütigen Inkubation bei RT werden die Zellen analysiert. Die Analyse der Proben muss innerhalb von 24 h nach der Färbung erfolgen (Coligan et al., 1994).

Propidiumiodidstammlösung 100 mg Propidiumiodid
100 ml H₂O (bidest.)
Die Lösung wird durch einen 0,22 μ m-Filter filtriert
und dunkel bei 4°C aufbewahrt.

Färbelösung 0,5 ml Propidiumiodidstammlösung
1000 Kunitz Units RNase A (Endkonz. 100 U/ml)
10 ml 1x PBS mit 0,1% (w/v) Glucose
Die Lösung wird immer frisch angesetzt.

3.7 Methyltransferase-Aktivitätstest

3.7.1 Test mit Histonen

Methyltransferase-Aktivitäten werden in 1x MAB-Puffer mit Proteaseinhibitoren (4 μ g/ml Aprotinin, 4 μ g/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin) analysiert (Rea et al., 2000). Die Reaktionen werden in einem Gesamtvolumen von 20–50 μ l durchgeführt und enthalten 4–10 μ g freie Histone aus Kalbsthymus. Nach Zugabe von 16–40 nCi S-Adenosyl-[Methyl-¹⁴C]-L-Methionin zum Starten der Reaktion werden die Proben 60–90 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wird den Proben SDS-Auftragspuffer zugefügt. Die Proben werden auf SDS-Polyacrylamidgelen (18% (200:1); Thomas und Kornberg, 1978; s. a. 3.3.2) in speziellem 1x TGS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen nach der Western Blot Methode transferiert. Die Methylierung wird auf einem *Direct Imager* oder durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

2x MAB-Puffer 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)
40 mM KCl
20 mM MgCl₂

20 mM β -Mercaptoethanol
500 mM Saccharose

5x TGS, spezial 250 mM Tris
1,9 M Glycin
0,5% (w/v) SDS

3.7.2 Peptidtest

Die Spezifität von Methyltransferase-Aktivitäten kann mit Hilfe von geeigneten Peptiden analysiert werden. Dazu werden die Proben in 1x MAB-Puffer mit Proteaseinhibitoren (s. 3.7.1) in einem Gesamtvolumen von 25 μ l mit 1–5 μ g Peptid gemischt. Zum Starten der Reaktion fügt man 275 nCi S-Adenosyl-[Methyl- 3 H]-L-Methionin zu. Nach 60–90 min Inkubation bei 30°C werden die Proben auf P81-Papier aufgetragen. Nach ca. 15 min Trocknen wird das Papier dreimal 5 min in 50 mM Natriumcarbonatpuffer (pH 9,2) gewaschen, um freies S-Adenosyl-[Methyl- 3 H]-L-Methionin zu entfernen. Das getrocknete Papier wird zusammen mit LSC-Cocktail in Messflaschen gegeben und im Szintillationszähler gemessen, um die Menge eingebauter Methylgruppen zu bestimmen.

3.8 ChIP (Chromatinimmunpräzipitation)

Die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) wurde als Methode entwickelt, mit der man die Anwesenheit von bestimmten Proteinen auf spezifischen DNA-Sequenzen *in vivo* nachweisen kann. Dazu werden die Bestandteile von Zellen zunächst chemisch quervernetzt. Mit den anschließend präparierten Gesamtzellextrakten werden Immunpräzipitationen gegen die gewünschten Proteine durchgeführt. Man kann dann überprüfen, ob ein Protein auf einer bestimmten DNA-Sequenz präsent ist, indem man eine spezifische PCR aus dem Immunpräzipitat gegen das Protein durchführt. War das Protein an die Sequenz gebunden, wurde es an die DNA quervernetzt, und die Sequenz kann im Präzipitat nachgewiesen werden. Lag keine Bindung vor, erhält man in der PCR kein Signal, da die Sequenz nicht im Immunpräzipitat enthalten ist. Man kann die Mengen des gebundenen Proteins relativ quantifizieren, indem man die Menge des PCR-Produkts mittels radioaktiven Nukleotiden oder interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt und mit dem PCR-Produkt aus dem ursprünglichen Gesamtzellextrakt vergleicht.

3.8.1 Herstellung von quervernetzten Zellextrakten

Chromatinimmunpräzipitationen wurden mit der Tumorzelllinie Jurkat oder mit primären naiven oder stimulierten T-Zellen in Anlehnung an das Protokoll von Schepers et al. (2001) durchgeführt. Jurkat Zellen werden dazu bei einer Dichte von etwa $5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml geerntet, primäre T-Zellen bei $0,7\text{--}2 \cdot 10^6$ Zellen

pro ml. Die primären T-Lymphozyten werden bei der Ernte zusätzlich mit Hilfe von Trypsin/EDTA von den Zellkulturflaschen abgelöst. Man wäscht die Zellen zweimal mit 1x PBS und resuspendiert sie anschließend in 37°C warmem, serumfreiem RPMI 1640-Medium. Jurkat Zellen werden mit einer Dichte von ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml, primäre T-Zellen mit ca. $0,7\text{--}2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert. Die Zellen werden mit Formaldehyd (Endkonzentration 1% (v/v)) für 10 Minuten bei RT unter vorsichtigem Mischen quervernetzt. Man stoppt die Reaktion durch Zugabe von 125 mM Glycin (Endkonzentration). Die Zellen werden bei 200 g pelletiert und zweimal mit kaltem 1x TBS (s. 3.5.1) gewaschen. Nach diesem Schritt können die fixierten Zellen bei -80°C gelagert werden.

Das Zellpellet wird in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml TE-Puffer aufgenommen. Dazu gibt man 300 μl TE-Puffer und 200 μl 20% (w/v) N-Laurylsarcosin, um die Zellmembranen aufzulösen. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler wird die Dichte der Proben durch Zugabe von 567,8 mg CsCl/ml auf $1,42 \text{ g/cm}^3$ eingestellt. Die Zellextrakte werden vorsichtig auf je 9 ml CsCl in TE-Puffer mit einer Dichte von $1,42 \text{ g/cm}^3$ geschichtet. Diese Dichte entspricht einer Konzentration von 567,8 mg/ml. Die Proben werden 24 h bei 37000 rpm in einem SW41 Rotor bei 18°C zentrifugiert.

Das quervernetzte Zellmaterial setzt sich im mittleren Bereich des Gradienten ab, während sich oben lösliche Proteine befinden. Nach vorsichtigem Entfernen der oberen Lösungsschicht nimmt man das quervernetzte Zellmaterial mit Hilfe einer Pinzette oder einer Pipette ab. Je nach Beschaffenheit werden die Proben im Falle eines Pellets über Nacht bei 4°C in TE-Puffer inkubiert oder im Falle kleiner Partikel dreimal in TE-Puffer gewaschen, um das CsCl zu entfernen. Das Zellmaterial wird in 1 ml TE-Puffer aufgenommen, mit Proteaseinhibitoren versetzt (2,5 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin) und auf einer Eis-Alkohol-Mischung bis zu einer DNA-Fragmentlänge von 250–2000 bp sonifiziert. Die Bedingungen zum Sonifizieren sind 25–50% Pulsstärke und 30 s Pulslänge. Die Größe der sonifizierten DNA wird nach Proteinase K-Verdau mittels Agarosegel-Elektrophorese (s. 3.3.1) überprüft. Vor der Weiterbearbeitung werden die Proben 5 min bei 16100 g abzentrifugiert, um unlösliche Partikel zu entfernen. Bei Bedarf klärt man die Proben mittels Zentrifugation durch PVDF-Micro-Spin-Röhrchen (Porengröße 0,45 μm) bei 2300 g und 4°C.

3.8.2 Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation werden je 50–125 μg DNA eingesetzt. Man stellt die Proben durch Zugabe einer 11x Stammlösung auf 1x NET-Puffer-Bedingungen ein und versetzt sie mit Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 4 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 4 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 4 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin A). Das Gesamtvolumen beträgt 500 μl . Je nach Antikörper werden 30 μl Protein A- oder G-Sepharose, die zuvor in 1x NET-Puffer äquilibriert worden sind, zugegeben. Die Proben werden 1 h bei 4°C am Überkopfschüttler inkubiert, um an die Säulenma-

trix bindende Proteine zu entfernen. Man pelletiert die Sepharose bei 400 g und 4°C 3 min und überführt den Überstand in ein neues Reaktionsgefäß. Nachdem der entsprechende Antikörper, 0,05 mg/ml BSA und 8 µg/ml Lachssperma-DNA (Endkonzentrationen) zugefügt worden sind, werden die Proben ü/N bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Danach werden die Proben bei 16100 g und 4°C für 15 min abzentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Nach Überführung der Überstände in silikonisierte Reaktionsgefäße werden je nach Antikörper 50 µl Protein A- oder G-Sepharose zugefügt. Man inkubiert die Proben für 4–6 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Das Säulenmaterial wird dreimal in RIPA-Puffer, dreimal in LiCl-Waschpuffer und zweimal in TE-Puffer gewaschen (je 3 min Zentrifugation bei 400 g und 4°C).

Die Sepharose wird in 150 µl 1% SDS in TE bei RT für 15 min eluiert und dabei immer wieder vorsichtig gemischt. Restliche Proteine werden ü/N bei 56°C durch Zugabe von 15 µl 3 M NaCl und 1 µl 15,6 mg/ml Proteinase K abgebaut. Nach Chloroform-Extraktion (s. 3.2.2) werden der DNA 10 µg Glykogen als *carrier* und 2,5 Volumen eiskaltes absolutes Ethanol zur Präzipitation zugefügt. Die Präzipitation erfolgt mind. 1 h bei -80°C. Nach dem Pelletieren der DNA bei 16100 g und 4°C und Waschen mit 70% (v/v) Ethanol (-20°C) werden die Pellets jeweils in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur PCR werden 1,5 µl pro Reaktion eingesetzt.

Als Negativkontrollen werden Proben eingesetzt, denen kein Antikörper zugegeben wird. Ein Aliquot mit der eingesetzten DNA (50–125 µg) wird ohne Immunpräzipitation gefällt, damit man die präzipitierten DNA-Mengen in einer PCR quantifizieren kann. Diese Proben nennt man *input*.

11x NET-Puffer 1,65 M NaCl
 55 mM EDTA
 550 mM Tris-HCl (pH 7,4)
 5,5% (v/v) IGEPAL CA630

LiCl-Waschpuffer 250 mM LiCl
 0,5% (v/v) IGEPAL CA630
 0,5% (w/v) DOC
 1 mM EDTA
 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

3.9 Promotoranalyse *in silico*

Promotoranalysen wurden mit den Programmen *Eldorado*, *MatInspector* und *PromoterInspector* und den *Genomatic Sequence Tools* der Firma Genomatix durchgeführt (<http://www.genomatix.de>).

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Das Modellsystem: humane primäre T-Lymphozyten

Humane T-Lymphozyten aus Blut sind als Modellsystem zur Untersuchung globaler Regulationsmechanismen der Transkription besonders geeignet. Da sie primäre Zellen sind, ist in ihnen die physiologische Situation im Gegensatz zu Zelllinien vollständig erhalten. In Zelllinien, die durch Viren transformiert sind oder von Krebszellen abstammen, weichen Genexpression und metabolische Aktivität von „normalen“, gesunden Zellen ab. Allerdings stellt sich bei der Untersuchung primärer Zellen das Problem der Verfügbarkeit. Gesunde, primäre Zellen aus unterschiedlichen menschlichen Geweben sind im Normalfall nur in kleinen Mengen aus Biopsien oder von freiwilligen Spendern erhältlich. Primäre Lymphozyten fallen als ungenutzter Anteil von Blutspenden in größeren Mengen an. Blut von Spendern oder Eigenspendern wird in verschiedene Fraktionen aufgetrennt. Der sogenannte Buffy Coat, die leukozyten- und blutplättchenreiche Fraktion, findet dabei in der Transfusionsmedizin kaum Verwendung. Aus dieser Fraktion lassen sich Lymphozyten relativ einfach quantitativ aufreinigen (s. 4.1.1).

Ein weiterer Vorteil von T-Zellen ist, dass sie ein etabliertes Modell für Transkriptionsuntersuchungen sind. Lymphozyten aus menschlichem Blut sind ruhende Zellen mit geringer metabolischer Aktivität. Sie werden bei Stimulierung zunächst aktiviert und differenzieren dann zu spezialisierten Effektorzellen (s. 1.2.1). Dieser Vorgang ist mit erheblichen morphologischen Veränderungen und einem Anstieg der Transkriptionsaktivität verbunden. In zahlreichen Untersuchungen diente die Induktion T-zellspezifischer Gene nach Stimulierung als Modellsystem der Transkriptionsaktivierung (s. 1.2.3). Die Bedeutung der T-Lymphozyten für das Immunsystem und damit für die menschliche Gesundheit macht solche Untersuchungen nicht nur für die biologische Grundlagenforschung, sondern auch für die medizinische Forschung interessant.

4.1.1 Die Anreicherung humaner T-Zellen

Zur Isolierung von T-Lymphozyten wurden in den meisten Fällen Buffy Coats verwendet. Bei Bedarf von nur wenigen Lymphozyten wurde auf kleinvolumige Vollblutspenden (ca. 50 ml) von Freiwilligen zurückgegriffen. Buffy Coats entstehen bei der Auftrennung von Blut mittels starker Zentrifugation (ca. 4000 g; van Delden et al., 1998). Sie enthalten vor allem Blutplättchen und weiße Blutkörperchen (Lymphozyten, polymorphkernige Leukozyten und Monozyten). Als weitere Fraktionen fallen rote Blutkörperchen und blutplättchenarmes Plasma an.

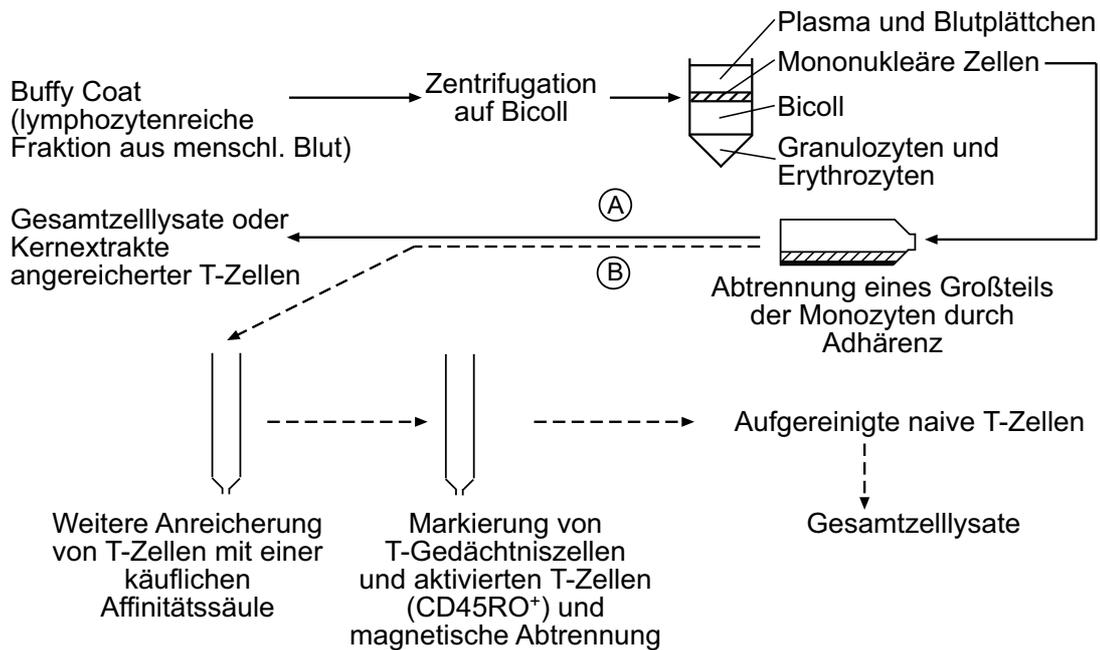


Abbildung 4.1: **Isolierung humaner T-Lymphozyten.** In der Skizze wird die Isolierung humaner primärer T-Zellen aus Buffy Coats, d. h. leukozytenreichen Fraktionen aus menschlichem Blut, beschrieben. In den meisten Fällen wurde eine einfache Anreicherung (A) durchgeführt. In Ausnahmefällen wurden durch zusätzliche Schritte naive T-Zellen aufgereinigt (B).

A) Einfache Anreicherung von T-Zellen Mononukleäre Zellen wurden aus Buffy Coats oder Blutspenden (s. o.) durch Dichtezentrifugation in Anlehnung an ein Protokoll von Bøyum (1968) angereichert. Dazu wurde eine verdünnte Buffy Coat Fraktion oder verdünntes Vollblut auf Bicoll geschichtet und durch Zentrifugation aufgetrennt. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren, während sich mononukleäre Zellen an der Phasengrenze zwischen Plasma und Bicoll ringförmig absetzen. Diese peripheren mononukleären Zellen aus Blut (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) enthalten laut Literatur zu etwa

60–70% T-Lymphozyten (Kaczmarek et al., 1987). T-Lymphozyten können anschließend relativ leicht weiter angereichert werden. Monozyten, die einen Teil der PBMC darstellen und die Vorläuferzellen von Makrophagen sind, adhäreren an Zellkulturkunststoffgefäßen. Im Überstand befinden sich dann überwiegend T-Lymphozyten und zu einem geringen Teil B-Zellen (s. Abb. 4.1A).

B) Aufreinigung naiver T-Zellen Periphere T-Lymphozyten des menschlichen Bluts lassen sich in Untergruppen aufteilen, unter anderem in naive T-Zellen und T-Gedächtniszellen. T-Gedächtniszellen entwickeln sich aus bereits aktivierten T-Lymphozyten und können längere Zeit in einem Ruhestadium überdauern. Sie unterscheiden sich von naiven T-Zellen dadurch, dass sie schneller und stärker auf einen Stimulus reagieren (Dutton et al., 1998). Während man im Nabelschnurblut Neugeborener noch kaum Gedächtniszellen findet, reichern sie sich im Blut mit zunehmendem Lebensalter an. Bei den verwendeten Buffy Coats, die von erwachsenen Personen stammen, kann man davon ausgehen, dass im Durchschnitt 40–50% der T-Lymphozyten Gedächtniszellen sind (Sanders et al., 1988; Aukrust et al., 1996).

Die Anreicherung von T-Lymphozyten aus Buffy Coats wurde um zusätzliche Aufreinigungsschritte erweitert, um die Abtrennung von T-Gedächtniszellen zu erreichen. Menschliche T-Gedächtniszellen unterscheiden sich von naiven T-Lymphozyten durch die Expression von CD45. Dieser Oberflächenmarker ist ein Transmembranprotein mit Tyrosinphosphatase-Aktivität, das die T-Zellaktivierung reguliert. In naiven T-Zellen wird das Protein in der Form CD45RA exprimiert. Nach Stimulierung wird die prä-mRNA des CD45-Gens alternativ gespleißt. Dabei werden einige Exons entfernt, wodurch die kürzere Form CD45RO gebildet wird (s. Abb. 4.2). In T-Gedächtniszellen bleibt die Expression von CD45RO erhalten. Damit eignet sich CD45RO gut, um spezifisch T-Gedächtniszellen und aktivierte T-Lymphozyten zu identifizieren und zu markieren.

Für die Aufreinigung naiver T-Zellen (s. Abb. 4.1B) wurden zunächst Monozyten und B-Zellen, die sich noch unter den angereicherten T-Lymphozyten befanden, mit Hilfe käuflicher T-Zell-Anreicherungsäulen entfernt. Dieser Vorreinigungsschritt ist notwendig, da auch B-Lymphozyten CD45RA exprimieren (Poppe et al., 1996) und somit im Weiteren zusammen mit naiven T-Zellen aufgereinigt würden. Die T-Zell-Anreicherungsäulen enthielten immobilisiertes IgG und immobilisierte IgG-spezifische Antikörper. Monozyten binden mit ihren Fc-Rezeptoren an IgG, während B-Zellen über ihre Oberflächen-IgG-Moleküle mit den spezifischen Antikörpern interagieren. T-Zellen, die keine Wechselwirkungen mit den immobilisierten Molekülen eingehen, sind „unberührt“ im Durchlauf enthalten. Die weiter angereicherten T-Lymphozyten wurden dann mit CD45RO-spezifischen Antikörpern inkubiert. Diese Antikörper waren an magnetische Partikel gekoppelt und markierten T-Gedächtniszellen und aktivierte T-Zellen. In magnetisierten Stahlwollensäulen wurden die markierten CD45RO⁺ Zellen gebun-

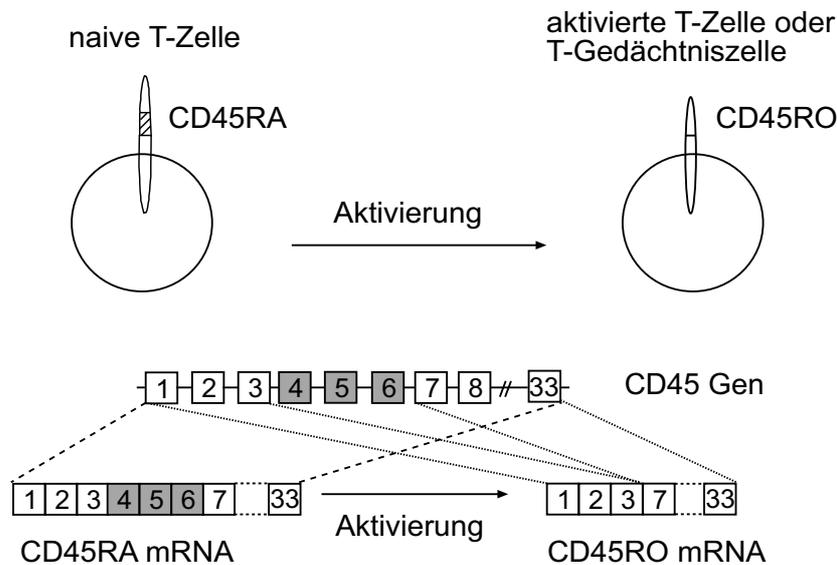


Abbildung 4.2: **Alternatives Spleissen von CD45 RNA.** Nach der Aktivierung wird die mRNA des Oberflächenmarkers CD45 alternativ gespleißt. Dies lässt sich zur Unterscheidung naiver T-Zellen ($CD45RA^+$) von aktivierten T-Zellen und T-Gedächtniszellen (beide $CD45RO^+$) heranziehen (Skizze nach Janeway und Travers, 1995, Kap. 9.24).

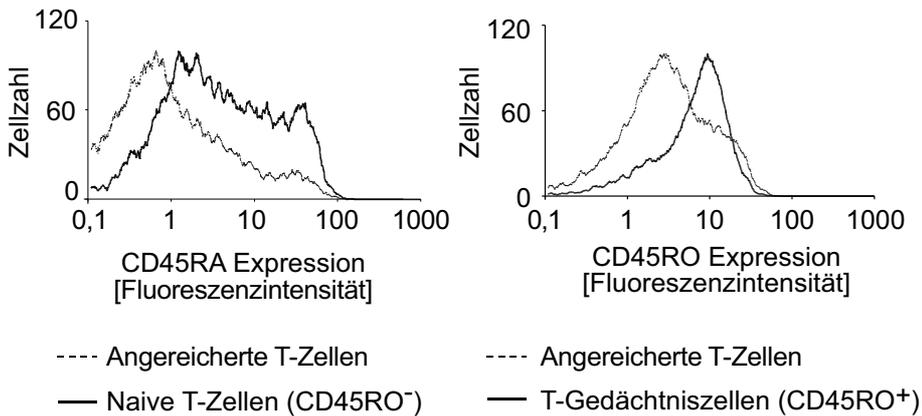
den, während sich die naiven T-Zellen ($CD45RO^-$) im Durchlauf der Säule befanden.

4.1.2 Effekte der Aufreinigung naiver T-Lymphozyten

Die Expression einiger Oberflächenmarker wurde auf angereicherten und auf aufgereinigten, naiven T-Zellen im Durchflusszytometer untersucht (Abb. 4.3). Mit Hilfe dieser Analyse konnte die Effizienz der Aufreinigung besser beurteilt werden. Der Anteil der $CD45RA^+$ Zellen war unter den aufgereinigten, naiven T-Zellen erwartungsgemäß höher als unter den angereicherten Zellen, die nur durch Adhärenz von Monozyten abgetrennt worden waren (Abb. 4.3A, linkes Diagramm). Zusätzlich wurde die $CD45RO$ -Expression der abgetrennten T-Gedächtniszellen gegenüber angereicherten T-Lymphozyten untersucht. Die abgetrennten Zellen enthielten einen viel höheren Anteil an $CD45RO^+$ Zellen. Die Analyse der Oberflächenmarker $CD45RA$ und $CD45RO$ zeigte die Anreicherung von naiven T-Lymphozyten bzw. Gedächtniszellen in der entsprechenden Gruppe.

Darüberhinaus wurde die IL-2-Rezeptor α -Kette ($CD25$) analysiert, ein gängiger Oberflächenmarker zum Nachweis der Stimulierung. In Abb. 4.3B ist die $CD25$ -Expression vor und nach Aktivierung (27 h) von angereicherten und von aufgereinigten, naiven T-Lymphozyten abgebildet. Man erkennt, dass bei den naiven T-Lymphozyten die $CD25$ -Expression vor und nach der Aktivierung homogener

A



B

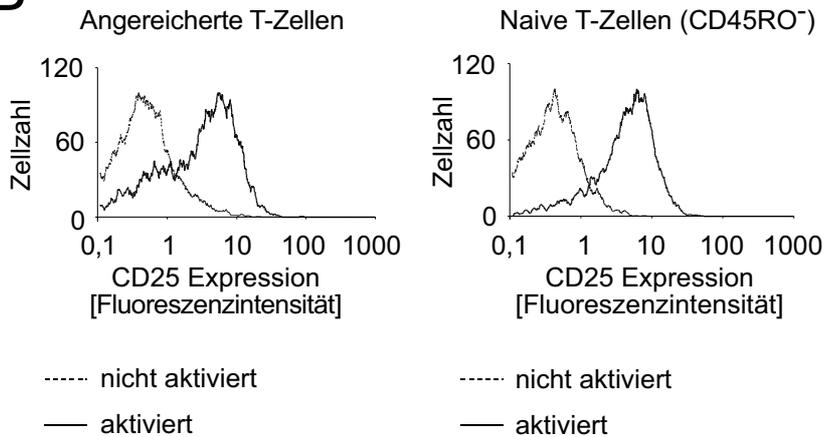


Abbildung 4.3: **Effekt der Aufreinigung naiver T-Zellen.** (A) Der Oberflächenmarker CD45RA wurde im Durchflusszytometer auf angereicherten und aufgereinigten, naiven T-Lymphozyten analysiert (linkes Diagramm). Auf angereicherten T-Lymphozyten und abgetrennten Gedächtniszellen wurde die Expression von CD45RO untersucht (rechtes Diagramm). (B) Die Expression von CD25 wurde auf angereicherten und aufgereinigten, naiven T-Lymphozyten im nicht aktivierten Zustand oder nach 27 h Aktivierung im Durchflusszytometer gemessen.

war. Die Expressionskurve für nicht aktivierte Zellen war hier schmaler als bei den angereicherten T-Lymphozyten. Nach 27 h Aktivierung waren bei den naiven im Vergleich zu den angereicherten T-Lymphozyten kaum noch CD25⁻ Zellen zu finden. Dieses Ergebnis spricht für eine homogenere Zellpopulation der aufgereinigten, naiven T-Zellen, da das Expressionsprofil von CD25 hier schärfer war. Die Auswirkung weiterer Aufreinigungsschritte wurde außerdem exemplarisch an einigen Proteinen in einer Western Blot Analyse betrachtet. Die Expression von CBP, TFIIB und TFIIH p62 wurde in angereicherten und in aufgereinigten, naiven T-Zellen untersucht (Abb. 4.4). Die CBP-Menge stieg nach Aktivierung stark an. Dagegen nahm die Menge an TFIIH p62 weniger stark zu. Bei der TFIIB-Konzentration wurde eine geringe Abnahme beobachtet. Die Konzentrationen dieser Proteine unterschieden sich zwischen angereicherten und aufgereinigten T-Zellen. Die Mengen in naiven T-Lymphozyten waren geringer, obwohl gleiche Zellzahlen für den Western Blot verwendet worden waren. Allerdings entwickelte sich die Expression nach Aktivierung in beiden Zellgruppen gleich. Demnach lieferte die Western Blot Analyse die gleichen Aussagen für angereicherte und aufgereinigte, naive T-Zellen, auch wenn sich die absoluten Proteinmengen unterschieden.

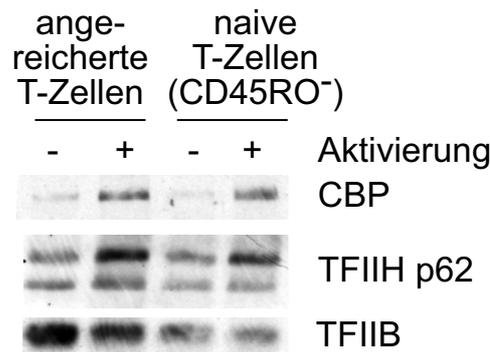


Abbildung 4.4: **Einige Parameter sind in angereicherten und in aufgereinigten, naiven T-Zellen gleich.** Gesamtllysate von nicht aktivierten und 24 h aktivierten angereicherten T-Zellen oder aufgereinigten, naiven T-Zellen (CD45RO⁻) wurden im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

Für die Durchführung von Experimenten ist neben der Homogenität der angereicherten oder aufgereinigten Zellen auch die verfügbare Menge ein wichtiger Aspekt. Nach dem Abtrennen von Monozyten durch Adhärenz befanden sich im Normalfall 55–70% der Zellen in Suspension. Dies waren T-Zellen mit einem kleinen Anteil B-Lymphozyten. Die Ausbeute entspricht in etwa bekannten Zahlen (s. 4.1.1A; Kaczmarek et al., 1987). Erstaunlicherweise blieben nach der weiteren Reinigung in T-Zell-Anreicherungsäulen nur 30–50% der eingesetzten Zellen übrig. Bei diesem Schritt gab es wahrscheinlich erhebliche Verluste. Selbst wenn

die eingesetzten Zellen noch die ursprüngliche Monozytenmenge enthielten, hätte man erwartet, dass etwa 60–70% der Zellen als T-Lymphozyten übrig bleiben (Kaczmarek et al., 1987; s. o.). Im letzten Aufreinigungsschritt wurde erwartungsgemäß etwa die Hälfte der T-Zellen entfernt. Dies entspricht dem theoretischen Anteil an T-Gedächtniszellen (s. 4.1.1B; Sander et al., 1988; Aukrust et al., 1996). Fasst man alle Schritte bis zur Aufreinigung naiver T-Lymphozyten zusammen, so blieben 7–14% der eingesetzten Zellen zurück. Ohne Berücksichtigung von Verlusten hätte man theoretisch mindestens 25% erwartet.

Trotz der deutlichen Anreicherung naiver T-Zellen mit Hilfe zusätzlicher Aufreinigungsschritte wurde für die meisten Experimente eine einfache Anreicherung gewählt (s. 4.1.1A). Die hohen Verluste bei der Aufreinigung naiver T-Lymphozyten führte zu Zellzahlen, die für viele Methoden zu knapp bemessen waren und die keine Wiederholung von Versuchen zuließen. Angereicherte T-Zellen waren nicht so homogen wie aufgereinigte, naive T-Lymphozyten und enthielten kontaminierende Zellen. Allerdings ließen sich die Versuchsergebnisse mit diesem Material gut reproduzieren. Zudem scheinen die Unterschiede zwischen angereicherten und aufgereinigten, naiven T-Zellen – zumindest für einige Parameter – nicht sehr groß. Darauf deuten die hier vorgestellten Western Blot Analysen hin (Abb. 4.4 und 4.6).

4.1.3 Stimulierung von T-Lymphozyten

Bei der Stimulierung von T-Lymphozyten müssen TCR- und CD28-rezeptorvermittelte Signalwege aktiviert werden. Zu Beginn der Arbeit wurde parallel mit einem für den T-Zellrezeptor (TCR) spezifischen Antikörper oder mit Phytohämagglutinin (PHA) und Phorbolmyristylester (PMA) stimuliert. Im Gegensatz zu physiologischen Stimuli zeichnet sich der hier verwendete Antikörper dadurch aus, dass kein Costimulus benötigt wird (Information des Herstellers, s. a. 1.2.2). T-Zellen können mit diesem Antikörper aktiviert werden, ohne dass sie in den anergischen Zustand fallen, der keinerlei Aktivierung mehr zulässt. PHA ist ein pflanzliches Lektin aus der Gartenbohne (*Phaesolus vulgaris*), das spezifisch T-Lymphozyten stimuliert (Chilson et al., 1984; Janeway und Travers, 1995, Kap. 2.18). Der genaue Wirkmechanismus ist unbekannt. Man weiß jedoch, dass die Stimulierung durch Vernetzen von Oberflächenmolekülen erfolgt. Der Tumorpromotor PMA induziert die Proteinkinase C (PKC) und ersetzt in T-Zellen den Costimulus (Sagerström et al., 1993). Die Aktivierung von PKC spielt auch in anderen Zellsystemen eine Rolle, z. B. bei der Aktivierung durch Wachstumsfaktoren oder Hormone.

Bei einzelnen Experimenten wurde auf weitere Stimuli zurückgegriffen. T-Lymphozyten können mit CD3-spezifischen Antikörpern (s. 1.2.2) stimuliert werden, wobei auch hier die Möglichkeit einer anergischen Reaktion besteht. Dies kann man vermeiden, indem man die Antikörper an den Boden des Zellkulturgefäßes bindet. Dadurch können die TCRs vernetzt und damit die T-Lymphozyten akti-

viert werden (Geppert und Lipsky, 1987). Ein spezieller, weit verbreiteter CD3-spezifischer Antikörper ist OKT3 (van Wauwe et al., 1980). Üblicherweise wird OKT3 in Lösung zusammen mit PMA als Costimulus verwendet (Laing und Weiss, 1988). Daneben wurden Calcium-Ionophore eingesetzt, welche den Transport von Calciumionen durch die Membran ermöglichen. Die Kombination von PMA und Calcium-Ionophor erlaubt die Induktion zweier Hauptwege der T-Zellstimulierung, der Aktivierung von Calcineurin und von PKC (s. 1.2.3). Allerdings ist diese Art der Stimulierung nicht T-zellspezifisch, da diese Signalwege in vielen Zellen aktiviert werden können.

Die Aktivierung der T-Zellen wurde durch die Expression von CD25 überprüft. Als Beispiele sind in Abb. 4.3 eine Analyse im Durchflusszytometer und in Abb. 4.5 ein Western Blot gezeigt.

4.2 Untereinheiten der basalen Transkriptionsmaschine während der T-Zellaktivierung

4.2.1 Expressionserhöhung vieler allgemeiner Transkriptionsfaktoren nach T-Zellstimulierung

Schon seit einigen Jahrzehnten ist bekannt, dass sich nach der Aktivierung von T-Zellen deren Transkriptionsaktivität erhöht (Cooke und Kay, 1973; Jagus-Smith und Kay, 1976; Tillyer und Butterworth, 1978; s. a. 1.2.3). Bis heute ist nicht geklärt, welcher Mechanismus diese Erhöhung erlaubt. Eine mögliche Erklärung wäre eine starke Zunahme der allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTFs). Dies würde vor allem zu einer Erhöhung führen, falls die GTFs in nicht aktivierten T-Zellen limitierend wären. Die Proteinmengen allgemeiner Transkriptionsfaktoren in nicht aktivierten und aktivierten T-Lymphozyten wurden im Western Blot verglichen. Abb. 4.5 zeigt die Ergebnisse für die Transkriptionsfaktoren TFIIE α , TFIIE β , TFIIH p89 und RAP74, die große Untereinheit von TFIIF. Ihre Konzentrationen nahmen nach Aktivierung mit Ausnahme von RAP74 mäßig zu. Die Menge der TFIIF-Untereinheit blieb während der Stimulierung annähernd konstant.

Interessanterweise waren die Konzentrationen der GTFs in Jurkat Zellen (transformierte T-Zellen) mit Ausnahme von RAP74 höher als in den primären Lymphozyten. Der Grund hierfür könnte eine höhere metabolische Aktivität der transformierten Zellen sein. Als Kontrolle wurde die Proteinmenge des Oberflächenmarkers CD25 untersucht. Die starke Zunahme zeigte, dass die analysierten T-Lymphozyten tatsächlich stimuliert wurden.

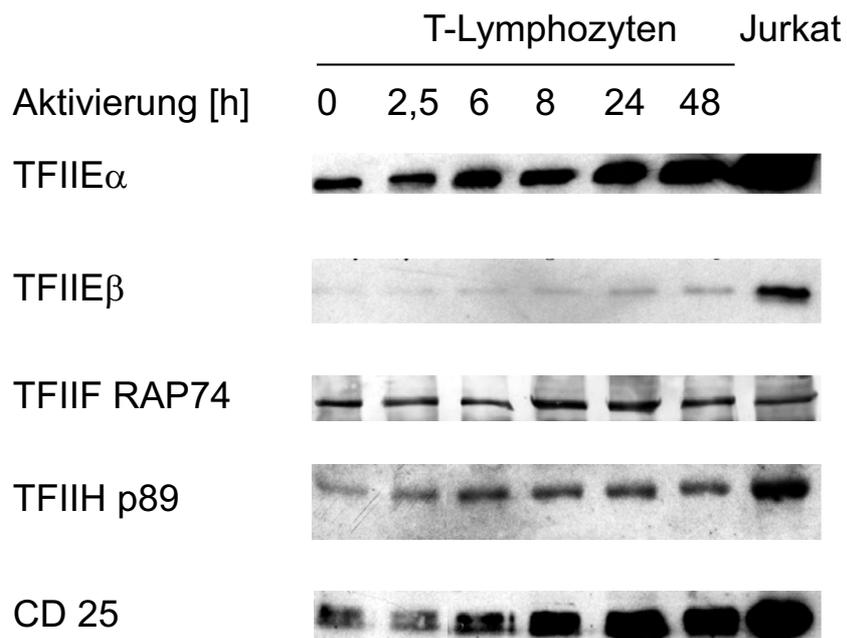


Abbildung 4.5: **Variation der Proteinmengen genereller Transkriptionsfaktoren während der T-Zellaktivierung.** Gleiche Zelläquivalente von Gesamtlysaten unterschiedlich lange stimulierter primärer T-Zellen und von nicht aktivierten Jurkat Zellen wurden in Western Blots mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die Zellen wurden mit einem TCR-spezifischen Antikörper aktiviert.

4.2.2 Analyse der RNA-Polymerase II

4.2.2.1 Regulierte Expression der Untereinheiten von RNA-Polymerase II während der T-Zellaktivierung

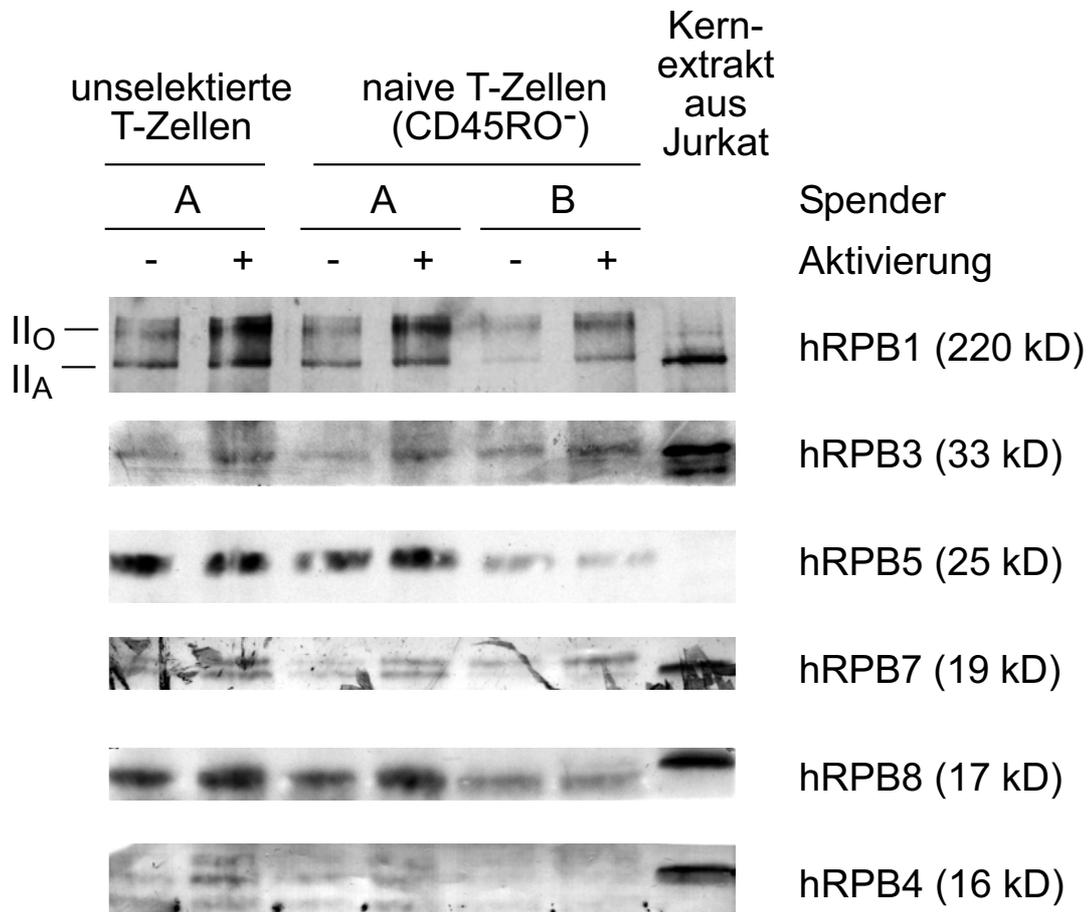


Abbildung 4.6: **Differentielle Regulation der RNA-Polymerase II-Untereinheiten während der T-Zellaktivierung.** Gesamtlysate von nicht aktivierten und 24 h aktivierten angereicherten T-Zellen oder aufgereinigten naiven T-Zellen (CD45RO⁻) wurden im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die Zellen wurden mit PMA und PHA aktiviert.

Als weiterer Bestandteil der basalen Transkriptionsmaschine wurden die Konzentrationen von einzelnen RNA-Polymerase II-Untereinheiten untersucht (Abb. 4.6). Hierfür wurden Gesamtzellextrakte sowohl von angereicherten T-Lymphozyten als auch von aufgereinigten naiven T-Zellen im Western Blot analysiert. Die Zellen waren jeweils nicht aktiviert oder mit PHA und PMA über 24 h aktiviert.

Nach der Aktivierung wurde die große Untereinheit hRPB1 stärker exprimiert. Parallel dazu wurde ihre C-terminale Domäne (CTD) hyperphosphoryliert. Dies erkennt man an der Zunahme der höher laufenden Form II_O. Neben der hRPB1-Konzentration stiegen die Konzentrationen von hRPB3, hRPB4 und hRPB7 an. Dagegen blieben die hRPB5- und hRPB8-Mengen konstant. Vergleicht man die angereicherten T-Zellen und die aufgereinigten naiven T-Lymphozyten von Spender A, sind kaum Unterschiede zu erkennen. Die Proben von Spender B zeigen gleiche Konzentrationsänderungen der Untereinheiten. Die geringeren Gesamtproteinmengen von Spender B resultieren möglicherweise aus einem ineffizienteren Zellaufschluss.

In der äußeren rechten Spalte wurde zur Kontrolle Kernextrakt aus aktivierten (24 h PHA und PMA) Jurkat Zellen aufgetragen, um die Banden der RNA-Polymerase II-Untereinheiten leichter zu identifizieren. Da es sich um Kernextrakt im Gegensatz zu Gesamtzellextrakten handelt, sind die Proteinmengen nicht vergleichbar.

4.2.2.2 Zunahme der CTD-Phosphorylierung an Serin 2 und Serin 5 nach T-Zellaktivierung.

Neben der Gesamtmenge von RNA-Polymerase II war von Interesse, in welchen zellulären Kompartimenten ihre modifizierten Formen lokalisiert sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurden T-Lymphozyten vor und nach Aktivierung in Anlehnung an ein Protokoll von He et al. (1990) aufgetrennt. Die Extraktion mit tritonhaltigem Puffer brachte sowohl cytosolische als auch leicht extrahierbare nukleäre Proteine in Lösung. Chromatinassoziierte Proteine wurden durch limitierte DNase I-Restriktion und Extraktion mit Ammoniumsulfat gelöst. Nach einem Waschschriff in Hochsalzpuffer blieben im Pellet Proteine übrig, die stark an Chromatin gebunden oder mit der Kernmatrix assoziiert waren.

Die unterschiedlichen Modifikationen von RNA-Polymerase II (s. 1.1.2) wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper differenziert. hRPB1 ist an den Serinresten 2 und 5 und auch an Tyrosin 1 der CTD phosphoryliert. Bislang gibt es spezifische Antikörper gegen die beiden Serin-Phosphorylierungen.

Reihe 1 von Abb. 4.7 zeigt die Gesamtverteilung von hRPB1 in der Western Blot Analyse. Ein sehr großer Anteil befand sich im leicht zugänglichen Tritonextrakt, ein geringerer Anteil in der Ammoniumsulfat-Fraktion. Während die Waschfraktion augenscheinlich keine RNA-Polymerase II enthielt, war hRPB1 im Pellet der Lymphozyten vorhanden. Der Unterschied zwischen nicht aktivierten und aktivierten T-Zellen zeigte sich vor allem im Tritonextrakt und im Pellet. Hier nahm nach Aktivierung die Menge an hRPB1 zu (vgl. auch 4.2.2.1). Der größte Teil des Enzyms lag „löslich“ im Nukleoplasma vor.

Neben der Gesamtverteilung von hRPB1 wurde die Verteilung seiner spezifischen Modifikationen analysiert. Während der Aktivierung wurde sowohl Ser2 (Abb. 4.7, Reihe 2) als auch Ser5 (Abb. 4.7, Reihe 3) hyperphosphoryliert. Dies

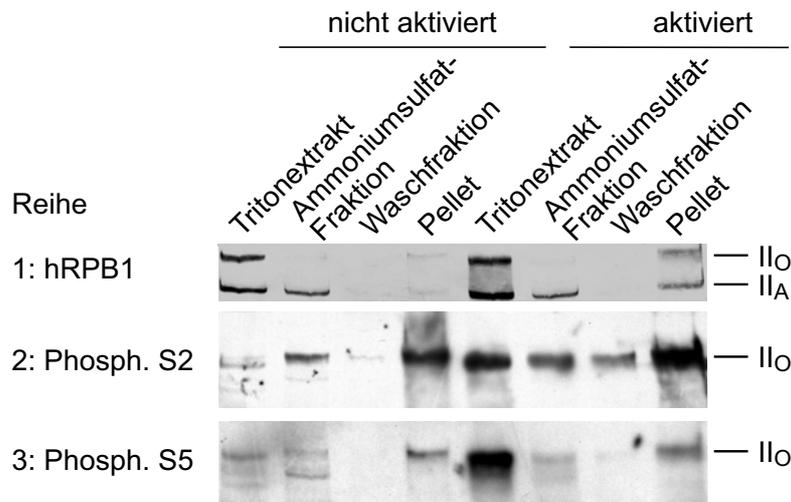


Abbildung 4.7: **Phosphorylierung von hRPB1 während der T-Zellaktivierung.** Nicht aktivierte und 24 h aktivierte T-Zellen wurden fraktioniert. Gleiche Zelläquivalente der Fraktionen wurden im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die Zellen wurden 24 h mit PMA und PHA aktiviert.

bestätigt die Ergebnisse von Garriga und Kollegen, die besagen, dass während der T-Zellaktivierung die Aktivität von P-TEFb und damit die Phosphorylierung von hRPB1 ansteigt (Garriga et al., 1998). Zusätzlich zur erwarteten Zunahme der Ser2-Phosphorylierung im Chromatin wurde Hyperphosphorylierung von Ser2 und Ser5 im Nukleoplasma beobachtet. Der Gesamtmenge an hRPB1 nach zu urteilen, enthält das Nukleoplasma nicht aktivierter T-Zellen bereits einen großen Anteil an hyperphosphorylierter RNA-Polymerase II (s. Abb. 4.7, Reihe 1). Allerdings wurde diese Form weder vom Ser2- noch vom Ser5-spezifischen Antikörper erkannt (s. Abb. 4.7, Reihe 2 bzw. 3).

Aktiviert und nicht aktivierte Jurkat J6 Zellen wurden im Western Blot ebenfalls auf Modifikationen der RNA-Polymerase II untersucht. Abb. 4.8 zeigt, dass sich in der transformierten T-Zelllinie die Phosphorylierung an Ser2 und an Ser5 nicht veränderte. Im Gegensatz zu primären Zellen war hier die Ser5-Phosphorylierung überwiegend im Chromatin lokalisiert (Abb. 4.8, Reihe 3, Ammoniumsulfat-Fraktion).

4.2.2.3 Erhöhte Expression von CTD-Kinasen während der T-Zellaktivierung

Verantwortliche Kandidaten für den Phosphorylierungsanstieg sind CTD-Kinasen. In Gesamtzellextrakten (Abb. 4.9A) stiegen die Konzentrationen von CDK7 und CDK8 nach T-Zellstimulierung an. CDK7 ist die Kinase-Untereinheit

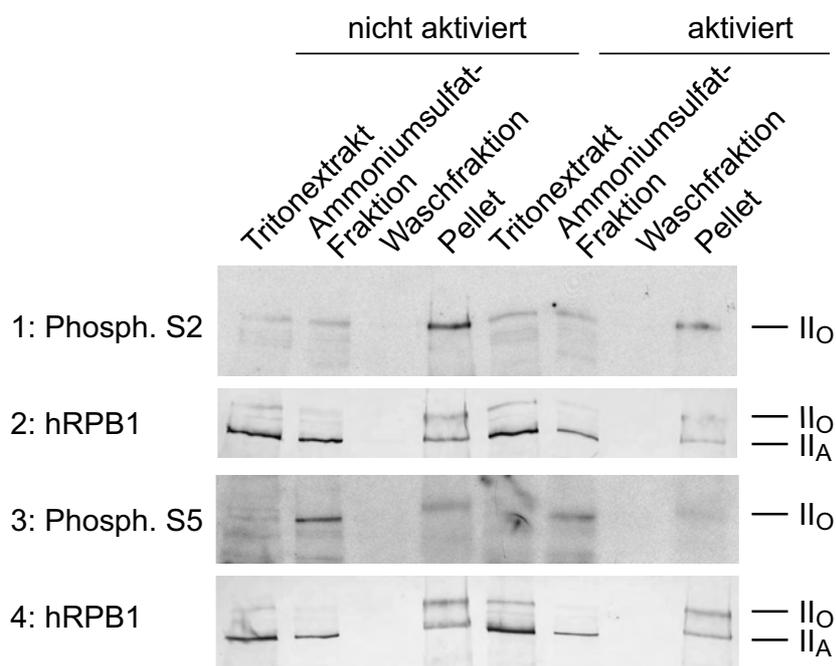


Abbildung 4.8: **In Jurkat J6 Zellen verändert sich die hRPB1-Phosphorylierung nicht.** Nicht aktivierte und 24 h aktivierte Jurkat J6 Zellen wurden fraktioniert. Gleiche Zelläquivalente der Fraktionen wurden im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die Zellen wurden mit PHA und PMA aktiviert.

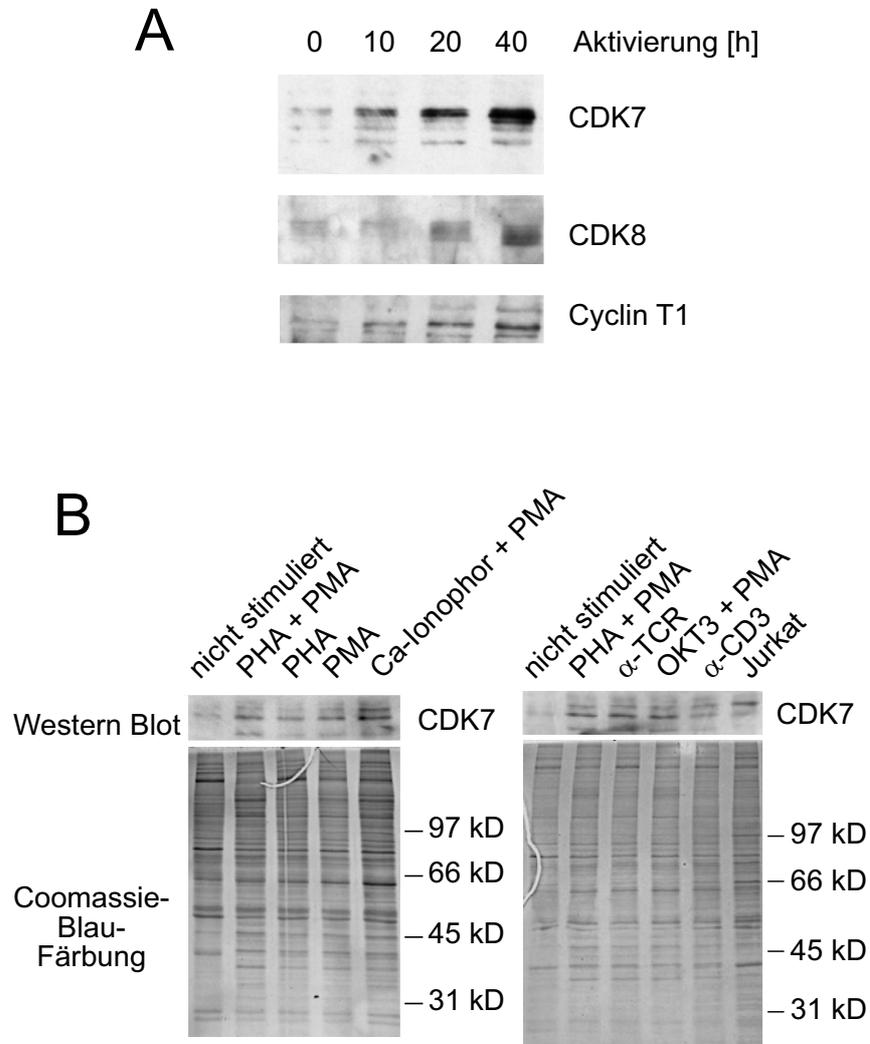


Abbildung 4.9: **CTD-Kinasen werden während der T-Zellstimulierung hochreguliert.** (A) Gesamtzellextrakte nicht aktivierter und aktivierter T-Lymphozyten wurden im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. (B) Kernextrakte aus verschiedenen stimulierten, primären T-Zellen wurden im Western Blot bezüglich ihrer CDK7-Menge untersucht. Als Ladungskontrolle dient eine Coomassie-Brillantblau-Färbung des geblotteten Gels.

des Transkriptionsfaktors TFIID, der eine Phosphorylierung an Serin 5 katalysiert. CDK8 assoziiert zusammen mit Cyclin C mit dem Mediator. Wie von Garriga und Kollegen gezeigt wurde, nahm auch die Menge an Cyclin T1, einer Untereinheit des Elongationsfaktors P-TEFb zu (Garriga et al., 1998).

Zur Aufdeckung der beteiligten Signalwege wurden Kernextrakte aus verschiedenen stimulierten, primären T-Zellen mittels Western Blot auf ihren CDK7-Gehalt untersucht (s. Abb. 4.9B). Dazu wurden Lymphozyten mit der im Normalfall verwendeten Kombination aus PHA und PMA, mit PHA alleine, mit PMA alleine und mit einer Kombination aus PMA und Calcium-Ionophor stimuliert. Darüberhinaus wurden Zellen mit einer Kombination aus löslichem OKT3-Antikörper und PMA, mit immobilisiertem CD3-spezifischem Antikörper oder mit TCR-spezifischem Antikörper aktiviert. Die CDK7-Menge stieg nach Aktivierung mit jedem einzelnen Stimulus deutlich an. Die Zunahme war nur bei der Gabe von PHA oder PMA alleine und bei der Aktivierung mit anti-CD3 Antikörper schwächer ausgeprägt. Die Zugabe von TCR-spezifischem Antikörper schien auszureichen, um eine Zunahme der CDK7-Menge zu induzieren. Dies bedeutet, dass alleine der über den TCR vermittelte Signalweg eine Induktion von CDK7 bewirken kann. Auch PKC spielt dabei eine Rolle, da der PKC-Aktivator PMA eine Zunahme der CDK7-Menge bewirkte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die große Untereinheit der RNA-Polymerase II während der T-Zellaktivierung in primären Zellen an Serin 2 und Serin 5 stärker phosphoryliert wird. Nicht aktivierte primäre T-Zellen enthalten bereits an Serin 2 phosphorylierte RNA-Polymerase II, die mit dem Chromatin oder der Kernmatrix assoziiert ist. Als mögliche Kinasen kommen CDK7, CDK8 und P-TEFb in Frage.

4.3 Histonmethyltransferasen in T-Lymphozyten

4.3.1 Induktion einer Histon-H4-Methyltransferase-Aktivität während der T-Zellaktivierung

Ein nächstes Ziel war es, Einblicke in die Rolle von Chromatinmodifikationen bei der Aktivierung von T-Lymphozyten zu bekommen. Hierzu wurden zunächst die Histonmethyltransferaseaktivitäten (HMTase-Aktivitäten) von Kernextrakten untersucht. Kernextrakte wurden aus nicht aktivierten und aktivierten primären T-Zellen hergestellt und mit Histonen und radioaktiv markiertem S-Adenosylmethionin (SAM) inkubiert. Diese Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Membranen transferiert und autoradiographisch analysiert. Abb. 4.10A zeigt, dass in T-Lymphozyten nach Stimulierung eine für Histon H4 spezifische HMTase-Aktivität (H4-MTase-Aktivität) reproduzierbar induziert wurde,

während die für Histon H3 spezifischen Aktivitäten mehr oder weniger konstant blieben. In transformierten Jurkat Zellen wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Vielmehr zeigte sich hier bereits in unstimulierten Zellen eine hohe H4-MTase-Aktivität.

Die Induktion einer H4-MTase-Aktivität wurde mittels Methylierung von H4-Peptiden dokumentiert (Abb. 4.10B und C). Der Unterschied zwischen nicht aktivierten und aktivierten Extrakten zeigte sich allerdings erst ab einer bestimmten Substratmenge. Eine an Lysin 20 (K20) dimethylierte Version des Peptids und ein mutiertes Peptid (R3A) wurden eingesetzt, um Hinweise auf die Spezifität der H4-MTase zu erhalten. Bei diesen Peptiden waren potentielle Methylierungsstellen nicht mehr verfügbar. Während das vormethylierte Peptid sogar besser als der Wildtyp methyliert wurde, zeigte die Mutante R3A mit allen Kernextrakten eine eingeschränkte Methylierbarkeit (s. Abb. 4.10C). Dies wurde als Hinweis gewertet, dass es sich bei der induzierten Aktivität um eine für Arginin 3 spezifische H4-MTase (H4 R3-MTase) handelt.

Da aktuell nur PRMT1 als H4 R3-MTase bekannt ist, wurden die Proteinmengen dieser HMTase in T-Zellen untersucht. Kernextrakte, mit denen eine Analyse der HMTase-Aktivität durchgeführt worden war (s. Abb. 4.10A, Spender A), enthielten mit zunehmender Aktivierungszeit größere PRMT1-Mengen (Abb. 4.11A). Auch in Gesamtzellextrakten erhöhte sich die PRMT1-Menge während 40 h Stimulierung (s. Abb. 4.11B). In T-Zellen wird also zugleich eine H4-MTase-Aktivität und die Menge an PRMT1 hochreguliert.

4.3.1.1 T-zellspezifische Induktion von PRMT1 bzw. einer H4-MTase

Bisher war die Induktion von PRMT1 und einer H4-MTase nach Aktivierung von T-Zellen beobachtet worden. Eine nahe liegende Frage war, ob dieser Effekt auch bei der Stimulierung anderer Zellen auftritt. Um die Zellspezifität der PRMT1-Aktivierung zu testen, wurden primäre Monozyten untersucht (Abb. 4.12A). Eine Analyse im Western Blot ergab keine Veränderung der PRMT1-Menge nach Stimulierung.

Andere leicht verfügbare, primäre Zellen sind humane Hautfibroblasten, die man aus Biopsien erhalten kann. Diese Zellen proliferieren in serumhaltigem Medium und können durch den Entzug von Serum („Hungern“) in die G₀-Phase des Zellzyklus versetzt werden. Nach erneuter Zugabe von Serum treten die Fibroblasten wieder in den Zellzyklus ein. Eine Western Blot Analyse (Abb. 4.12B) zeigte, dass die PRMT1-Menge in proliferierenden, „gehungerten“ und restimulierten Fibroblasten ungefähr gleich war. Als Ladungskontrolle diente das geblottete Gel, das nach dem Transfer mit Coomassie-Brillantblau gefärbt worden war. Die Zellzyklusphase der Aliquots wurde nach Färben der DNA mit Propidiumiodid im Durchflusszytometer bestimmt. Das Profil der 10 h oder kürzer stimulierten Zellen entspricht dem der „gehungerten“, also der G₀- oder G₁-Phase. Die 24 h stimulierten Fibroblasten dagegen proliferieren bereits.

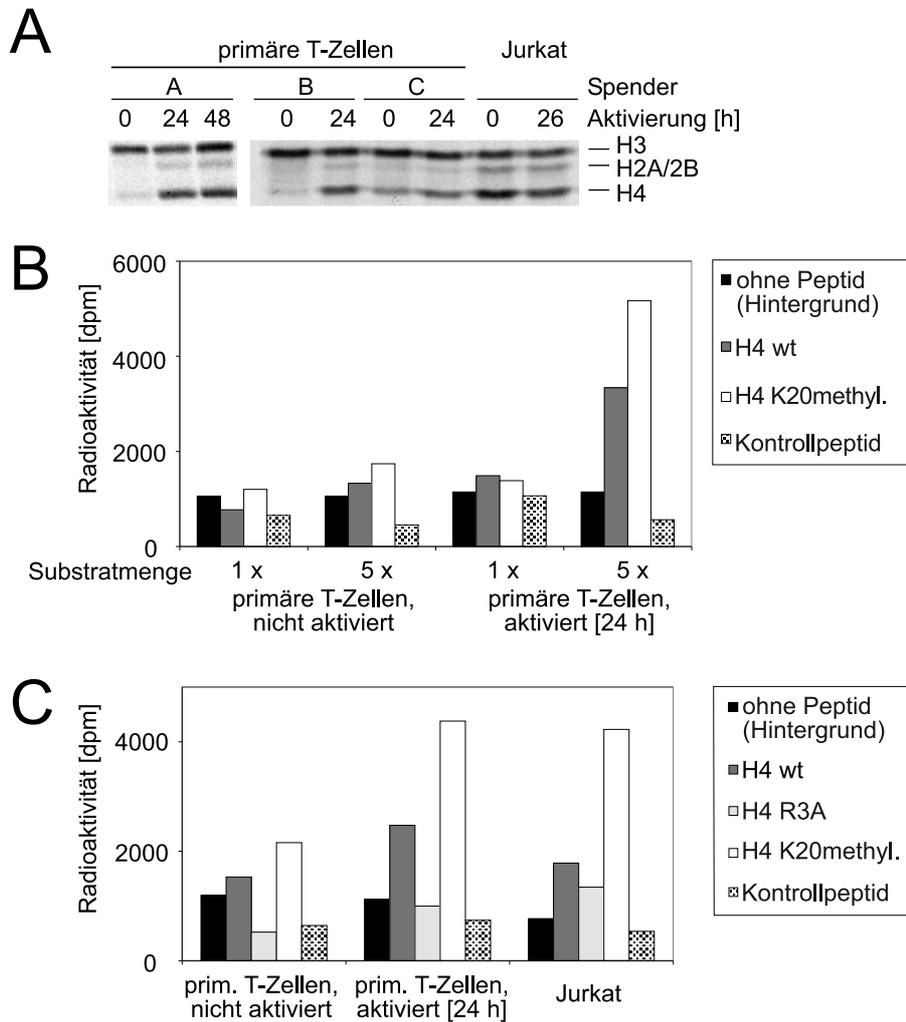


Abbildung 4.10: **Induktion einer H4-MTase-Aktivität während der T-Zellaktivierung.** (A) Kernextrakte aktivierter und nicht aktivierter T-Zellen und Jurkat J6 Zellen wurden im *in vitro* Experiment auf ihre Histonmethyltransferase-Aktivität getestet. Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Autoradiographie der Membran ist abgebildet. In (B) wurden Peptide als Substrat eingesetzt. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Messung im Szintillationszähler. Es wurde jeweils eine einfache und eine fünffache Menge der Peptidsubstrate eingesetzt. (C) Der Versuch wurde analog zu (B) ausschließlich mit der fünffachen Substratmenge durchgeführt. Zusätzlich wurde hier ein Peptid verwendet, bei dem Arginin 3 zu Alanin mutiert ist.

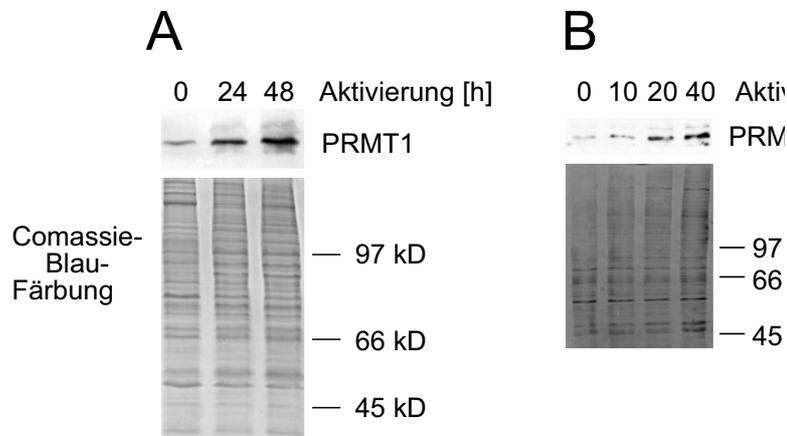


Abbildung 4.11: **Zunahme der PRMT1-Proteinmenge im Kernextrakt und in Gesamtzellextrakten von primären T-Zellen.** (A) Die PRMT1-Menge der Kernextrakte aus Abb. 4.10A (Spender A) wurde im Western Blot bestimmt. Als Kontrolle diente eine Coomassie-Brillantblau-Färbung des geblotteten Gels. (B) Die PRMT1-Menge in Gesamtzellextrakten nicht aktivierter und verschieden lange aktivierter primärer T-Lymphozyten wurde im Western Blot bestimmt. Als Ladungskontrolle diente eine Coomassie-Brillantblau-Färbung des geblotteten Gels.

Zuletzt wurde die HMTase-Aktivität in MRC5 Zellen, einer primären, fötalen Lungenfibroblastenlinie, untersucht. Im *in vitro* Experiment war die Aktivität in Kernextrakten aus „gehungerten“ und aus proliferierenden Zellen in etwa gleich stark (Abb. 4.12C). Die Zellzyklusphasen der beiden Proben wurden im Durchflusszytometer nach dem Färben der DNA mit Propidiumiodid verglichen. Die Analyse verschiedener primärer Humanzellen legt den Schluss nahe, dass die Induktion von PRMT1 bzw. einer H4-MTase-Aktivität nach Stimulierung spezifisch für T-Zellen und möglicherweise auch für B-Zellen ist, die noch in angereicherten T-Lymphozyten vorhanden sind.

4.3.1.2 Induktion von PRMT1 und einer H4-MTase-Aktivität durch verschiedene Stimuli

Zur genaueren Bestimmung des Signalwegs wurden verschiedene Stimuli eingesetzt (vgl. 4.2.2.2). Wie in Abb. 4.13 gezeigt wird, nahmen die H4-MTase-Aktivität (A) und die Menge an PRMT1 (B) mit PMA alleine, aber auch in Kombination mit PHA oder mit Calcium-Ionophor zu. Daneben führten auch PHA alleine und Antikörper gegen den TCR oder gegen CD3 zum Anstieg. Demnach reicht das TCR-vermittelte Signal aus, um PRMT1 bzw. eine H4-MTase-Aktivität zu induzieren. PKC kommt bei der Induktion eine wichtige Rolle zu.

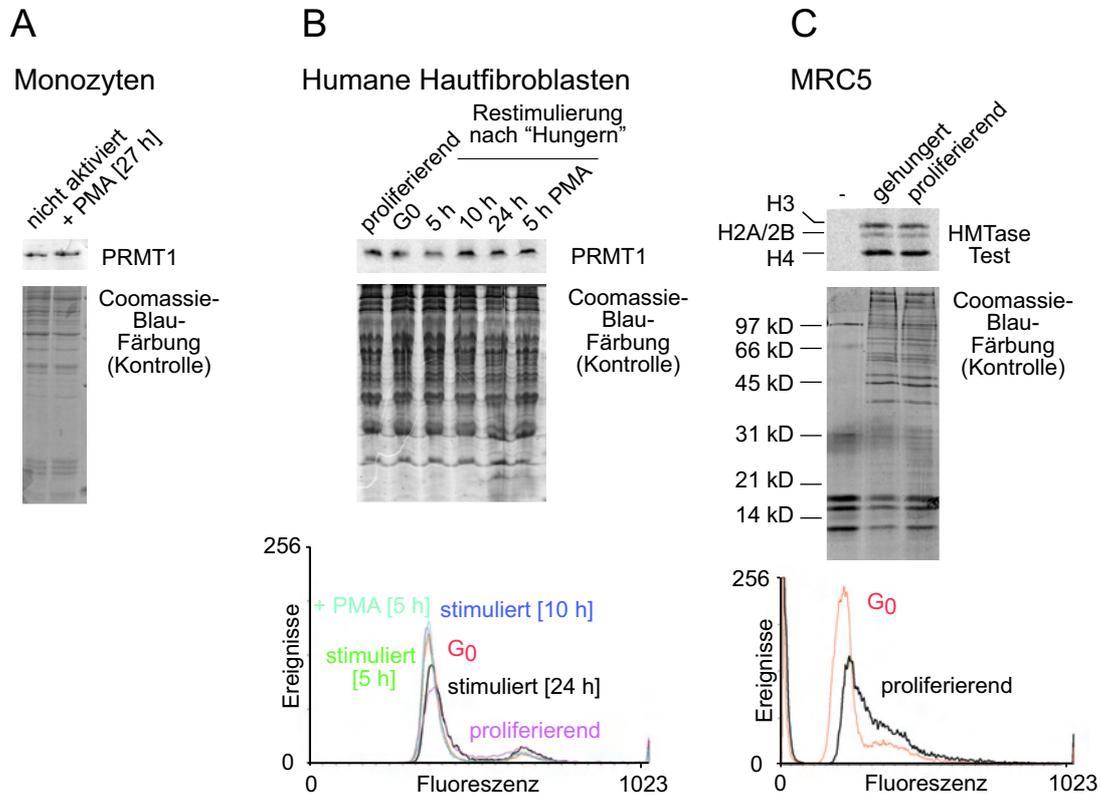


Abbildung 4.12: **Andere primäre Zellen oder Fibroblasten zeigen nach Aktivierung keine Veränderung der PRMT1-Menge oder der H4-MTase-Aktivität.** (A) Die PRMT1-Menge in Gesamtzellextrakten nicht aktivierter und aktivierter Monozyten aus der Isolierung von T-Zellen (s. 4.1.1) wurde im Western Blot untersucht. (B) Die PRMT1-Menge in Gesamtzellextrakten proliferierender, „gehungerter“ und restimulierter primärer humaner Hautfibroblasten wurde im Western Blot bestimmt. Die jeweilige Zellzyklus-Phase der Proben wurde im Durchflusszytometer analysiert. (C) Kernextrakte aus „gehungerter“ und proliferierenden MRC5 Zellen wurden im *in vitro* Experiment auf ihre HMTase-Aktivität untersucht. Die Zellzyklusphasen der beiden Proben wurden im Durchflusszytometer verglichen.

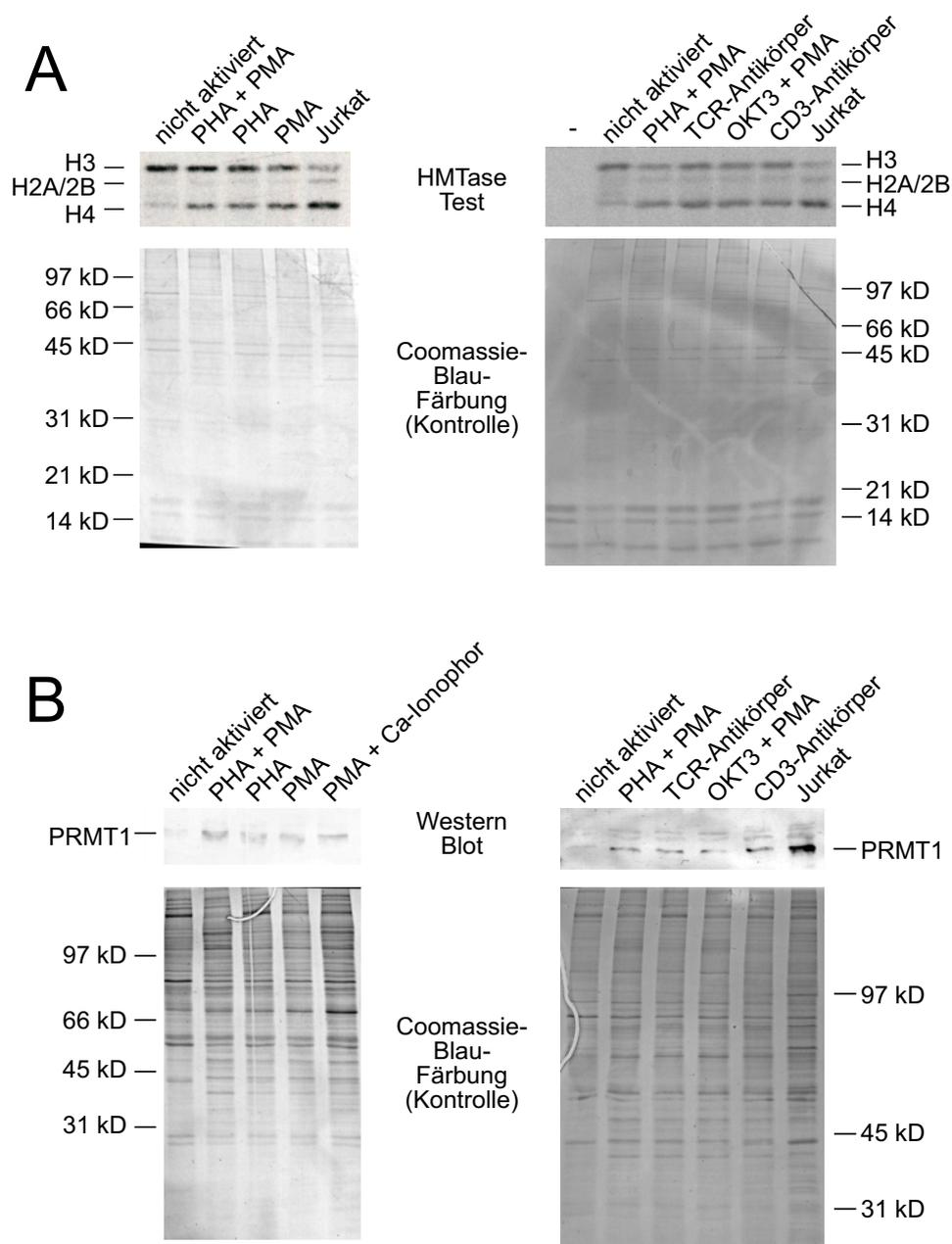


Abbildung 4.13: **Induktion der H4-MTase-Aktivität und von PRMT1 in T-Zellen durch verschiedene Stimuli.** (A) Kernextrakte aus stimulierten primären T-Zellen wurden im *in vitro* Experiment auf ihre HMTase-Aktivität untersucht. Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. (B) Die PRMT1-Mengen in den Kernextrakten aus (A) wurden im Western Blot verglichen.

4.3.1.3 Induktion von PRMT1 auf mRNA-Ebene

Zur Untersuchung der Regulationsmechanismen wurden die mRNA-Mengen von PRMT1 aus der polyA-RNA zweier Spender bestimmt. Die relativen mRNA-Mengen von PRMT1, IL-2 und β -Actin wurden mittels *real time PCR* mit spezifischen Primern aus cDNA bestimmt. IL-2 diente dabei als Positivkontrolle, da es ein T-zellspezifisches Gen ist, dessen mRNA-Menge nach Stimulierung stark ansteigt. Die relativen mRNA-Mengen des Haushaltsgens β -Actin dienten der Normalisierung der erhaltenen Werte. Abb. 4.14 zeigt, dass die Menge an PRMT1-spezifischer mRNA im Vergleich zu β -Actin bei beiden Spendern nach Stimulierung anstieg. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Expressionsanalyse in T-Lymphozyten vor und nach Stimulierung überein, in der ein Anstieg von PRMT1 verzeichnet ist (Diehn et al., 2002). Die Positivkontrolle IL-2 zeigte den erwarteten, starken Anstieg. Bei IL-2 ist für nicht aktivierte Zellen kein Wert zu erkennen, da die Diagramme den Faktor des Anstiegs darstellen und deswegen die Werte für nicht aktivierte Zellen (0 h) gleich 1 gesetzt sind.

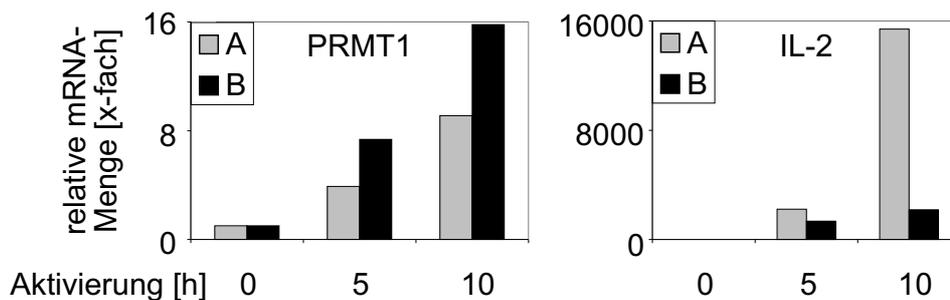
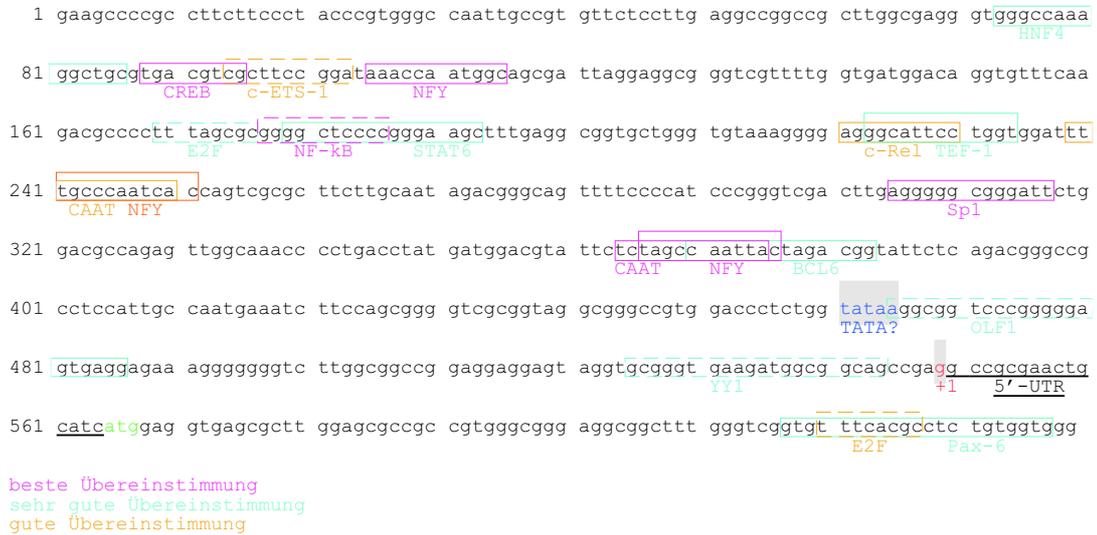


Abbildung 4.14: **Zunahme der PRMT1-mRNA.** Aus der polyA-RNA zweier Spender (A und B) wurde cDNA hergestellt. Die mRNA-Mengen von PRMT1 wurde mittels *real time PCR* auf der cDNA quantifiziert. Mit Hilfe der Werte für β -Actin wurden die erhaltenen relativen mRNA-Mengen normalisiert. Als Positivkontrolle dienten die mRNA-Mengen von IL-2.

Der Anstieg der PRMT1-mRNA nach Stimulierung legt eine Regulation der Transkription nahe. Alternativ könnte der Anstieg durch die Stabilität der mRNA erklärt werden. Da der Promotor des PRMT1-Gens noch nicht analysiert ist, wurde mit Hilfe der Programme *MatInspector* und *PromoterInspector* eine potentielle Promotorsequenz des Gens identifiziert. Mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurden mittels des Programms *Eldorado* und der *Genomatrix Tools* gefunden (Abb. 4.15A). Der potentielle Promotor enthält Bindungssequenzen für CREB, NF-Y, NF- κ B, Sp1, HNF4, E2F, STAT6, TEF-1, BCL6, OLF1, YY1, Pax-6, c-Ets-1 und c-rel. Diese Sequenzen zeichnen sich durch besonders gute Übereinstimmungen mit den Konsensussequenzen aus (gewichtet nach der Häufigkeit der Sequenz oder der Spezifität des Faktors). Sie sind aber nicht experimentell bestätigt.

A



B

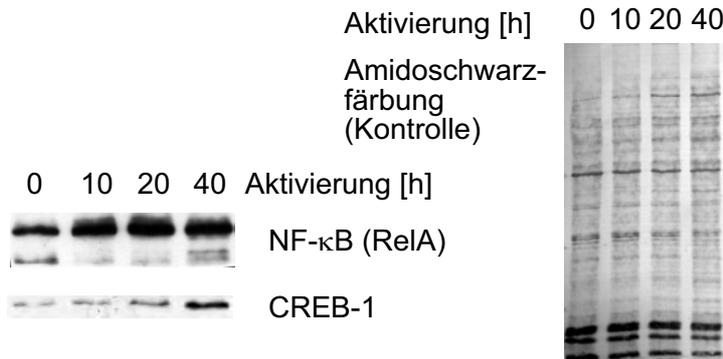


Abbildung 4.15: **Potentieller Promotorbereich des PRMT1-Gens.** (A) Mit Hilfe der Programme *ElDorado*, *MatInspector* und *PromoterInspector* und den *Genomatrix Tools* der Firma Genomatix wurde ein potentieller Promotor des PRMT1-Gens identifiziert und auf mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen untersucht. Die ermittelten Bindungsstellen sind entsprechend ihrer Übereinstimmung mit der Konsensussequenz farbig kodiert (mit abnehmender Übereinstimmung: magenta, cyan, gelb). Bindungsstellen, die auf dem (-)-Strang kodiert sind, werden durch gestrichelte Kästchen gekennzeichnet. (B) Die Mengen der Transkriptionsfaktoren CREB und NF-κB (RelA), die unter anderem Kandidaten für die Expressionsregulation von PRMT1 sind, wurden in Gesamtzellextrakten aus nicht aktivierten und aktivierten T-Lymphozyten mittels Western Blot bestimmt.

Der Transkriptionsstartpunkt liegt bei Position 549 (Scorilas et al., 2000), entsprechend der willkürlichen Nummerierung in Abb. 4.15A. Das Startcodon (ATG) für die Transkription ist an Position 565–567 eingezeichnet. An der idealen Position für eine TATA-Box, 30 bp oberhalb des potentiellen Transkriptionsstarts, wurde keine entsprechende Sequenz gefunden. Allerdings liegt bei Position 461–465 eine optimale TATA-Sequenz (TATAA).

Die Bindungsstellen, die am besten mit ihren Konsensussequenzen übereinstimmen, wurden für die Transkriptionsfaktoren CREB, NF- κ B, NF- κ B (p50) und Sp1 gefunden. Von den möglichen Kandidaten wurden CREB und RelA, der häufigste Dimerisierungspartner von NF- κ B (p50), analysiert (Abb. 4.15B). Die CREB-Menge stieg nach Aktivierung moderat und langsam an. Die Konzentration von RelA nahm zu und zeigte bereits nach 10 h einen geringen Anstieg.

4.3.2 Methylierung von hnRNP A1 in T-Zellen und Anstieg seiner Expression

Die Induktion von PRMT1 warf die Frage auf, welche Substrate das Enzym in T-Lymphozyten methyliert. Zunächst wurde die Menge an Histon H4, das an Arginin 3 methyliert ist, in Gesamtzellextrakten untersucht. Erstaunlicherweise änderte sich der Anteil dieser Modifikation während der T-Zellstimulierung nicht (Abb. 4.16A). Als Kontrolle der Histonkonzentrationen ist in Abb. 4.16A eine Amidoschwarzfärbung derselben Membran abgebildet.

In einem allgemeineren Ansatz zur Identifikation von Substraten wurden Gesamtzellextrakte mit Antikörpern analysiert, die spezifisch für entweder mono- und dimethyliertes Arginin oder nur für dimethyliertes Arginin waren. In beiden Fällen waren die Antikörper gegen eine asymmetrische Dimethylierung gerichtet, wie sie durch PRMT1 katalysiert wird (s. 1.1.5.2). Wie in Abb. 4.16B gezeigt, änderten sich die Konzentrationen von methylarginin-modifizierten Proteinen. Einige der auffallendsten Banden sind in der Abbildung mit Kreisen gekennzeichnet. Als Ladungskontrolle diente eine Amidoschwarzfärbung derselben Membran.

Ein bekanntes Substrat von PRMT1 ist z. B. STAT1 (s. 1.1.5.2; Mowen et al., 2001). Andere STAT-Proteine, STAT5a und STAT5b, werden unter anderem in T-Zellen vom IL-2-Signalweg aktiviert und scheinen eine Rolle beim IL-2-abhängigen Wachstum zu spielen (Lin und Leonard, 2000). Die methylierbare Aminosäuresequenz von STAT1 ist auch in STAT5 vorhanden. Hinweise auf eine Methylierung durch PRMT1 ergaben sich jedoch nicht (Abb. 4.16B). Ein weiteres PRMT1-Substrat ist hnRNP A1 (Lin et al., 1996). hnRNP A1 nimmt ebenso wie seine Methylierung absolut zu und ist damit ein guter Kandidat für die Argininmethylierung durch PRMT1 (Abb. 4.16B). Eine Reihe weiterer möglicher Substrate von Klasse I Argininmethyltransferasen wurde durch Datenbankrecherche gefunden (Gary und Clarke, 1998), darunter auch hnRNP U. In der Western Blot Analyse war an der Position von hnRNP U mit dem modifikationspezifischen

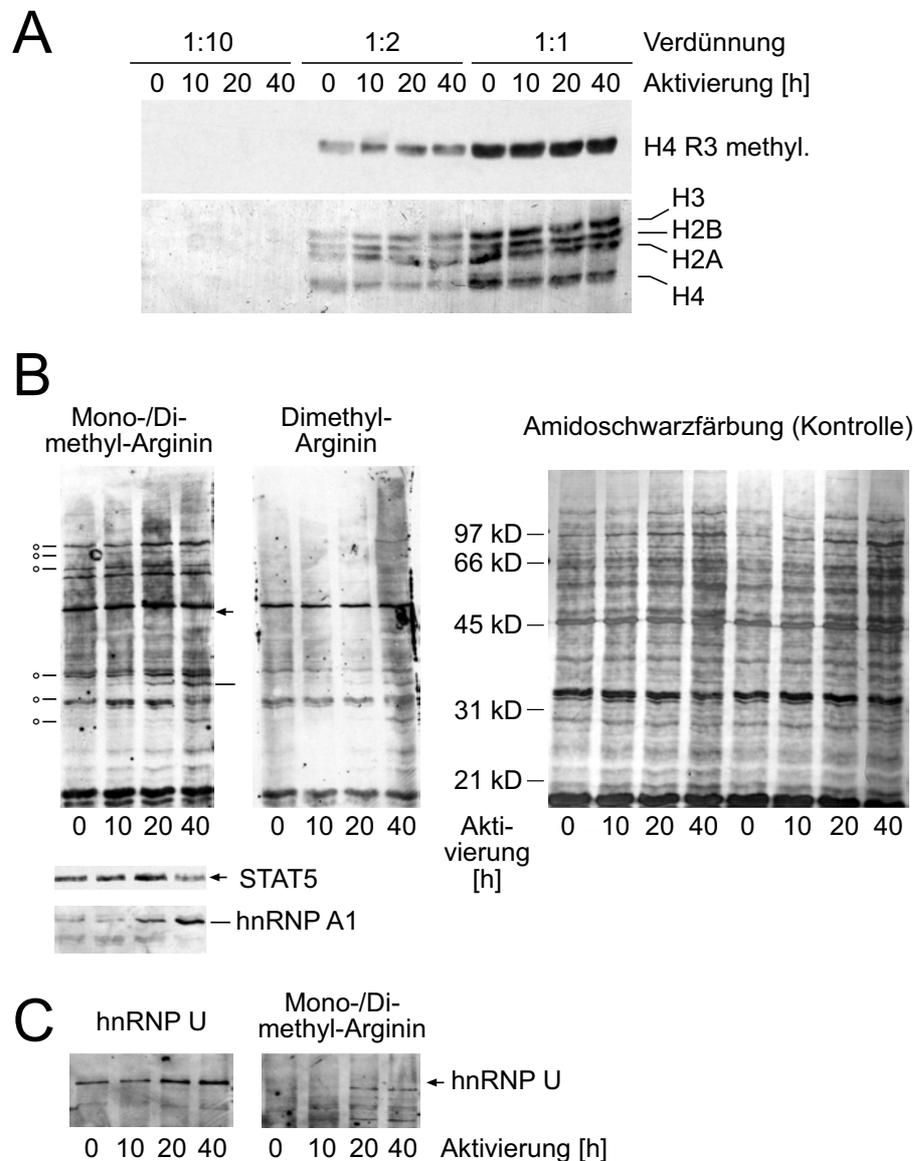


Abbildung 4.16: **Argininmethylierung während der T-Zellaktivierung.** (A) Gesamtzellextrakte aus nicht aktivierten und aktivierten T-Lymphozyten wurden in den angegebenen Verdünnungen elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Antikörper, der spezifisch für methyliertes Arginin 3 auf Histon H4 ist, im Western Blot analysiert. (B) Gesamtzellextrakte aus nicht aktivierten und aktivierten T-Zellen wurden mit den angegebenen Antikörpern im Western Blot analysiert. Kreise kennzeichnen Banden, deren Stärke sich ändert. Der Pfeil zeigt die Position von STAT5, die Linie die Position von hnRNP A1. (C) Gesamtzellextrakte wurden wie in (B) im Western Blot analysiert. Der Pfeil kennzeichnet die Position des Signals von hnRNP U.

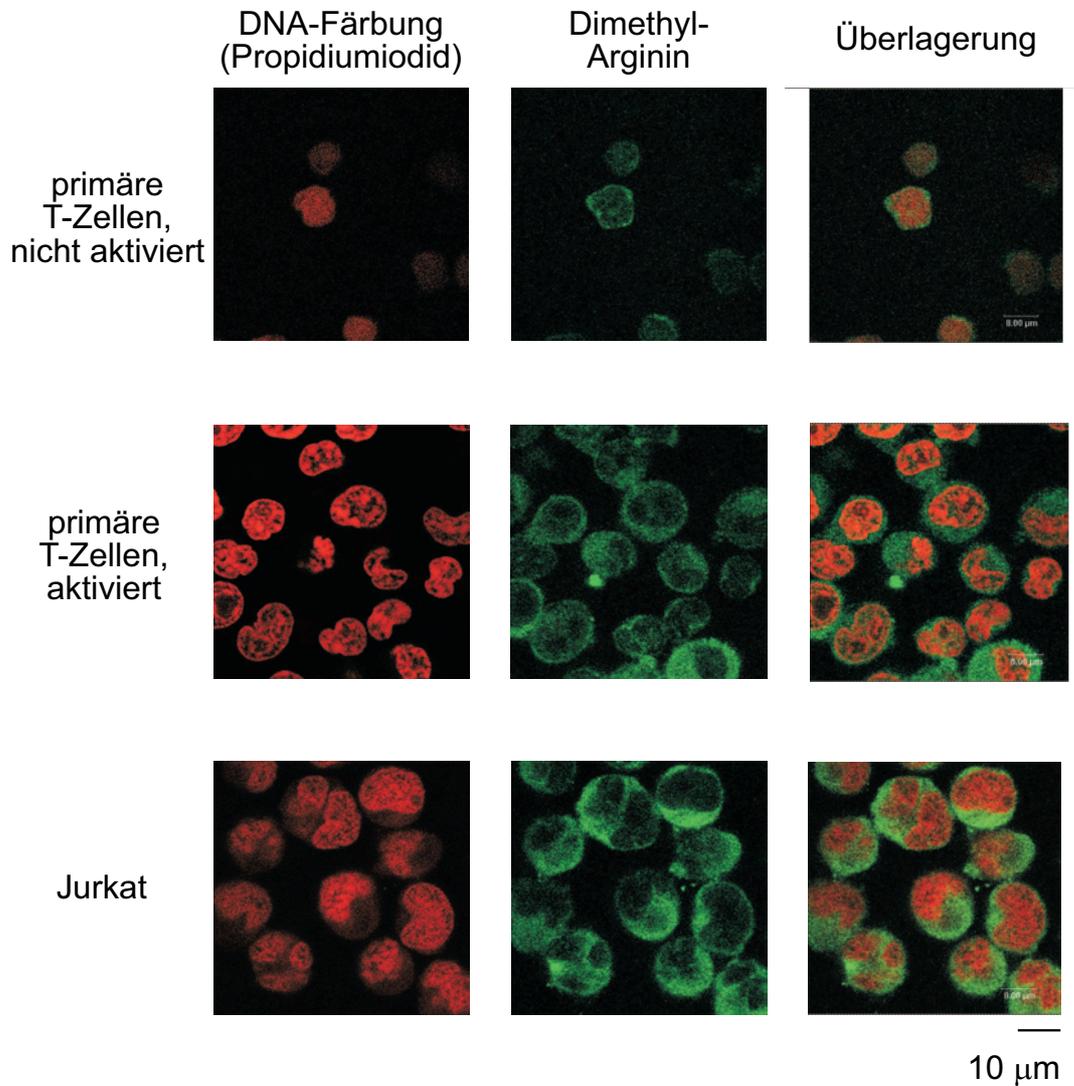


Abbildung 4.17: **Lokalisierung an Arginin dimethylierter Proteine.** Nicht aktivierte und aktivierte (48 h) primäre T-Zellen sowie Jurkat Zellen wurden mit einem Antikörper (grün), der für Dimethyl-Arginine spezifisch ist, für die Analyse im konfokalen Mikroskop gefärbt. Gleichzeitig wurde die DNA mit Propidiumiodid (rot) gefärbt. Eine Überlagerung beider Färbungen ist in der rechten Spalte zu sehen.

Antikörper kaum ein Signal zu erkennen (Abb. 4.16C). Demnach ist hnRNP U in T-Lymphozyten nicht an Arginin methyliert. Von den getesteten Proteinen scheint lediglich hnRNP A1 eine deutliche Argininmethylierung aufzuweisen. Damit stellte sich als nächstes die Frage, wo potentielle Substrate von PRMT1 lokalisiert sein könnten. Dazu wurden nicht aktivierte und aktivierte primäre T-Lymphozyten und Jurkat Zellen mit Antikörpern gegen asymmetrisches Dimethyl-Arginin gefärbt und im konfokalen Mikroskop betrachtet. Zur Lokalisierung der DNA wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt. Abb. 4.17 zeigt, dass bei allen Proben dimethylierte Proteine vornehmlich im Cytoplasma lokalisiert waren. In nicht aktivierten T-Lymphozyten waren nur wenige dimethylierte Proteine in einem schmalen Cytoplasmasaum vorhanden, während das voluminösere Cytoplasma von stimulierten Zellen und Jurkat Zellen eine große Menge dimethylierter Proteine enthielt. Dieses Ergebnis war überraschend, da PRMT1 zu mehr als 90% zur Klasse I Arginin-Methyltransferase-Aktivität (s. 1.1.5.2) beiträgt (Tang et al., 2000) und ein überwiegend nukleäres Protein ist (Tang et al., 1998).

4.4 Histonmodifikationen in T-Zellen

4.4.1 Gleichbleibende Niveaus der Histonmodifikationen nach T-Zellstimulierung

Nach Aktivierung soll das dichte Chromatin nicht aktivierter T-Zellen dekondensiert werden (Tokuyasu et al., 1968; Kaczmarek et al., 1987). Bekannt ist auch, dass sich die Chromatinstruktur auf Genebene verändert (Siebenlist et al., 1986; Agarwal und Rao, 1998; Rao et al., 2001; s. a. 1.2.3). Angesichts des engen Zusammenhangs zwischen Histonmodifikationen und der Chromatinstruktur (Jenuwein und Allis, 2001; s. a. 1.1.5.1) stellte sich die Frage, ob sich die Änderungen der Chromatinstruktur in Veränderungen der Histonmodifikationen widerspiegeln. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Gesamtzellextrakte von nicht aktivierten und aktivierten primären T-Zellen im Western Blot mit modifikationsspezifischen Antikörpern untersucht (Abb. 4.18). Die Proben wurden zunächst titriert, und die Histonmengen nach Commassie-Brillantblau-Färbung quantifiziert. Dadurch konnten für die verschiedenen Aliquots gleiche Histonmengen eingesetzt werden. Als zusätzliche Kontrolle wurden die geblotteten Gele mit Coomassie-Brillantblau bzw. die Membranen mit Amidoschwarz gefärbt.

Die Gesamtacetylierung von Histon 3 (H3) und Histon 4 (H4) sowie die spezifische Acetylierung von H3 K9¹ und H3 K14 blieben während der T-Zellaktivierung mehr oder weniger konstant. Für die H4-Gesamtacetylierung wurde bei 40 h eine leichte Zunahme beobachtet. Außerdem stieg die H3 K14-Acetylierung nach 10 h

¹Die Abkürzung spezifischer Aminosäurereste auf Histonen wird in 1.1.5.1 erklärt.

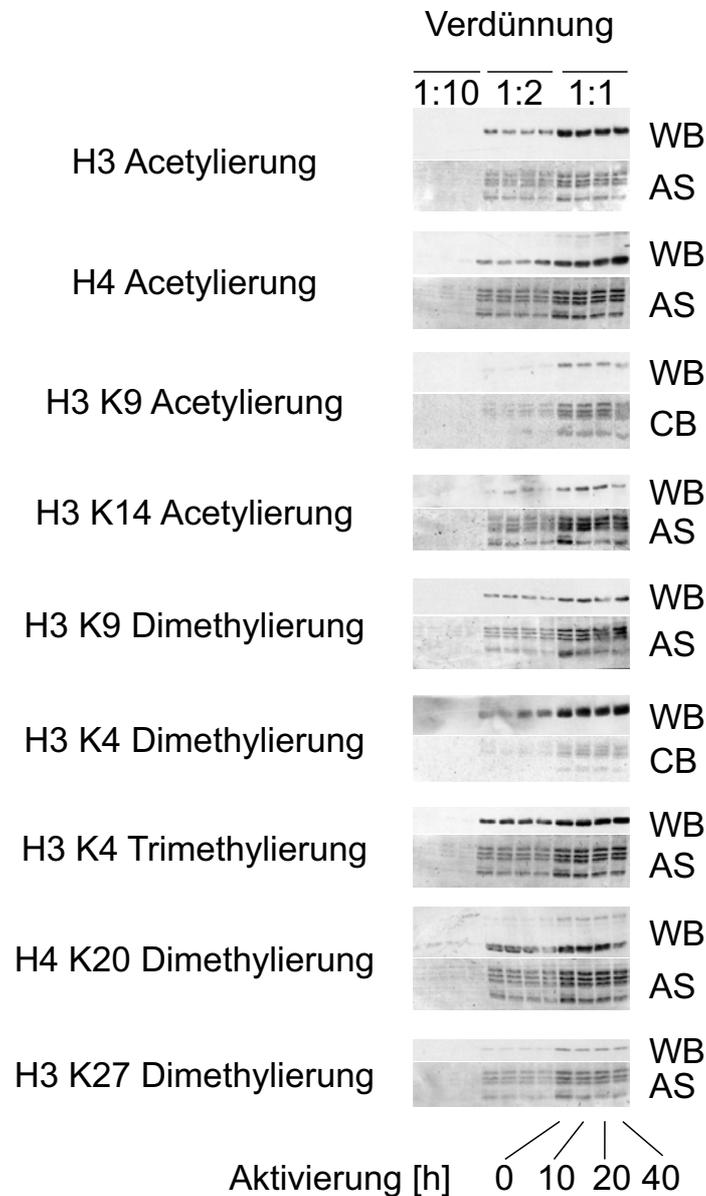


Abbildung 4.18: **Histonmodifikationen in primären T-Zellen.** Gesamtzellextrakte nicht aktivierter und aktivierter T-Lymphozyten wurden in verschiedenen Verdünnungen aufgetrennt. Durch Western Blot Analyse (WB) mit den angegebenen Antikörpern wurden Histonmodifikationen während der T-Zellaktivierung analysiert. Als Ladungskontrollen dienten Coomassie-Brillantblau-Färbungen (CB) der geblotteten Gele oder Amidoschwarzfärbungen (AS) der Membranen.

etwas an, war aber nach 40 h Stimulierung wieder im Bereich des nicht aktivierten Signals.

Die Methylierung von H3 K9, die ein Kennzeichen von transkriptionell inaktivem Chromatin ist (Lachner et al., 2001), änderte sich während der Stimulierung nicht. Ebenso blieben sowohl die Di- als auch die Trimethylierung von H3 K4 konstant. Diese beiden Modifikationen werden mit aktiv transkribiertem Chromatin in Verbindung gebracht (Strahl et al., 1999; Santos-Rosa et al., 2002). Die Methylierung von H3 K27 (Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002; Müller et al., 2002) und von H4 K20 (Nishioka et al., 2002b) sind Histonmodifikationen, deren Bedeutung erst in der letzten Zeit erkannt wurde und die mit epigenetisch reprimiertem Chromatin assoziieren. Während der Stimulierung von T-Lymphozyten blieben auch diese beiden Methylierungen konstant (Abb. 4.18).

4.4.2 Lokalisierung der H3 K4-Methylierung in offenen und dicht angrenzenden Chromatinregionen aktivierter T-Zellen

Die vorgestellten Western Blot Analysen zeigten also, dass sich der Grad der Histonmodifikationen nach T-Zellaktivierung nur sehr leicht oder nicht änderte. Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob sich die Dekondensierung des Chromatins während der T-Zellstimulierung (Tokuyasu et al., 1968; Kaczmarek et al., 1987) eher in der Lokalisierung der Histonmodifikationen zeigt. Eine geeignete Methode, um die Lokalisierung von Histonmodifikationen im Zellkern zu analysieren, ist die Immunfluoreszenzfärbung und die Analyse mit einem konfokalen Mikroskop.

Zunächst wurde die DNA-Verteilung durch Propidiumiodidfärbung untersucht. In Abb. 4.19 ist zu sehen, dass T-Lymphozyten vor der Aktivierung nicht, wie erwartet, stark kondensiertes (s. 1.2.3), sondern eher etwas lockereres Chromatin besitzen. Die Chromatinstruktur ähnelt der Struktur nach Stimulierung, zeigt aber nicht deren extreme Ausprägungen. In aktivierten Zellen änderte sie sich hin zu stark kondensierten Regionen (in Abb. 4.19 durch „d“ (dicht) gekennzeichnet) und zu sehr offenen Regionen (in Abb. 4.19 durch „o“ (offen) gekennzeichnet), in denen kaum noch DNA-Färbung zu erkennen war. Zusätzlich traten nun Nukleoli auf. Die Zellkerne der aktivierten T-Lymphozyten waren den Kernen transformierter Jurkat Zellen sehr ähnlich. In Abb. 4.19 sind bei den Kernen von Jurkat Zellen einige offene („o“) und dicht gepackte („d“) Chromatinregionen als Beispiel gekennzeichnet.

Im nächsten Schritt wurde die Lokalisierung von Histonmodifikationen in T-Zellen mit modifikationsspezifischen Antikörpern untersucht. Für die H3 K9-Dimethylierung wurde sowohl in nicht aktivierten als auch in aktivierten Lymphozyten eine gepunktete, gleichmäßige Verteilung gefunden (Abb. 4.20, untere Reihe). Antikörper gegen Di- oder gegen Trimethylierung von H3 K4 färbten in

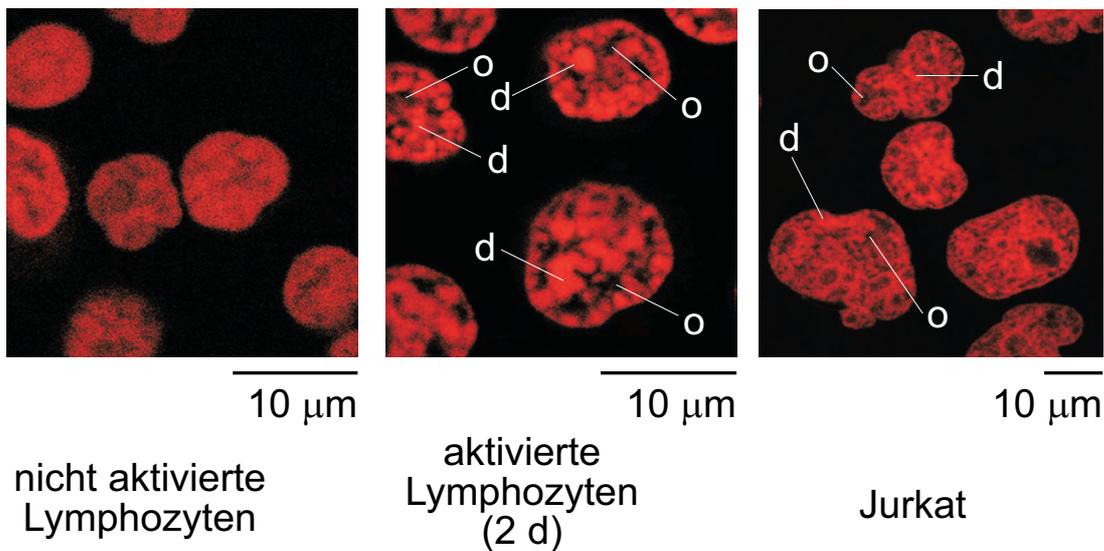


Abbildung 4.19: **Änderung der Chromatinstruktur während der T-Zell-aktivierung.** Die DNA nicht aktivierter und aktivierter (2 d) primärer T-Lymphozyten und nicht aktivierter Jurkat Zellen wurde für die Analyse im konfokalen Mikroskop mit Propidiumiodid angefärbt. Stark kondensierte Regionen wurden mit „d“ (dicht) gekennzeichnet, offene Regionen mit „o“ (offen).

nicht aktivierten Zellen Strukturen im Inneren des Kerns, aber nicht die Regionen nahe der Kernmembran (Abb. 4.20, obere und mittlere Reihe). Nach Stimulierung blieben beide Modifikationen eher im Kerninneren, entfernt von der Kernmembran, lokalisiert. Dies war besonders bei einer Doppelfärbung der H3 K4-Trimethylierung und der Kernmembran mit Antikörpern gegen Lamin B zu erkennen (in Abb. 4.21A durch Pfeile gekennzeichnet). Sowohl die Di- als auch die Trimethylierung traten vor allem in den offenen Chromatinregionen aktivierter Zellen auf. Im Vergleich zur Dimethylierung war die H3 K4-Trimethylierung zusätzlich an den Übergängen zwischen sehr dichtem Chromatin und Regionen mit locker gepackter DNA konzentriert (in Abb. 4.21B mit „G“ (Grenze) gekennzeichnet). Für alle analysierten Modifikationen konnte man in stimulierten Lymphozyten beobachten, dass sie von den Nukleoli ausgeschlossen waren. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sich die Lokalisierung der H3 K4-Methylierung während der T-Zellaktivierung verändert. Im Gegensatz zum Modifikationsgrad scheint also zumindest die Lokalisierung von Histonmodifikationen teilweise mit der Änderung der Chromatinstruktur verbunden zu sein.

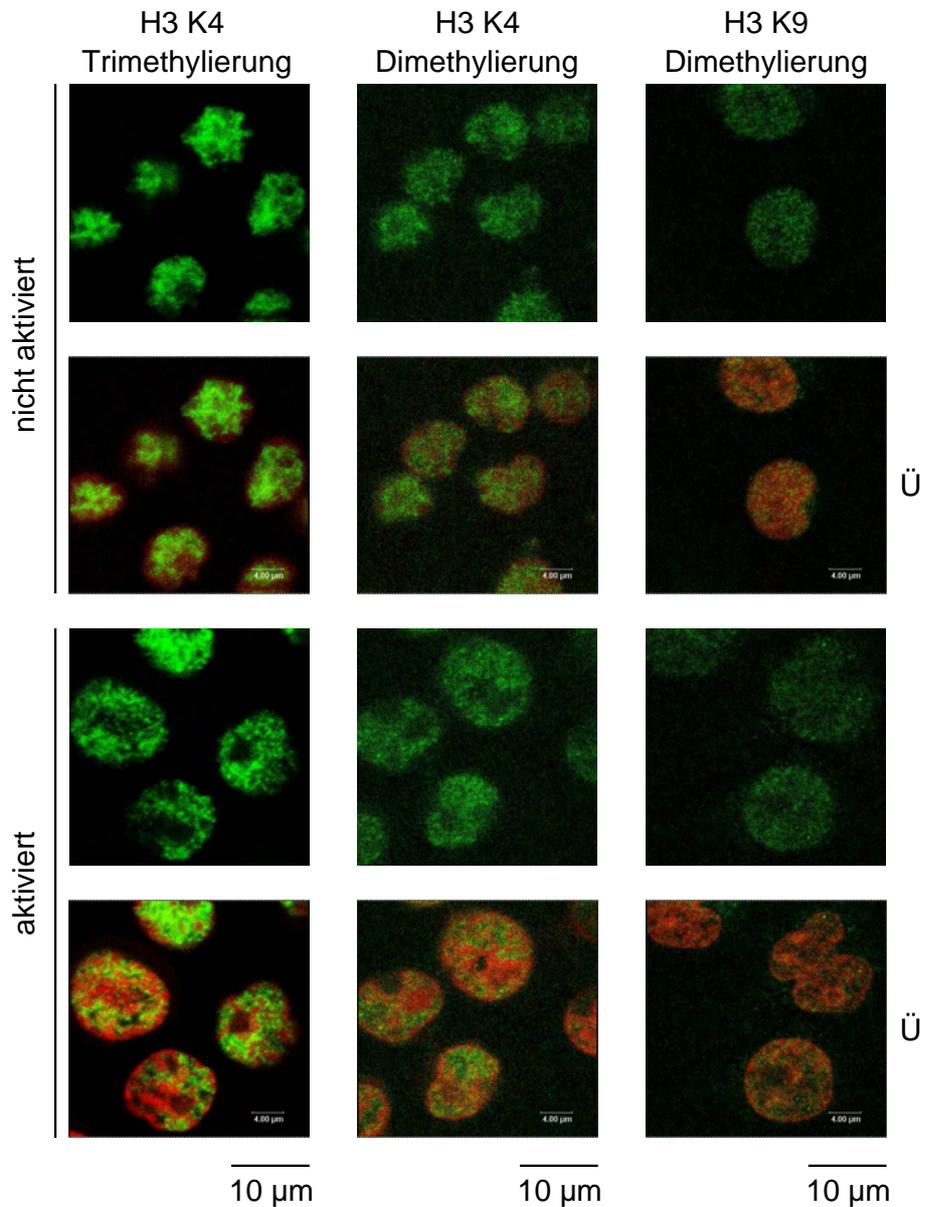


Abbildung 4.20: **Lokalisierung von Histonmodifikationen in primären T-Zellen.** Primäre T-Lymphozyten wurden wie angegeben mit spezifischen Antikörpern gefärbt (grün), um die Lokalisierung von Histonmodifikationen vor und nach T-Zellaktivierung (2 d) im konfokalen Mikroskop zu untersuchen. In den mit „Ü“ markierten Reihen ist eine Überlagerung mit einer Propidiumiodidfärbung (rot) zu sehen, die die DNA sichtbar macht.

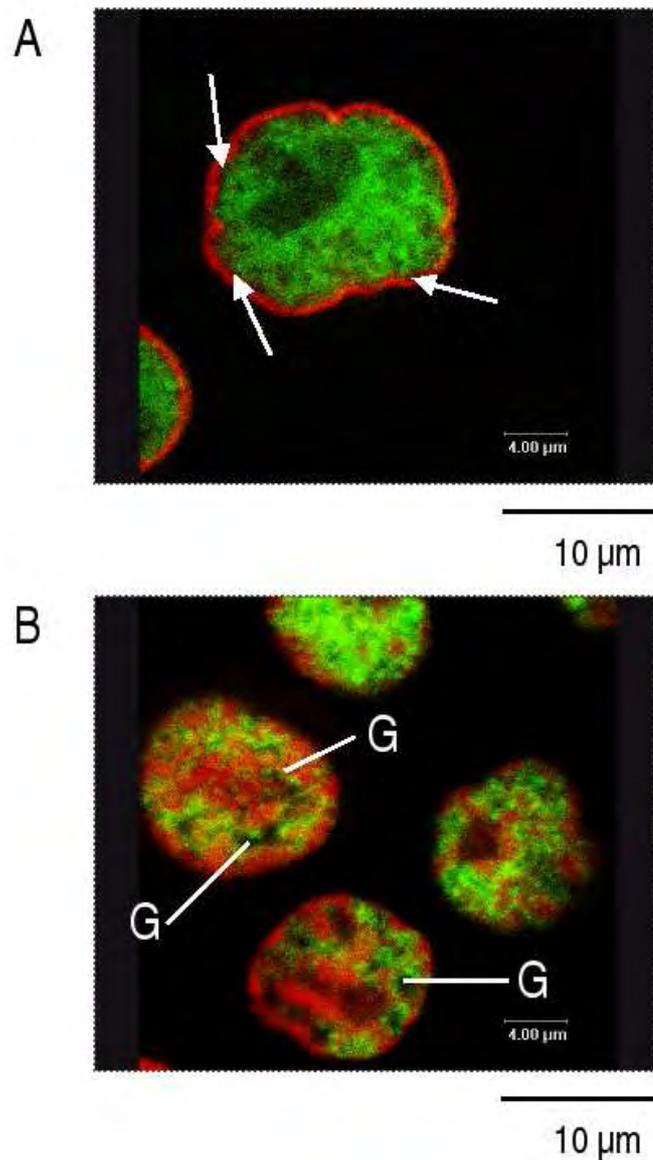


Abbildung 4.21: **Lokalisierung der H3 K4-Methylierung nahe offener Chromatinregionen und entfernt von der Kernmembran.** Aktivierte Lymphozyten (2 d) wurden mit Antikörpern gegen H3 K4-Trimethylierung gefärbt (grün). **(A)** Eine zusätzliche Färbung mit Antikörpern gegen Lamin B (rot) lässt die Kernmembran erkennen. Die Pfeile verdeutlichen den Abstand zwischen Kernmembran und H3 K4-Trimethylierung. **(B)** Die DNA der T-Zellen wurde mit Propidiumiodid (rot) sichtbar gemacht. In der Abbildung sind Überlagerungen der beiden Färbungen zu sehen. „G“ (Grenze) kennzeichnet Übergänge zwischen sehr dichtem Chromatin und locker gepackter DNA, an denen die H3 K4-Trimethylierung besonders konzentriert scheint.

4.5 Chromatin verändernde Cofaktoren

4.5.1 Induktion von Brg1 und CBP nach T-Zellaktivierung

Neben den Histonmodifikationen waren Enzyme von Interesse, die Chromatinkondensierung oder -umstrukturierung bewirken können. Deswegen wurden mittels Western Blot Analyse die Mengen von Histon modifizierenden und *chromatin remodeling* Enzymen in Gesamtzellextrakten bestimmt (Abb. 4.22). Zusätzlich wurde auch die Expression von allgemeinen Transkriptionscofaktoren untersucht, wobei als Ladungskontrolle β -Actin diente.

Die Mengen der Histonacetyltransferasen PCAF und hGcn5 blieben während der ersten 40 h nach Stimulierung konstant. Die Expression von CBP dagegen, das in nicht aktivierten Zellen und nach 10 h Stimulierung nicht zu erkennen war, wurde nach 20 h auffallend hochreguliert. Nach 40 h nahm die CBP-Menge wieder ab, wobei ein Teil des Proteins offenbar in modifiziertem Zustand vorlag. Deutlich induziert war nach 20 h die Expression von Brg1, einer der beiden möglichen ATPase-Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes. Die Mengen zweier weiterer Untereinheiten des Komplexes, BAF170 und Ini1, nahmen ebenfalls zu, wenn auch in einem geringeren Umfang als Brg1. Dagegen veränderte sich die Menge des allgemeinen Transkriptionscofaktors NC2 kaum. Die Expression des Cofaktors PC4 stieg ebenso wie die der Mediatoruntereinheit PCQAP leicht an. Zwei repräsentative Vertreter der Histondeacetylasen, HDAC1 und HDAC2, wurden induziert. Ebenso nahm die Menge an Set9 leicht zu. Set9, gegen das bereits käufliche Antikörper existieren, ist neben MLL eine der beiden bekannten H3 K4-spezifischen Histonmethyltransferasen aus höheren Eukaryonten.

Mittels Immunpräzipitation sollte als nächstes bestimmt werden, in welchem Umfang Brg1 und CBP in nicht aktivierten T-Zellen vorhanden waren. Dazu wurden Kernextrakte aus nicht aktivierten und kurz aktivierten T-Zellen (90 min) präpariert. Für die Immunpräzipitation wurde ein Antikörper gegen PCQAP benutzt, der ein Spektrum an Komponenten erkennt, das wahrscheinlich verwandte Epitope aufweist. Auf diese Weise können der SWI/SNF-Komplex und CBP parallel präzipitiert werden. Als Kontrollen dienten Immunpräzipitationen aus Jurkat-Kernextrakt, Immunpräzipitationen mit einem Isotyp-Antikörper und die Analyse der allgemeinen Cofaktoren NC2 und PC4. Diese Proteine waren erwartungsgemäß nicht im Präzipitat enthalten. CBP und BAF170 waren in Kernextrakten aus nicht aktivierten primären T-Lymphozyten detektierbar (Abb. 4.23A; Lehmacher, 2001). Brg1 dagegen konnte erst mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Nach 90 min Stimulierung war die Expression aller drei Proteine induziert.

Eine weitere Frage war, ob die Induktion von CBP und Brg1 spezifisch für primäre T-Zellen ist. Deswegen wurden im Folgenden Gesamtzellextrakte aus Jurkat Zellen und aus primären humanen Hautfibroblasten im Western Blot bezüglich der

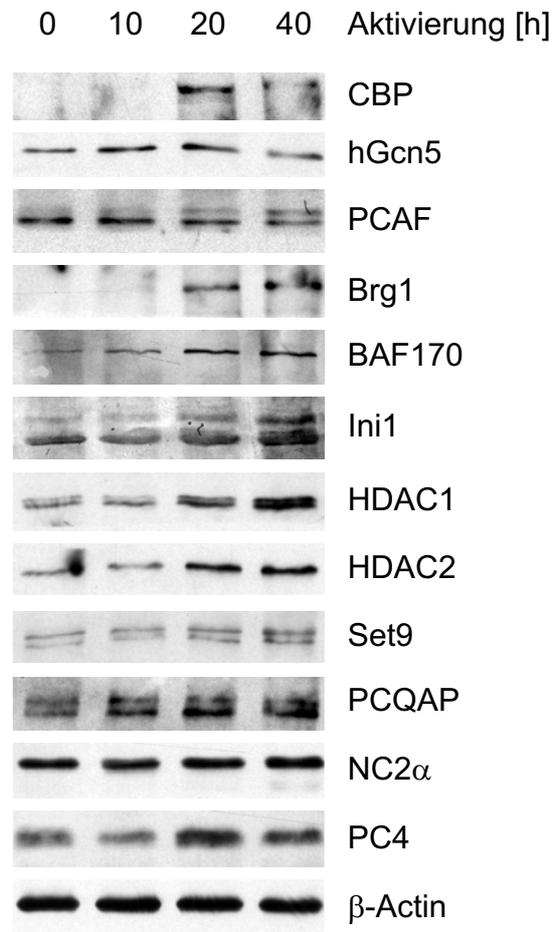


Abbildung 4.22: **Proteinmengen von Transkriptionscofaktoren in primären T-Zellen.** Gesamtzellextrakte nicht aktivierter und aktivierter T- Lymphozyten wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinmengen verschiedener Cofaktoren wurden mittels Western Blot Analyse mit den angegebenen Antikörpern untersucht. Als Kontrolle diente β -Actin.

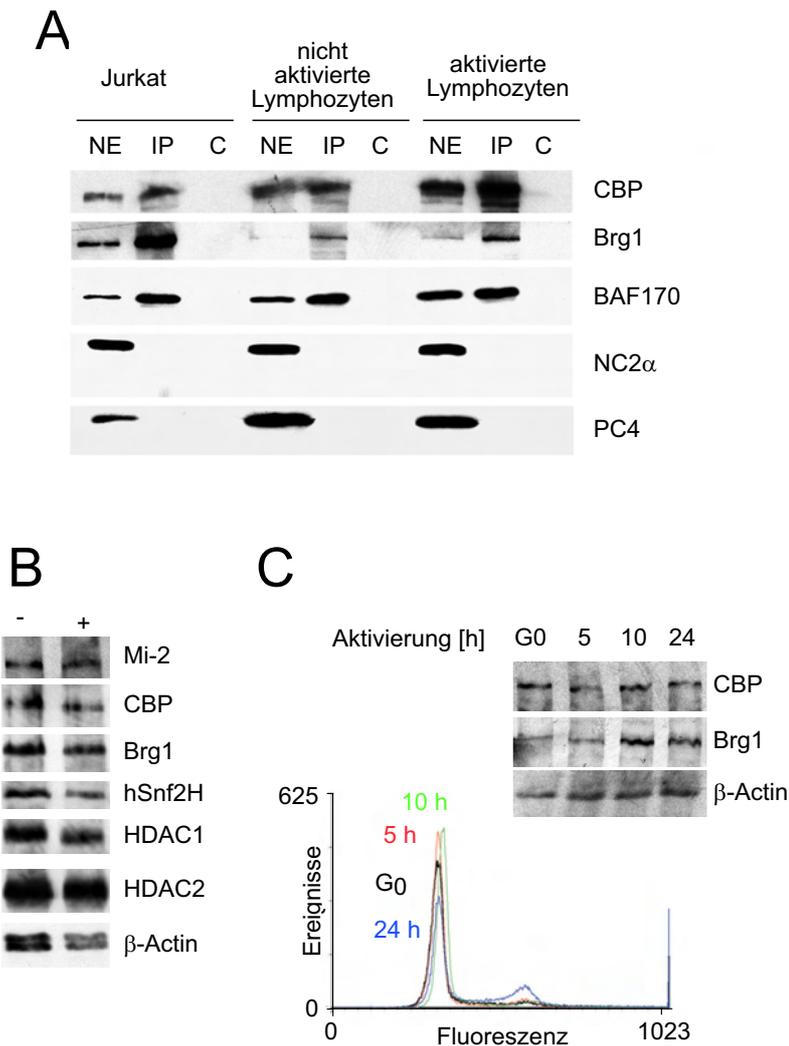


Abbildung 4.23: **Keine oder geringe Veränderung der Proteinmengen von Cofaktoren in Jurkat J6 Zellen oder primären Zellen.** (A) Aus Kernextrakten nicht aktivierter und 90 min aktivierter primärer T-Lymphozyten sowie nicht aktivierter Jurkat Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit einem PCQAP-spezifischen Antikörper durchgeführt. Kernextrakte (NE), Immunpräzipitationen (IP) und Immunpräzipitationen mit einem Isotyp-Kontrollantikörper (C) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die Abbildung ist Lehmacher (2001) entnommen. (B) Gesamtzellextrakte aus nicht aktivierten und 24 h aktivierten Jurkat J6 Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern untersucht. (C) Gesamtzellextrakte aus „gehungerten“ und restimulierten primären humanen Hautfibroblasten wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Zusätzlich wurden die Zellzyklusphasen der Proben im Durchflusszytometer analysiert.

Expression dieser Proteine untersucht. Nach 24 h Stimulierung von Jurkat Zellen blieben die Mengen an CBP und Brg1 gleich (Abb. 4.23B). Ebenso war die Expression von Mi-2, der ATPase des NURD-Komplexes, von hSnf2H, einer Unter-einheit des *chromatin remodeling* Komplexes FACT, und von HDAC1 und HDAC2 konstant. Als Kontrolle diente β -Actin.

In primären Hautfibroblasten wurde die Expression von Brg1 und CBP nach „Hungern“ durch Serumentzug und nach anschließender Restimulierung mit Serum analysiert. Der Zellzyklus der einzelnen Proben wurde mittels DNA-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt. In Abb. 4.23C sieht man, dass die CBP-Menge konstant blieb. Die Brg1-Konzentration nahm nach 10 h Stimulierung zu. Als Ladungskontrolle diente auch hier β -Actin. Zusammengefasst scheint die Induktion von Brg1 und CBP spezifisch für primäre T-Zellen zu sein, wobei Brg1-Induktion auch in anderen primären Zellen nachweisbar ist.

4.5.2 Anstieg der Brg1-Besetzung und der H3 K4-Tri-methylierung auf aktiven Genen

Brg1 und CBP scheinen in der Aktivierung von T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen. Brg1 wird nach Stimulierung an die Kernmatrix rekrutiert und beeinflusst wahrscheinlich die Chromatinstruktur in T-Lymphozyten (Zhao et al., 1998). Von CBP weiß man z. B., dass es für die Expression von IL-2 wichtig ist (Bodor et al., 2000). Von Interesse war nun, ob sich die Induktion von Brg1 und CBP auf der Ebene einzelner Gene auswirkt. Zur Beantwortung dieser Frage eignet sich die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP), mit der man die Anwesenheit von Proteinen auf bestimmten DNA-Sequenzen *in vivo* nachweisen und quantifizieren kann (s. 3.8).

Die Rekrutierung von Brg1 und CBP wurde an Genen untersucht, von denen bekannt ist, dass sie nach Stimulierung in T-Zellen aktiviert werden: an den Genen von Interleukin-2 (IL-2), von der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) und von der β -Kette des T-Zellrezeptors (TCR β). Daneben wurden das im Zellzyklus regulierte Gen von Histon H2B (H2B) und die konstitutiv aktiven Gene von Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) und von Deoxycytidinkinase (DCK) analysiert. Sowohl CD25 als auch IL-2 sind bekannte Zielgene der T-Zellaktivierung. Es gibt zahlreiche Studien zu ihrer Aktivierung, die den Beginn ihrer mRNA-Produktion in den Bereich von 2 bis 6 h nach Stimulierung für IL-2 und von 2 bis 30 h für CD25 legen (Plana et al., 1991; Leung et al., 1992). Vom TCR β -Gen weiß man, dass es nach der Stimulierung von T-Zellen mit Antigen induziert wird (Lennon et al., 2000). Für H2B hat man 15 Gene gefunden, deren Expression in der S-Phase des Zellzyklus hochreguliert wird (Übersicht in Osley, 1991; Marzluff und Duronio, 2002). Für die nachfolgenden Experimente wurde das Gen der Variante R im *microcluster* auf Chromosom 6 verwendet (Albig et al., 1999). Die mRNA-Mengen von EF1 α und DCK bleiben dagegen nach der Stimulierung primärer T-Lymphozyten

konstant (Mitchell et al., 1993; Hamalainen et al., 2001). Für alle Gene wurden Primer in der Nähe der jeweiligen Promotoren benutzt, mit Ausnahme von IL-2, CD25 und des TCR β -Lokus. Bei IL-2 und CD25 wurden zusätzlich Primer nahe der Polyadenylierungsstelle (3'-Ende) gewählt. Im TCR β -Lokus lagen die spezifischen Primer im offenen Leserahmen der ersten konstanten Region (konst. Region), nahe der Polyadenylierungsstelle (polyA) der zweiten konstanten Region und im Enhancer, der sich *downstream* des Gens befindet.

Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit von ChIPs aus unterschiedlichen Blutspenden überprüft. Immunpräzipitationen gegen RNA-Polymerase II ergaben bei drei Spendern unterschiedliche Werte (Abb. 4.24). Allerdings sind die Tendenzen für die einzelnen Gene bei allen Spendern gleich. Man erhält also aus unterschiedlichen Blutspenden quantitativ unterschiedliche, aber qualitativ gleiche Ergebnisse. Dies bestätigte sich auch bei ChIPs gegen andere Proteine. Für die folgenden ChIPs ist jeweils repräsentativ das Ergebnis nur einer Blutspende abgebildet.

Immunpräzipitationen mit Brg1-Antikörpern ergaben eine Zunahme auf allen untersuchten Genen nach Stimulierung (Abb. 4.25, links oben). Dieser Anstieg war im Promotorbereich der Gene genauso zu sehen wie am 3'-Ende von IL-2 und CD25 und im TCR β -Lokus. Am geringsten fiel die Zunahme am Enhancer des TCR β -Lokus und am 3'-Ende des CD25-Gens aus. Auffallend war die starke Präsenz von Brg1 in der konstanten Region des TCR β -Lokus, während auf den Genen DCK, H2B und EF1 α sehr wenig Brg1 vorhanden war.

Parallel wurde eine Verteilungsanalyse von RNA-Polymerase II durchgeführt, die die Transkriptionsaktivität der einzelnen Gene widerspiegelt. Die verwendeten Antikörper waren spezifisch für den N-Terminus der großen Untereinheit, so dass CTD-Modifikationen das Ergebnis nicht beeinflussten. Man sieht, dass bei allen Genen die hRPB1-Besetzung, und damit die Transkriptionsaktivität, im stimulierten Zustand höher war (Abb. 4.25, links unten). Eine Ausnahme bildete das Gen DCK, bei dem die Besetzung mit RNA-Polymerase II nach Stimulierung kaum zunahm. Wie schon bei Brg1 war auch die relative Besetzung mit RNA-Polymerase II für die einzelnen Gene unterschiedlich. Auffallend war die starke Rekrutierung von hRPB1 an die Promotoren von CD25, EF1 α und H2B. Von diesen Promotoren war einzig H2B bereits im nicht aktivierten Zustand stark mit RNA-Polymerase II besetzt. Am EF1 α -Promotor schien die Rekrutierung ungewöhnlich, da dieses Gen konstitutiv exprimiert sein sollte (s. o.).

Die Methylierung von H3 K4 gilt als Kennzeichen aktiv transkribierter Gene (Strahl et al., 1999; Santos-Rosa et al., 2002). Daneben wurde gezeigt, dass sich die Lokalisierung dieser Modifikation nach T-Zellstimulierung änderte (s. 4.4.2). Dies führte zu der Frage, ob in primären T-Zellen die H3 K4-Methylierung einzelner Gene ihre Transkriptionsaktivität aufzeigt. Erstaunlicherweise blieb die H3 K4-Dimethylierung auf den untersuchten Genen weitgehend konstant (Abb. 4.25, rechts unten). Ausnahmen bildeten der Enhancer des TCR β -Lokus und das 3'-Ende des IL-2-Gens, wo die H3 K4-Dimethylierung jeweils deutlich anstieg.

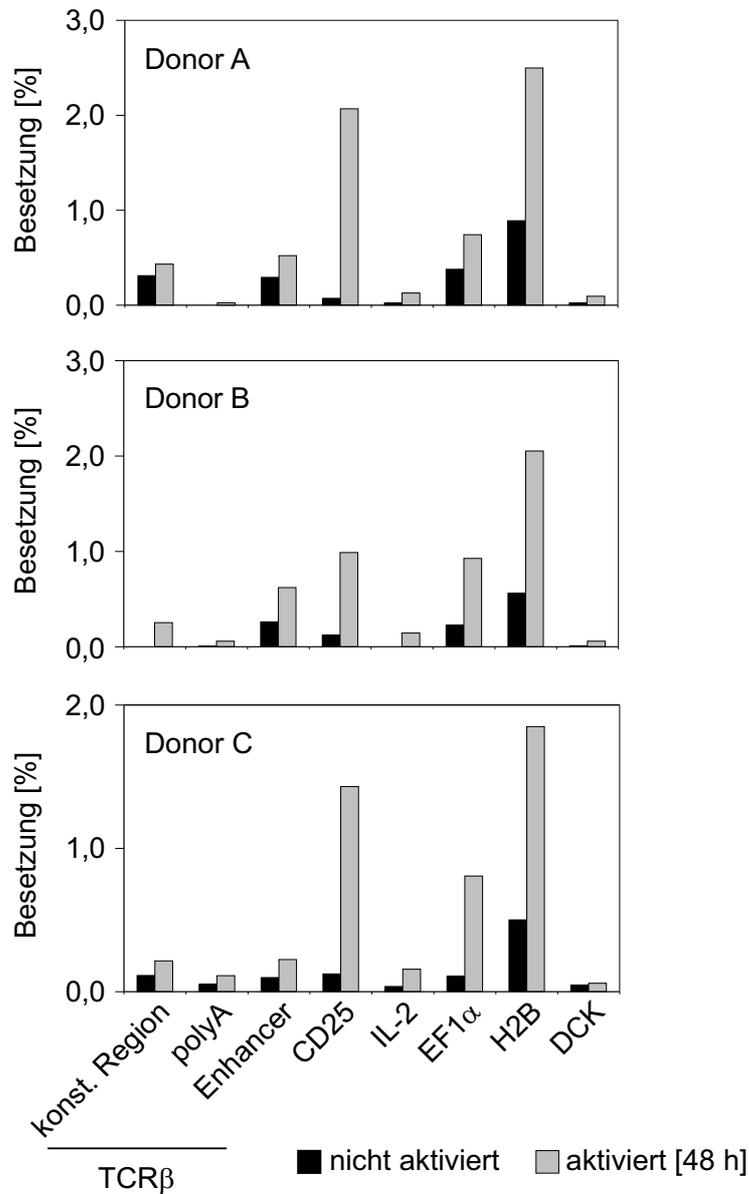


Abbildung 4.24: **Chromatinimmunpräzipitationen in primären T-Zellen geben für unterschiedliche Spender qualitativ gleiche Ergebnisse.** Immunpräzipitationen wurden mit vernetztem Chromatin aus nicht aktivierten und 48 h aktivierten primären T-Lymphozyten mit Hilfe eines hRPB1-spezifischen Antikörpers durchgeführt. Die Präzipitate wurden in *real time PCR* nahe der folgenden Promotoren analysiert: CD25, IL-2, EF1 α , H2B und DCK. PCR-Reaktionen auf dem TCR β -Lokus wurden im offenen Leserahmen der ersten konstanten Region (konst. Region), nahe der Polyadenylierungsstelle der zweiten konstanten Region (polyA) und im Enhancer durchgeführt. Die drei Diagramme entsprechen Zellen von drei unterschiedlichen Spendern.

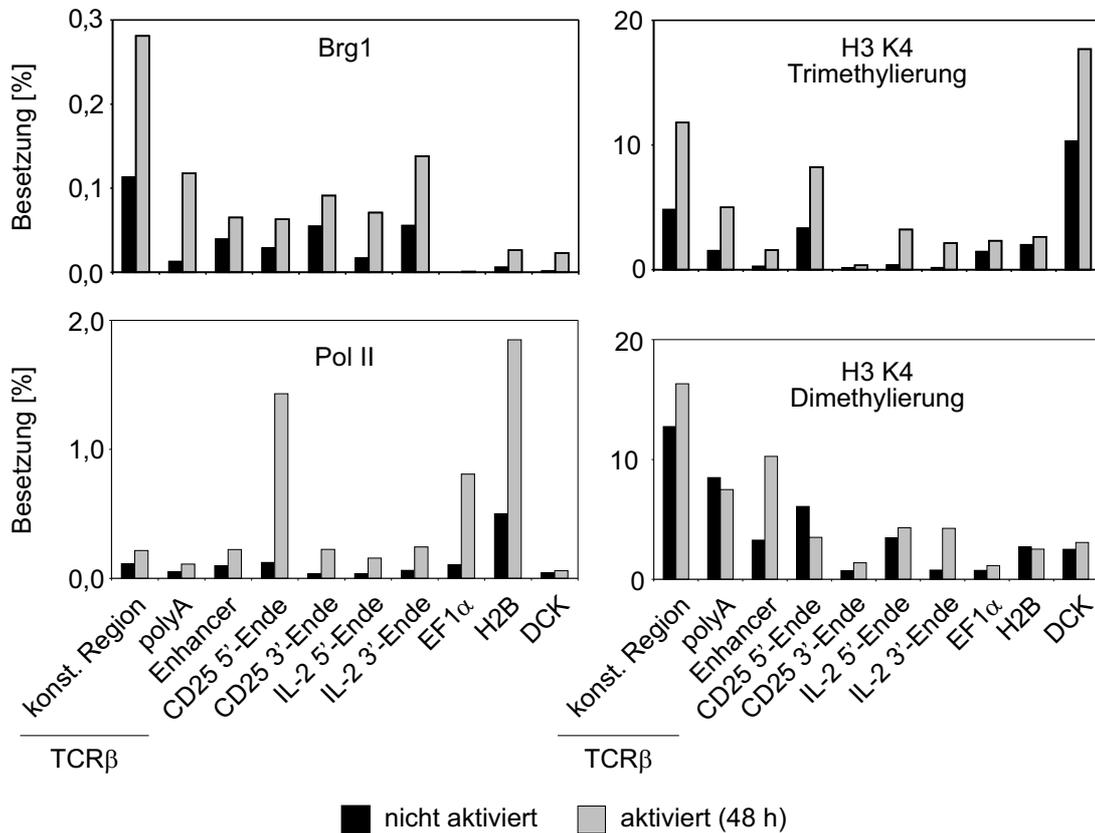


Abbildung 4.25: **Analyse der H3 K4-Methylierung und der Brg1- und RNA-Polymerase II-Besetzung vor und nach T-Zellaktivierung.** Immunpräzipitationen wurden mit vernetztem Chromatin aus nicht aktivierten und 48 h aktivierten primären T-Lymphozyten mit Hilfe spezifischer Antikörper, wie angegeben, durchgeführt. Die Präzipitate wurden in *real time PCR* auf den folgenden Genen analysiert: CD25 (jeweils nahe dem 5'- und dem 3'-Ende), IL-2 (jeweils nahe dem 5'- und dem 3'-Ende), EF1 α , H2B und DCK. PCR-Reaktionen auf dem TCR β -Lokus wurden im offenen Leserahmen der ersten konstanten Region (konst. Region), nahe der Polyadenylierungsstelle der zweiten konstanten Region (polyA) und im Enhancer durchgeführt.

Auffallend hohe Dimethylierungswerte zeigte im Vergleich zu den anderen Genen der TCR β -Lokus.

Im Gegensatz zur Dimethylierung nahm die H3 K4-Trimethylierung auf allen untersuchten Sequenzen bis zu achtfach zu (Abb. 4.25, rechts oben). Am geringsten fiel der Anstieg auf den Promotoren von EF1 α und H2B und am 3'-Ende des CD25-Gens aus. Die höchsten Trimethylierungswerte konnten – sowohl im nicht aktivierten als auch im aktivierten Zustand – in der konstanten Region des TCR β -Lokus und an den Promotoren von CD25 und DCK beobachtet werden. Interessanterweise war die H3 K4-Trimethylierung in den näher dem 5'-Ende gelegenen Sequenzen des TCR β -Lokus sowie der CD25- und IL-2-Gene höher als am 3'-Enhancer bzw. an den 3'-Enden. Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen an aktiven Hefegenen überein, die am 5'-Ende die höchste Trimethylierung aufweisen (Ng et al., 2003).

Eine noch offene Frage war, ob die Zunahme der H3 K4-Trimethylierung auf einzelnen Genen spezifisch für primäre T-Zellen ist. Deshalb wurde diese Modifikation in aktivierten Jurkat J6 Zellen – also transformierten Zellen – auf dem TCR β -Lokus untersucht. Die PCR-Reaktionen wurden im offenen Leserahmen der ersten konstanten Region und im Enhancer durchgeführt. Beide Sequenzen waren an H3 K4 trimethyliert. Die Modifikation war jedoch im aktivierten Zustand um den Faktor 40 bzw. 5 niedriger als in primären Zellen und änderte sich nach Stimulierung kaum (Abb.4.26; Jünemann, in Vorbereitung). Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass die H3 K4-Trimethylierung bevorzugt in primären Zellen auftritt.

Schließlich sollten die Gene bezüglich der Anwesenheit von CBP untersucht werden. Überraschenderweise konnte CBP auf den analysierten Genen nicht detektiert werden, obwohl es unter denselben Bedingungen in Jurkat J6 Zellen nachgewiesen worden war (Jünemann, in Vorbereitung). Als weiterer Indikator für CBP wurde die H3 K14-Acetylierung untersucht (Abb. 4.26B). Diese Modifikation änderte sich auf den analysierten Sequenzen nach Stimulierung kaum. Lediglich im Leserahmen des TCR β -Lokus und auf dem H2B-Gen nahm sie um den Faktor 1,5 bis 2 ab.

Zusammenfassend hat die Analyse einiger ausgewählter Gene ergeben, dass die Trimethylierung von H3 K4 und die Besetzung mit Brg1 nach der T-Zellaktivierung zunahm. Die Dimethylierung von H3 K4 änderte sich dagegen kaum.

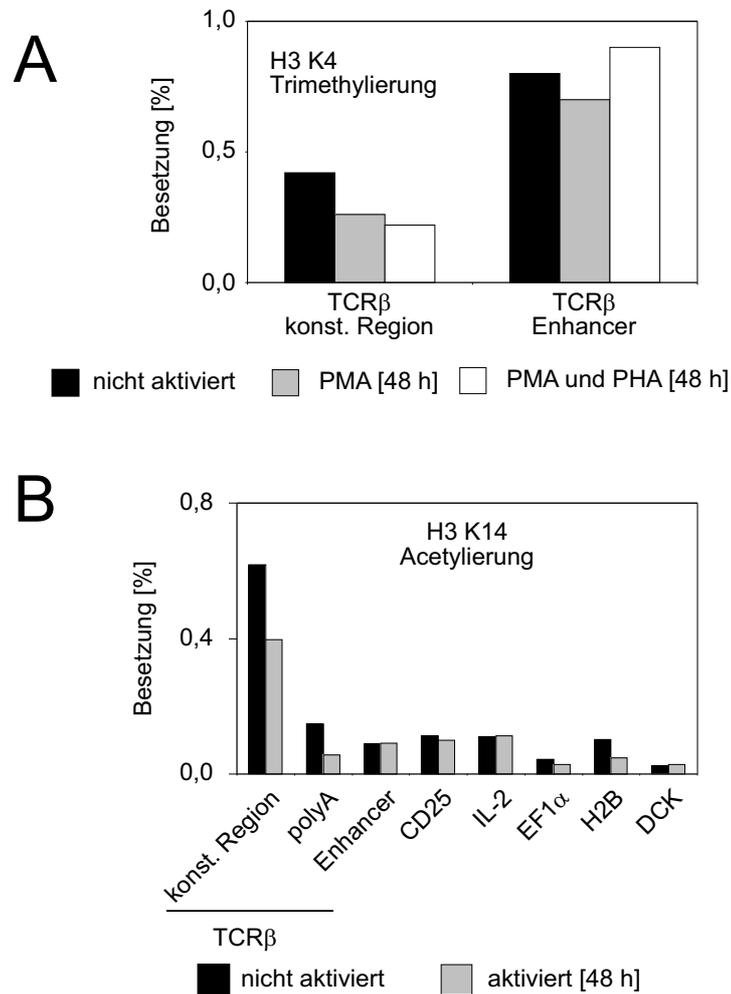


Abbildung 4.26: Die H3 K4-Trimethylierung in Jurkat J6 Zellen und die H3 K14-Acetylierung in primären T-Zellen bleiben nach Stimulierung gleich. (A) Immunpräzipitationen wurden mit vernetztem Chromatin aus nicht aktivierten und 48 h mit PMA oder PHA und PMA aktivierten Jurkat J6 Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen H3 K4-Trimethylierung durchgeführt. Die Präzipitate wurden in *real time PCR* im offenen Leserahmen der ersten konstanten Region (konst. Region) und im Enhancer des TCR β -Lokus analysiert (Jünemann, in Vorbereitung). (B) Immunpräzipitationen wurden mit vernetztem Chromatin aus nicht aktivierten und 48 h aktivierten primären T-Lymphozyten mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen H3 K14-Acetylierung durchgeführt. Die Präzipitate wurden in *real time PCR* nahe der folgenden Promotoren analysiert: CD25, IL-2, EF1 α , H2B und DCK. PCR-Reaktionen auf dem TCR β -Lokus wurden im offenen Leserahmen der ersten konstanten Region (konst. Region), nahe der Polyadenylierungsstelle der zweiten konstanten Region (polyA) und im Enhancer durchgeführt.

4.5.3 Die Lokalisierung von Cofaktoren während der T-Zellaktivierung

4.5.3.1 Lokalisierung von Brg1 und CBP in offenen Chromatinregionen aktivierter T-Zellen

CBP spielt in T-Lymphozyten eine wichtige Rolle. So bindet es an NF-AT, einen wichtigen Transkriptionsfaktor der T-Zellstimulierung, und reguliert dessen Transaktivierungsdomäne (García-Rodríguez und Rao, 1998; Avots et al., 1999). Zudem nimmt die Aktivität der CBP-eigenen Transaktivierungsdomäne nach T-Zellaktivierung zu (Riggins und Clipstone, 2001). In der vorliegenden Arbeit stieg die Menge an CBP nach T-Zellstimulierung deutlich an, aber auf der Ebene einzelner Gene konnte das Protein nicht nachgewiesen werden.

Von Interesse war daher die Frage, in welchen Regionen des Zellkerns CBP zu finden ist. Dazu wurden nicht aktivierte und 48 h aktivierte T-Lymphozyten mit Antikörpern gegen CBP gefärbt und im konfokalen Mikroskop analysiert. Gleichzeitig wurde die DNA mit Propidiumiodid sichtbar gemacht (Abb. 4.27A). Zunächst sah man, dass aktivierte Zellen viel besser mit dem CBP-spezifischen Antikörper angefärbt wurden als nicht aktivierte. Diese Beobachtung spricht nochmal für die Zunahme der CBP-Menge nach Stimulierung (s. 4.5.1). CBP war vor allem in aktivierten Zellen fast ausschließlich in Regionen mit sehr niedrigem DNA-Gehalt (mit „o“ (offen) gekennzeichnet) lokalisiert.

Analog wurde die Lokalisierung von Brg1 in nicht aktivierten und aktivierten Lymphozyten überprüft (Abb. 4.27B). Auch für Brg1 wurde durch die Immunfluoreszenzanalyse die Induktion der Expression nach Stimulierung bestätigt. Ähnlich wie CBP war Brg1 in Regionen mit geringem DNA-Gehalt (mit „o“ (offen) gekennzeichnet) konzentriert. Diese Verteilung ließ sich in geringem Umfang schon in nicht aktivierten Zellen beobachten, wobei hier Regionen mit niedrigem oder hohem DNA-Gehalt noch nicht stark ausgeprägt waren. Deutlicher wurde die Bevorzugung DNA-armer Bereiche im stimulierten Zustand. Dies entspricht den Beobachtungen von Reyes und Kollegen. Sie sahen, dass Brg1 in HeLa Zellen außerhalb der Nukleoli und der DNA-reichen Heterochromatinregionen und entfernt von der Kernmembran lokalisiert ist (Reyes et al., 1997). Sowohl für CBP als auch für Brg1 zeigte sich also, dass sie vor allem nach der T-Zellaktivierung in offenen Chromatinregionen lokalisiert sind.

4.5.3.2 Partielle Colokalisierung von Brg1 und CBP in aktivierten T-Zellen

Zur Dokumentation der Colokalisierung von Brg1 und CBP in offenen Chromatinregionen wurden sekundäre Antikörper eingesetzt, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt waren. In nicht aktivierten Zellen war die Lokalisierung beider Faktoren aufgrund der niedrigen Expression schwer zu bestimmen (Abb. 4.28B, obere Reihe). Nach Stimulierung zeigte sich, dass die Verteilung von

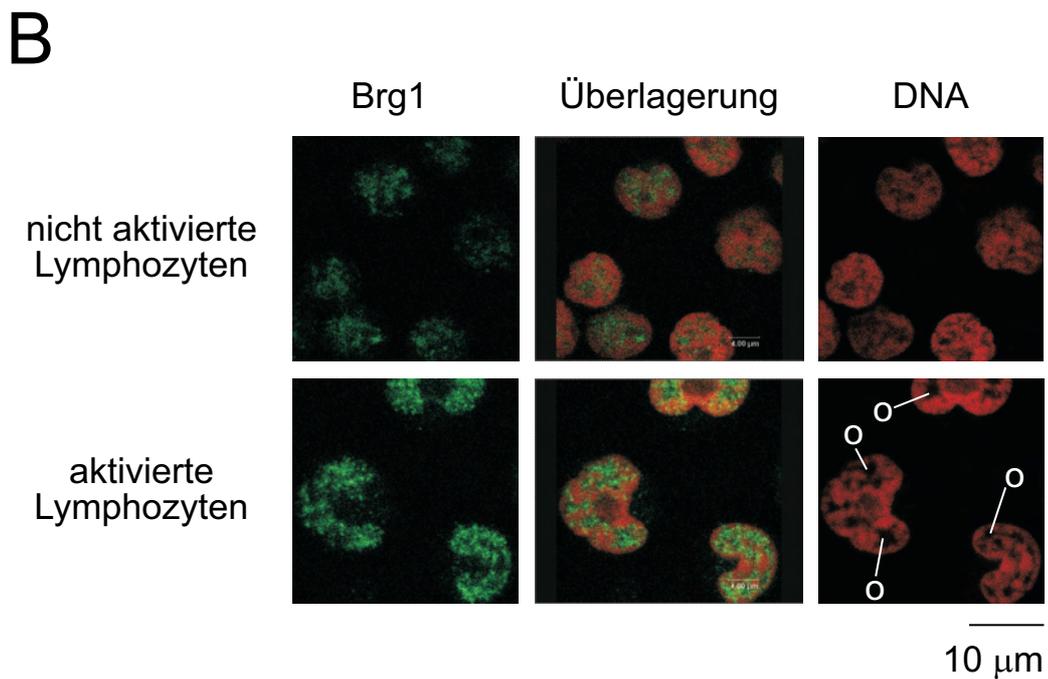
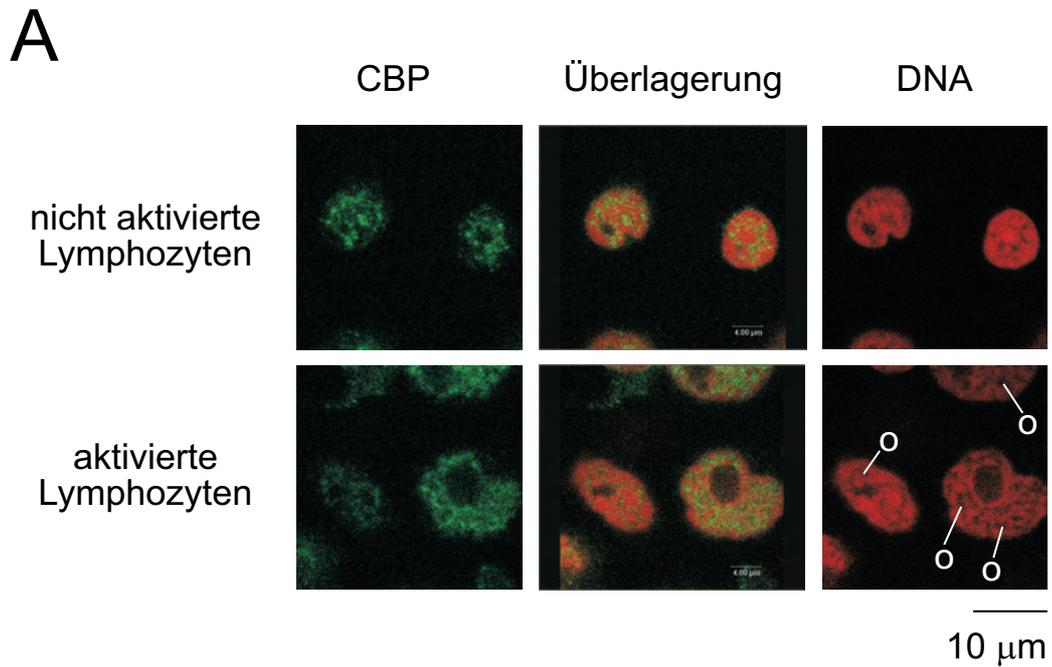


Abbildung 4.27: **Lokalisierung von Brg1 und CBP in primären Lymphozyten.** Nicht aktivierte und 48 h aktivierte T-Lymphozyten wurden mit CBP-spezifischem (**A**) oder Brg1-spezifischem (**B**) Antikörper für die Analyse im konfokalen Mikroskop gefärbt (grün). Zusätzlich wurde die DNA mit Propidiumiodid (rot) sichtbar gemacht. In der mittleren Spalte ist eine Überlagerung zu sehen. Beispiele für offene Chromatinregionen sind mit „o“ (offen) gekennzeichnet.

CBP und Brg1, wie erwartet, in weiten Bereichen übereinstimmte (Abb. 4.28A). Interessanterweise war die Expression von CBP und Brg1 in einigen aktivierten T-Lymphozyten unterschiedlich ausgeprägt. Manche Zellen exprimierten CBP stark und Brg1 schwach (in Abb. 4.28B durch weiße Pfeile gekennzeichnet) oder auch umgekehrt (in Abb. 4.28B durch magentafarbene Pfeile gekennzeichnet). Die Expression der beiden Faktoren scheint demnach durch verschiedene Einflüsse reguliert zu werden. Zusammenfassend sind beide Cofaktoren in offenen Chromatinregionen konzentriert, wo ihre Verteilung zu einem großen Teil überlappt.

4.5.3.3 Partielle Colokalisierung von Brg1 mit H3 K4-Trimethylierung

Weiter wurde gefragt, ob Brg1 und H3 K4-Trimethylierung colokalisieren. Da die Rekrutierung von Brg1 und die H3 K4-Trimethylierung auf der Ebene einzelner Gene teilweise korrelierte, könnte man ebenso eine Korrelation auf der Ebene einer einzelnen Zelle erwarten. Nicht aktivierte und aktivierte T-Lymphozyten wurden demnach parallel mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Wie zuvor war in nicht aktivierten Zellen die Verteilung von Brg1 kaum detektierbar, während die H3 K4-Trimethylierung bereits stark ausgeprägt war (Abb. 4.29A). Nach Stimulierung stimmte die Verteilung von Brg1 in weiten Teilen mit der H3 K4-Trimethylierung überein (Abb. 4.29B). Jedoch deckten sich die Stellen mit den jeweils höchsten Konzentrationen nicht. Die vorgestellte Analyse konnte somit keinen direkten Zusammenhang zwischen Brg1-Rekrutierung und H3 K4-Trimethylierung aufzeigen. Allerdings brachte sie den Nachweis, dass sich Brg1-Präsenz und H3 K4-Trimethylierung nicht ausschließen und zumindest zeitlich und örtlich zusammenfallen können.

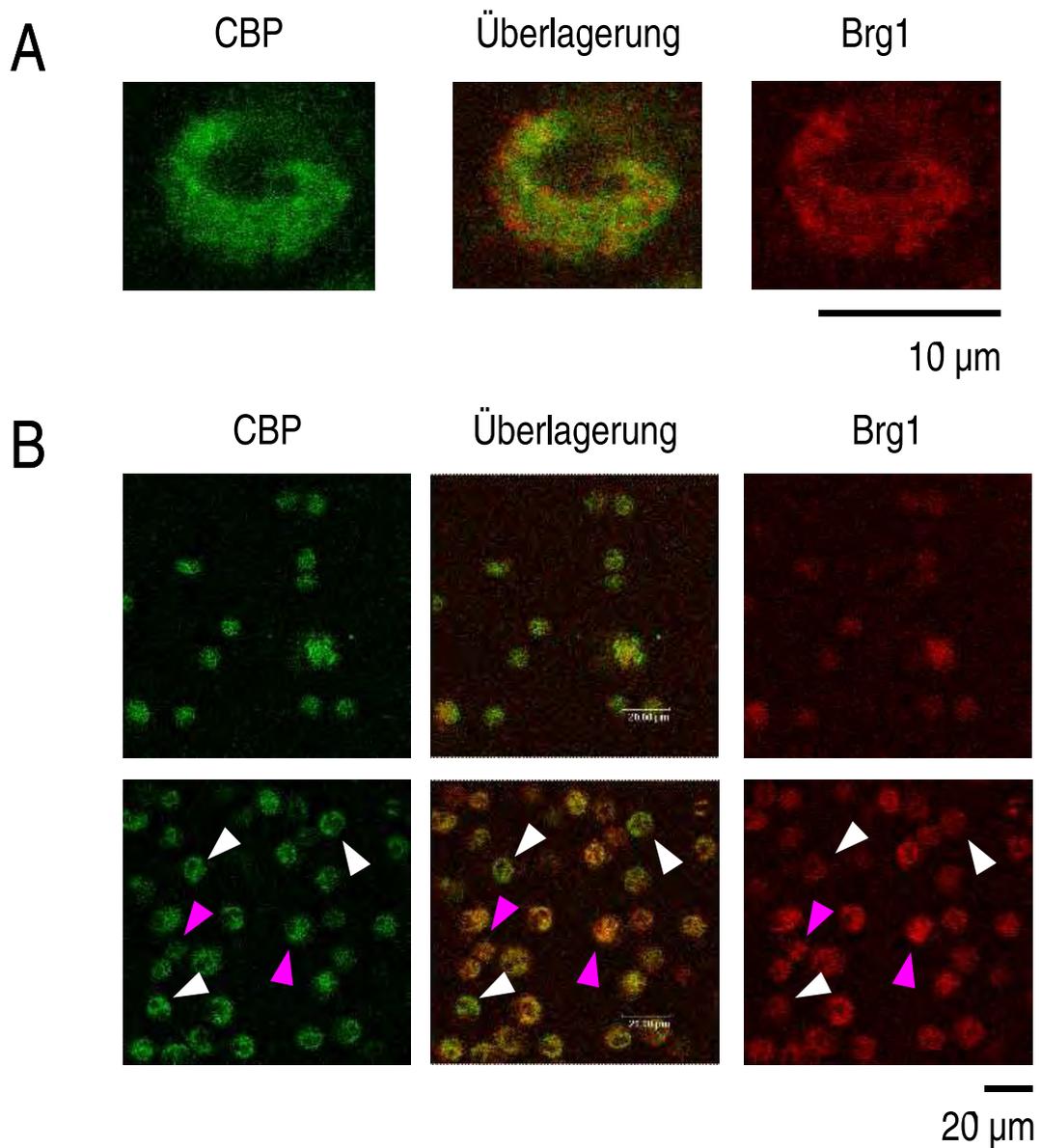


Abbildung 4.28: **Colokalisierung von Brg1 mit CBP.** (A) Aktivierte (2 d) primäre T-Lymphozyten wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CBP (grün) und Brg1 (rot) gefärbt. Das mittlere Bild zeigt eine Überlagerung. (B) Nicht aktivierte und aktivierte (2 d) T-Zellen wurden wie in (A) gefärbt. Die Zellen sind hier in einer schwachen Vergrößerung dargestellt, um eine große Anzahl zu zeigen. Beispiele für Zellen, die besonders stark CBP exprimieren, wurden mit weißen Pfeilen versehen, Beispiele für Zellen, die mehr Brg1 exprimieren, mit magentafarbenen Pfeilen.

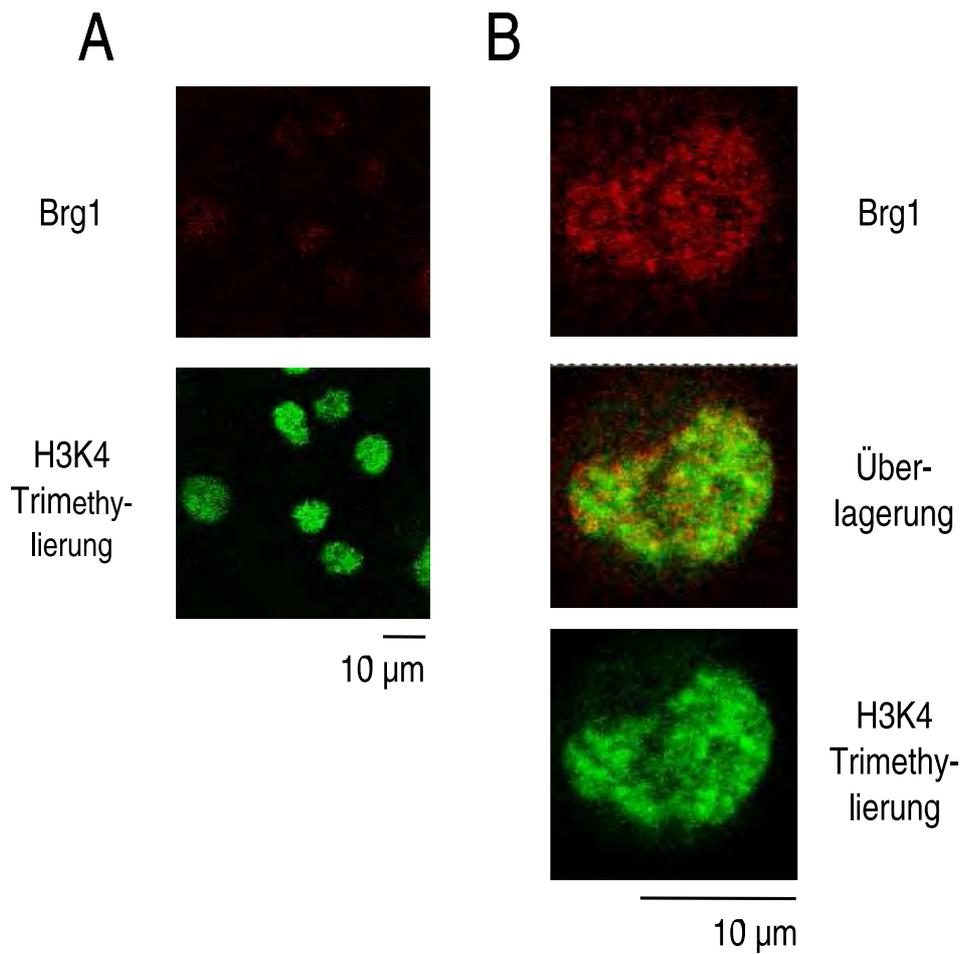


Abbildung 4.29: **Colokalisierung von Brg1 mit H3 K4-Trimethylierung.** Nicht aktivierte (A) und aktivierte (B) Lymphozyten wurden mit Antikörpern gegen Brg1 (rot) und H3 K4-Trimethylierung (grün) gefärbt.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Die basale Transkriptionsmaschine in der T-Zellaktivierung

5.1.1 Allgemeine Transkriptionsfaktoren

In der vorliegenden Arbeit sollten Mechanismen gefunden werden, die die Zunahme der globalen Transkriptionsaktivität nach T-Zellstimulierung bewirken können. Ausgangspunkt der Analysen war zunächst die basale Transkriptionsmaschine. In einem einfachen Modell könnte alleine die Zunahme einer limitierenden Untereinheit oder die Modifikation eines kritischen Faktors eine enorm gesteigerte Transkriptionsaktivität ermöglichen.

Bei den meisten untersuchten GTFs war die Expression mäßig hochreguliert. Die Zunahme der GTF-Mengen kann wahrscheinlich alleine durch die allgemeine Erhöhung der Proteinsynthese (Pogo et al., 1966; Kay, 1968) und durch die Zunahme des Zellvolumens aktivierter Lymphozyten (Kaczmarek et al., 1987) erklärt werden. In der vorgestellten Analyse waren Zelläquivalente aufgetragen, wodurch der Effekt einer allgemein höheren Proteinmenge nicht ausgeglichen wurde (s. Abb 4.5).

Erstaunlich war, dass sich die Menge an RAP74, der großen Untereinheit von TFIIF, nicht änderte. Darüber hinaus war die RAP74-Konzentration in primären Lymphozyten vergleichbar mit der in Jurkat Zellen, während alle anderen GTFs in den transformierten Zellen deutlich höher exprimiert waren. Man kann also davon ausgehen, dass RAP74 schon in nicht aktivierten Lymphozyten in großer, nicht limitierender Menge vorliegt. Dies legt den Schluss nahe, dass RAP74 bzw. TFIIF eine wichtige Funktion in den nicht aktivierten Zellen erfüllt. Möglicherweise spielt hier die Eigenschaft von TFIIF eine Rolle, die unspezifische Bindung von RNA-Polymerase II an DNA zu verhindern (Conaway und Conaway, 1993). Man könnte sich vorstellen, dass ein Teil der in nicht aktivierten T-Zellen vorhandenen RNA-Polymerase II aufgrund der geringen Transkriptionsaktivität sozusagen

„nicht benötigt“ wird. TFIIF würde mit diesem Teil der Polymerase in Lösung interagieren und eine unspezifische DNA-Bindung verhindern. Nach Stimulierung könnte die RNA-Polymerase II direkt an aktivierte Promotoren rekrutiert werden. Dieses Modell beinhaltet sicher nur eine von vielen möglichen Funktionen von TFIIF in nicht aktivierten T-Zellen und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden.

5.1.2 RNA-Polymerase II

5.1.2.1 Mögliche Limitierung aktiver RNA-Polymerase II in nicht aktivierten Lymphozyten über die Menge einzelner Untereinheiten

Die Untersuchung von RNA-Polymerase II, dem zentralen Element der basalen Transkriptionsmaschine, ergab, dass die Mengen ihrer Untereinheiten reguliert sind. Die relativ starke Zunahme der großen Untereinheit veranlasst zu der Spekulation, dass die Menge an aktiver RNA-Polymerase II möglicherweise über die Verfügbarkeit von hRPB1 gesteuert wird. Da hRPB1 die größte Untereinheit ist und zusammen mit hRPB2 die zentrale Einheit der RNA-Polymerase II bildet (Cramer et al., 2000), wäre eine Regulation der hRPB1-Menge gleichzeitig eine Regulation der Menge an aktiver RNA-Polymerase II.

Ebenso ist die Menge der Untereinheit hRPB3 reguliert. Ihr wird eine Rolle beim Zusammenbau der RNA-Polymerase II zugeschrieben (Cramer et al., 2000). Falls hRPB3 in nicht aktivierten T-Zellen limitierend ist, kann dadurch der Zusammenbau aktiver RNA-Polymerase II und somit die Transkriptionsaktivität eingeschränkt werden.

Auffallend war, dass die Mengen der beiden Untereinheiten hRPB4 und hRPB7 zunahmen. In logarithmisch wachsender *S. cerevisiae* beobachtete man, dass RPB4 nur in etwa 20% der RNA-Polymerase II-Komplexe vorhanden ist, während es in Hefezellen der stationären Phase stöchiometrisch vorliegt (Choder und Young, 1993). Man denkt, dass RPB4 in der Aktivierung von Stress induzierten Genen eine Rolle spielt (Choder und Young, 1993). Zudem scheint RPB4 eine wachstumsregulierende Funktion auszuüben. Hefezellen, die diese Untereinheit überexprimieren, wachsen in der „post-logarithmischen“ Phase schneller als Wildtypzellen (Choder, 1993). Über die Funktion von hRPB4 in Säugerzellen ist dagegen sehr wenig bekannt. In Hefe wie in Säugerzellen interagiert RPB4 mit RPB7 in einem Subkomplex, der in Hefe unter milden, denaturierenden Bedingungen von der RNA-Polymerase II abgelöst werden kann (Edwards et al., 1991; Khazak et al., 1998). Man könnte die Aktivierung von T-Zellen einer Stresssituation gleichsetzen, in der hRPB4 in größerer Menge benötigt wird. Eine parallele Erhöhung der hRPB4- und hRPB7-Mengen würde man erwarten, da die beiden Untereinheiten einen Subkomplex bilden, in dem sie stöchiometrisch vorliegen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten allerdings keine weiteren Analysen zur Rolle

des hRPB4-hRPB7-Komplexes in Säugerzellen und speziell in T-Lymphozyten durchgeführt werden.

5.1.2.2 Einfluss der CTD-Phosphorylierung auf die allgemeine Transkriptionsaktivität

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass die CTD-Kinase-Aktivität in primären Lymphozyten nach Stimulierung induziert wird (Garriga et al., 1998; Herrmann et al., 1998). Dies wird vor allem auf eine Erhöhung der Cyclin T1- und der CDK9-Menge, also der P-TEFb-Menge, zurückgeführt. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde in stimulierten Lymphozyten eine Hyperphosphorylierung der CTD von RNA-Polymerase II beobachtet. Allerdings wurde hier zum ersten Mal zwischen der Phosphorylierung an Serin 2 (Ser2) und an Serin 5 (Ser5) unterschieden. Generell nahm die Phosphorylierung an beiden Resten deutlich zu, jedoch waren die Modifikationen unterschiedlich auf verschiedene Zellfraktionen verteilt.

Im Augenblick geht man davon aus, dass die Phosphorylierung von Ser2 oder Ser5 verschiedene Funktionszustände der RNA-Polymerase II im Transkriptionszyklus kennzeichnet. Ein aktuelles Modell besagt, dass unphosphorylierte RNA-Polymerase II im Präinitiationskomplex an den Promotor rekrutiert wird (Komarnitsky et al., 2000). Die TFIIH-Untereinheiten CDK7/Cyclin H phosphorylieren dann die CTD an Ser5. Die Phosphorylierung *per se* erleichtert die Bindung von Guanylyltransferase, einem mRNA *capping* Enzym, während speziell die Ser5-Phosphorylierung die Aktivität dieses Enzyms stimuliert (Ho und Shuman, 1999). Nach dem Beginn der Elongation dissoziieren die *capping* Enzyme wegen der Dephosphorylierung von Ser5 oder wegen einer weiteren Modifikation der CTD (Komarnitsky et al., 2000). Nun wird Ser2 phosphoryliert, was die Bindung von Elongations-, Terminations- oder Prozessierungsfaktoren erleichtern könnte (Komarnitsky et al., 2000). Gute Kandidaten für die Ser2-Phosphorylierung sind P-TEFb (CDK9/ Cyclin T) und der Mediator-Komplex (CDK8/Cyclin C). Nach einem Transkriptionszyklus wird RNA-Polymerase II von Fcp1 dephosphoryliert und kann damit wieder zum Promotor rekrutiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde Ser5-Phosphorylierung vor allem in Tritonextrakten und im Pellet von Lymphozyten beobachtet (s. 4.2.2.2). Besonders im Tritonextrakt, das überwiegend cytoplasmatische und leicht extrahierbare nukleäre Proteine enthält, nahm die Ser5-Phosphorylierung stark zu. Eine Quelle für diese leicht extrahierbare Form der RNA-Polymerase II könnten instabile Transkriptionskomplexe sein. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass Transkriptionskomplexe sehr stark an DNA gebunden sind. Allerdings hat man beobachtet, dass frühe Elongationskomplexe instabil sind und zur abortiven Transkription neigen (Conaway et al., 2000). Möglicherweise dissoziieren diese instabilen Komplexe unter den hier gewählten Bedingungen. RNA-Polymerase II ist in diesen Komplexen wahrscheinlich bereits an Ser5 phosphoryliert. Die starke Zunahme der Ser5-Phosphorylierung in aktivierten T-Zellen ließe sich in diesem Fall damit

erklären, dass entsprechend der gesteigerten Transkriptionsaktivität viel mehr Transkriptionskomplexe im Stadium der frühen Elongation vorliegen.

Alternativ könnte es sich bei der Ser5-phosphorylierten RNA-Polymerase II um eine lösliche Form handeln. Lösliche, phosphorylierte Polymerase wurde nach osmotischer Stimulation in Fibroblasten nachgewiesen (Bonnet et al., 1999). Diese Form der RNA-Polymerase II, auch als Pol II_M bezeichnet, ist wahrscheinlich nicht an der Transkription beteiligt und wird von ERK-Kinasen phosphoryliert. Diese phosphorylieren die CTD möglicherweise auch nach Serumstimulierung und Hitzeschock (Dubois et al., 1994; Dubois et al., 1997). Eine Funktion der Pol II_M ist jedoch nicht bekannt. In der Elektrophorese unterscheidet sich die große Untereinheit der Pol II_M durch ein schnelleres Laufverhalten von II_O. Man könnte sich vorstellen, dass bei der T-Zellaktivierung – wie bei einem der genannten Stressstimuli – eine Hyperphosphorylierung löslicher RNA-Polymerase II erfolgt. ERK-Kinasen werden in T-Zellen durch PMA oder Stimulierung über den TCR aktiviert (Su et al., 1994). Über ihre Funktion in der T-Zellstimulierung ist allerdings wenig bekannt.

In Jurkat J6 Zellen wurden wider Erwarten keine größeren Mengen an löslicher Ser5-phosphorylierter RNA-Polymerase II beobachtet. Möglicherweise sind in Jurkat Zellen aufgrund der Transformation andere Voraussetzungen als in primären Zellen gegeben. Nach Stimulierung wird zwar der MAP-Kinasen-Signalweg aktiviert, aber andere Proteine als RNA-Polymerase II könnten als Hauptsubstrate dienen. Falls es sich bei der löslichen Ser5-phosphorylierten Polymerase um instabile Transkriptionskomplexe handelt, werden sie in Jurkat Zellen möglicherweise durch Faktoren stabilisiert, die in primären Zellen nicht exprimiert werden.

Im Vergleich zur Ser5-Phosphorylierung nimmt die Ser2-Phosphorylierung in allen Fraktionen zu. Die drei chromatinhaltigen Fraktionen (Ammoniumsulfat-Fraktion, Hochsalzextrakt, Pellet) zeigen wahrscheinlich RNA-Polymerase II aus elongierenden Transkriptionskomplexen. Der Anstieg der Ser2-Phosphorylierung nach Stimulierung spiegelt die größere Anzahl solcher Elongationskomplexe wider.

In der löslichen Fraktion könnte Ser2-Phosphorylierung dagegen ein Zeichen von Transkriptionsrepression sein. Es wurde berichtet, dass der Mediator-Komplex lösliche RNA-Polymerase II phosphorylieren und dadurch ihre Rekrutierung an Promotoren reprimieren kann (Hengartner et al., 1998). Von diesem Szenario könnte auch Ser5 betroffen sein, da der humane Mediator-Komplex wohl beide Serinreste phosphoryliert (Sun et al., 1998). Eine andere Quelle für lösliche, Ser2-phosphorylierte RNA-Polymerase II ist möglicherweise die Termination. Es ist bis heute nicht klar, ob RNA-Polymerase II nach der Termination in phosphorylierter oder unphosphorylierter Form vorliegt. Die wichtigste Phosphatase Fcp1 kann auch lösliches Enzym dephosphorylieren (Palancade et al., 2001). Daher ist es durchaus möglich, dass hyperphosphorylierte RNA-Polymerase II bei der Termination von der DNA dissoziiert und in löslicher Form recycelt wird. Die Zunahme der Ser2-Phosphorylierung in der löslichen Fraktion könnte also zum einen ein

Zeichen verstärkter Transkriptionsregulation durch den Mediator-Komplex sein. Andererseits könnte sie durch eine erhöhte Menge an RNA-Polymerase II aus der Transkriptionstermination bedingt sein.

Vor kurzer Zeit wurde eine neue, wichtige Funktion der Phosphorylierung von RNA-Polymerase II entdeckt. In *S. cerevisiae* werden die HMTasen Set1 bzw. Set2 durch Ser5- respektive Ser2-Phosphorylierung der CTD an den Transkriptionskomplex rekrutiert (Ng et al., 2003; Li et al., 2003; Krogan et al., 2003). Die Rekrutierung von Set1 an einen frühen elongierenden Transkriptionskomplex, der durch Ser5-Phosphorylierung gekennzeichnet ist, führt zur Trimethylierung von H3 K4. Man glaubt, dass diese Modifikation kürzlich transkribierte Gene markiert (Ng et al., 2003). Set2 hingegen wird im Verlauf der Elongation über Ser2-Phosphorylierung rekrutiert und scheint über die Methylierung von H3 K36 die Transkription positiv zu beeinflussen (Li et al., 2003; Krogan et al., 2003). In Säugerzellen wurde ein Zusammenhang zwischen CTD-Phosphorylierung und Histonmethylierung noch nicht nachgewiesen. Man könnte sich allerdings vorstellen, dass eine Zunahme der CTD-Phosphorylierung nach der T-Zellaktivierung die Rekrutierung von Histonmethyltransferasen erleichtert und damit eine höhere Transkriptionsaktivität ermöglicht.

5.1.2.3 CTD-Kinasen in T-Lymphozyten

In der vorliegenden Arbeit waren die Mengen verschiedener CTD-Kinaseuntereinheiten untersucht worden, um verantwortliche Kandidaten für die CTD-Hyperphosphorylierung nach Aktivierung zu finden. Eine Zunahme der P-TEFb-Aktivität, verbunden mit der Induktion von Cyclin T1 und auch CDK9, war bereits vor einiger Zeit beobachtet worden (Garriga et al., 1998; Herrmann et al., 1998). Über CDK8 ist hingegen in Lymphozyten nichts bekannt. Die Analyse von Gesamtzellextrakten mit einem CDK8-spezifischen Antikörper zeigte eine relativ breite Proteinbande. Dies weist darauf hin, dass CDK8 auch in modifizierten Zuständen vorliegen kann. Im Vergleich zu CDK7 und Cyclin T1 wird CDK8 später induziert. Erst nach 20 Stunden ist ein Anstieg seiner Konzentration zu erkennen.

Von CDK7 weiß man, dass seine Menge im Zellzyklus von proliferierenden Lymphozyten konstant ist (Bartkova et al., 1996). Herrmann und Kollegen beobachteten, dass bei der Stimulierung von Lymphozyten mit PMA die CDK7-Menge gleich bleibt (Herrmann et al., 1998). Die hier gezeigten Daten zeigen jedoch, dass CDK7 nach der Aktivierung mit einer Vielzahl von Stimuli, darunter auch PMA, induziert wird. Dies kann mit der Beobachtung von Bartkova et al. in Einklang gebracht werden, da dort stimulierte Lymphozyten entsprechend ihrer Zellzyklusphase analysiert wurden. Aus diesen und den vorliegenden Daten würde man schließen, dass die Zunahme der CDK7-Menge nicht von der Proliferation, sondern von der spezifischen Aktivierung der Lymphozyten abhängt. Eine mögliche Ursache für den Widerspruch zu den Daten von Herrmann et al. könnte sein,

dass dort Gesamtzellextrakte benutzt wurden. Demnach führt PMA-Stimulierung möglicherweise zu einer Anreicherung von CDK7 im Kern, nicht aber in Gesamtzellextrakten.

Aus den vorliegenden Daten kann man auf die Induktion verschiedener CTD-Kinasen nach T-Zellstimulierung schließen. Ein Anstieg der CTD-Kinase-Aktivität ist für die erhöhte Transkriptionsaktivität in stimulierten T-Zellen eine wichtige Voraussetzung. Nur wenn RNA-Polymerase II in einer höheren Anzahl von Transkriptionskomplexen phosphoryliert werden kann, werden auch all diese Komplexe prozessiv und effizient transkribieren. Mangelnde Kinaseaktivität sollte hingegen nach aktuellem Kenntnisstand zu einer Einschränkung der Transkriptionsaktivität führen.

5.2 PRMT1 in der T-Zellaktivierung

5.2.1 Spezifische Induktion der PRMT1-Expression nach T-Zellstimulierung

Erst in den letzten Jahren erkannte man die Bedeutung von HMTasen für die Regulation der Transkription und ihren Einfluss auf den Zustand des Chromatins (s. 1.1.5.1). Auf der Suche nach HMTase-Aktivitäten, die sich während der T-Zellstimulierung ändern, wurde in der vorliegenden Arbeit die Induktion einer H4-spezifischen Aktivität beobachtet. Die Identität dieser Aktivität konnte nicht zweifelsfrei bestimmt werden, aber es gibt zahlreiche Hinweise, dass es sich dabei um PRMT1 handelt. Zum einen methyliert die induzierte Aktivität H4 R3, wie der Peptid-Spezifitätstest zeigte. Bis jetzt ist nur PRMT1 als HMTase mit dieser Spezifität bekannt. Zum anderen konnte die Induktion von PRMT1 nach T-Zellstimulierung sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Beide, die PRMT1-Menge und die H4 R3-spezifische HMTase, wurden durch alle hier verwendeten Stimuli induziert, zeigten also gleiches Verhalten.

Zwei Beobachtungen führen zu der Annahme, dass die Zunahme von PRMT1 wichtig und spezifisch für T-Lymphozyten ist. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in primären Zellen (Monozyten, Hautfibroblasten) und in einer Fibroblastenlinie PRMT1 bzw. die H4-MTase-Aktivität trotz Stimulierung konstant bleiben. Entweder ist die PRMT1-Menge in diesen Zellen nicht limitierend oder aber PRMT1 spielt hier keine essentielle Rolle. Ein zweiter Hinweis auf die Bedeutung von PRMT1 bzw. der Methylierung von Proteinen im Allgemeinen kommt von verschiedenen Veröffentlichungen. Man hat beobachtet, dass Methyltransferase-Inhibitoren wie 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin oder MDL28,842 ((Z)-5'-Fluoro-4',5'-Didehydro-5'-Deoxyadenosin) die Aktivierung von Lymphozyten hemmen (Vandenbark et al., 1980; Wolos et al., 1993). Allerdings ist nicht klar, ob dieser Effekt durch die indirekte Inhibition von Methyltransferasen oder durch den Eingriff in die Nukleotidsynthese verursacht wird.

Leider steht aktuell noch kein spezifischer Inhibitor für PRMT1 oder eine andere Methyltransferase zur Verfügung, der klarere Ergebnisse ermöglichen würde.

Die spezifische Induktion von PRMT1 in T-Zellen warf die Frage auf, wie die Expression von PRMT1 reguliert sein könnte. Eine *in silico* Analyse des PRMT1-Promotors zeigte mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auf. Die Sequenzen für CREB, NF- κ B, NF-Y und Sp1 waren dabei am ähnlichsten zu den Konsensussequenzen. CREB und NF- κ B sind allgemein weit verbreitete Transkriptionsfaktoren, spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der T-Zellaktivierung (Kuo und Leiden, 1999). Der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor NF-Y, der an der Regulation zahlreicher Gene beteiligt ist, wurde als wichtiger Aktivator bei der Expression des T_H2-spezifischen IL4-Gens identifiziert (Szabo et al., 1993). Sp1, ebenfalls ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, spielt bei der Induktion einiger Gene nach T-Zellaktivierung eine Rolle, wie z. B. GM-CSF oder LIGHT (Cakouros et al., 2001; Castellano et al., 2002). Diese Transkriptionsfaktoren, die alle an der Regulation T-zellspezifischer Gene mitwirken, wären also geeignete Faktoren, um die PRMT1-Expression in T-Zellen zu regulieren.

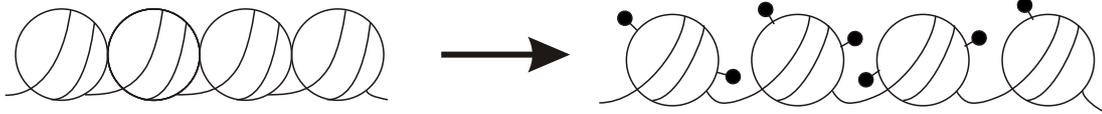
Daneben wurde auch eine etwas weniger konservierte, potentielle Ets-1-Bindungsstelle gefunden. Ets-1 wird in T-, B- und NK-Zellen exprimiert (Kuo und Leiden, 1999). Zur Expression von Ets-1 nach der T-Zellaktivierung gibt es unterschiedliche Veröffentlichungen. Bhat et al. beobachteten, dass sowohl die Protein- als auch die mRNA-Menge von Ets-1 nach der T-Zellstimulierung abnahmen und nach 3 Tagen wieder auf die ursprünglichen Werte anstiegen (Bhat et al., 1990). In Lymphozyten aus Hühnern sahen Koskela und Lassila dagegen nach 3 Tagen Aktivierung eine Zunahme der Ets-1-Expression (Koskela und Lassila, 2003). Obwohl die Rolle von Ets-1 im Detail noch unklar ist, ist seine Bedeutung als T-zellspezifischer Transkriptionsfaktor unumstritten. Jedoch scheint es für die Regulation von PRMT1 weniger in Frage zu kommen, da seine Expression erst spät ansteigt.

5.2.2 Mögliche Funktionen von PRMT1 während der T-Zellaktivierung

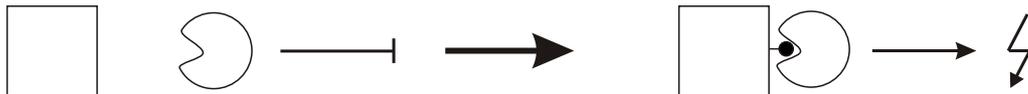
In der vorliegenden Arbeit konnte die Funktion von PRMT1 nicht identifiziert werden. Allerdings geben einige Ergebnisse Anlass zu Spekulationen. Deshalb soll im Folgenden auf drei mögliche Funktionen von PRMT1 eingegangen werden (s. Abb. 5.1).

Modell A: Die Methylierung von H4 R3 erhöht die Transkriptionsaktivität in T-Zellen. Eine nahe liegende Aufgabe für PRMT1 in T-Zellen schien die Methylierung von H4 R3 und eine damit verbundene Aktivierung der Transkription zu sein. Wang und Kollegen zeigten, dass PRMT1 bei der Transkriptionsaktivierung durch nukleäre Hormonrezeptoren eine solche Rolle

A) Methylierung von Histon H4 R3 erleichtert die Transkription.



B) Signalwege der T-Zellaktivierung werden durch Argininmethylierung reguliert.



C) Die Prozessierung und der Transport von mRNA werden durch die Methylierung von hnRNPs verbessert.

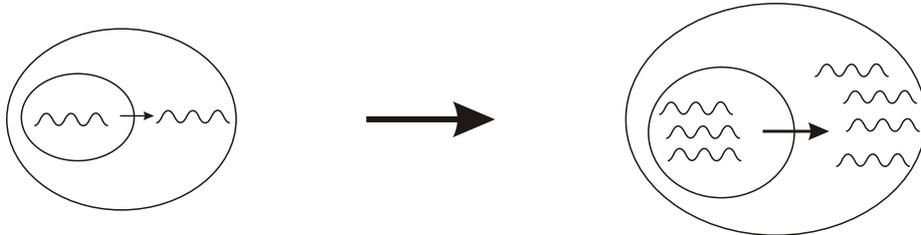


Abbildung 5.1: Mögliche Funktionen von PRMT1 bei der T-Zellaktivierung.

übernehmen kann (Wang et al., 2001b). Hier wirkt PRMT1 als Coaktivator und erleichtert durch H4 R3-Methylierung die nachfolgende Acetylierung. In der vorliegenden Arbeit ergab jedoch eine Untersuchung von Gesamtzellextrakten, dass nach der Stimulierung die Gesamtmenge der H4 R3-Methylierung in T-Zellen gleich bleibt. Man könnte sich allerdings vorstellen, dass sich diese Modifikation auf der Ebene einzelner Gene ändert. Möglicherweise ist die Gesamtmenge an methyliertem H4 R3 so groß, dass Veränderungen auf Ebene regulierender Gensequenzen nicht sichtbar sind. Ein geeignetes, weiterführendes Experiment wäre hier die Analyse der H4 R3-Methylierung einzelner Loci mittels Chromatinimmunpräzipitation. Dies ließ sich im Rahmen dieser Arbeit leider nicht verwirklichen, da kein Antikörper verfügbar war, der sich für diese Methode eignete.

Modell B: Arginin-Methylierung spielt eine wichtige Rolle in Signalwegen der T-Zellstimulierung. Für PRMT1 wurden neben H4 R3 eine Reihe weiterer *in vitro* Substrate entdeckt und beschrieben, unter anderem hnRNP U, ILF3 und RNA-Helikase A (Lee und Bedford, 2002). Die Methylierung von Argininresten scheint demnach nicht nur für Histone, sondern auch für verschiedene

andere Proteine mit unterschiedlichen Aufgaben wichtig. Eine zentrale Funktion von PRMT1 wurde im Interferon α/β -Signalweg gefunden (Mowen et al., 2001). Hier methyliert PRMT1 den Transkriptionsfaktor STAT1 und verhindert dadurch dessen Bindung an den Inhibitor PIAS1. Der methylierbare Argininrest von STAT1 ist auch in anderen STAT-Proteinen hochkonserviert (Mowen et al., 2001). Man könnte also davon ausgehen, dass eine ähnliche Regulation in anderen STAT-Signalwegen auftritt. In T-Zellen spielt STAT5 eine wichtige Rolle. Es wird vom IL2-Signalweg aktiviert und reguliert unter anderem die Expression von CD25 (Lin und Leonard, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden im Western Blot Hinweise auf eine Argininmethylierung von STAT5 gesucht, jedoch ergaben sich keine Hinweise auf eine derartige Modifikation. Betrachtet man die Vielzahl der Signalwege, die bei der T-Zellaktivierung mitwirken, ist es aber durchaus möglich, dass PRMT1 eine regulatorische Funktion in einem dieser Wege ausübt. Zum Auffinden entsprechender Signalwege würde man versuchen, an Arginin methylierte Proteine mit spezifischen Antikörpern zu präzipitieren und diese im Massenspektrometer zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Experiment jedoch nicht durchgeführt.

Modell C: Verbesserte Prozessierung und Transport der mRNA sind wichtig für die T-Zellaktivierung. Daneben wäre eine Funktion von PRMT1 bei der Prozessierung und beim Transport von mRNA gut vorstellbar. Für diese Prozesse ist die Familie der hnRNPs, die oft an Arginin methyliert sind, von zentraler Bedeutung. Man entdeckte, dass 65% der nukleären Proteine, die eine asymmetrische Arginin-Dimethylierung aufweisen, hnRNPs sind und dass etwa 12% aller Argininreste in diesen Proteinen methyliert sind (Boffa et al., 1977). In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass die hnRNPs Npl3p, Hrb1p und Nab2p an Arginin methyliert werden können und dass diese Methylierung den Kernexport ermöglicht oder erleichtert (Shen et al., 1998; Green et al., 2002). Auch in Säugerzellen fand man, dass der Transport eines hnRNPs, hnRNP A2, über Arginin-Methylierung reguliert wird. Hier erlaubt die Modifikation jedoch den Kernimport (Nichols et al., 2000). Bis jetzt weiß man nicht, was die Argininmethylierung auf molekularer Ebene bewirkt. Vorstellbar wäre, dass diese Modifikation die Interaktion mit anderen Proteinen oder mit RNA beeinflusst. Vor einigen Jahren gab es bereits Hinweise, dass Argininmethylierung die Bindung von hnRNP A1 an RNA beeinträchtigt (Rajpurohit et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit gaben Western Blots Hinweise darauf, dass die Menge an hnRNP A1, einem der ersten nachgewiesenen Substrate von PRMT1 (Lin et al., 1996), bei der T-Zellstimulierung zunimmt. Zudem scheint das Protein zumindest zum Teil in Arginin-methylierter Form vorzuliegen. Dies veranlasst zu der Spekulation, dass nach Aktivierung von T-Zellen mehr hnRNP A1 für die effektive Prozessierung von hnRNA und den effektiven Transport von mRNA aus dem Kern benötigt wird. Die Methylierungsaktivität müsste in diesem Fall

ansteigen, um die größere hnRNP A1-Menge in dem benötigten methylierten Zustand zu halten. Dies könnte durch die Zunahme von PRMT1 erreicht werden.

Eine weitere Beobachtung der vorliegenden Arbeit ist, dass Proteine, die asymmetrisch an Arginin dimethyliert sind, zu einem großen Teil im Cytoplasma zu finden sind. Dies ist erstaunlich, da PRMT1 überwiegend im Kern lokalisiert ist (Tang et al., 1998). Dieser Widerspruch könnte darauf hinweisen, dass im Cytoplasma eine zusätzliche Methyltransferaseaktivität zu finden ist. PRMT3, ein weiteres Mitglied der PRMT-Familie, ist z. B. ein cytoplasmatisches Protein. Allerdings scheint seine Aktivität viel geringer als die von PRMT1 zu sein (Tang et al., 1998). Möglicherweise existieren weitere, unbekannte Arginin-Methyltransferasen im Cytoplasma. Eine andere Ursache könnte der Transport methylierter Proteine vom Kern ins Cytoplasma sein. Auf den ersten Blick scheinen hnRNPs keine Proteine zu sein, die cytoplasmatisch sichtbar sind. Man findet hnRNPs überwiegend im Kern (Dreyfuss et al., 1993), wo sie zu einem großen Teil schon methyliert sind (Boffa et al., 1977). Möglicherweise binden sie aber im Kern so an RNA oder an andere Proteine, dass der in der vorliegenden Arbeit verwendete monoklonale Antikörper die methylierten Argininreste nicht erkennt. Nach dem Transport ins Cytoplasma würde die Bindung gelöst. Der verwendete Antikörper könnte nun die an Arginin methylierten hnRNPs erkennen. Dieses Modell könnte genauso für andere exportierte Proteine gelten, wobei hnRNPs aufgrund ihrer häufigen Argininmethylierung wahrscheinliche Kandidaten sind. Gegenwärtig ist zu wenig über die Funktion von hnRNPs bekannt, um dieses Modell zu stützen.

5.3 Histonmodifikationen und Chromatinumordnung während der T-Zellstimulierung

5.3.1 Lokale Änderungen der Histonmodifikationen während der T-Zellaktivierung

Die Analyse von Histonmodifikationen während der T-Zellaktivierung führte in der vorliegenden Arbeit zu einem überraschenden Ergebnis. Sowohl die Acetylierung als auch die Methylierung der Gesamthistone änderten sich kaum. Ausgehend von Veröffentlichungen hätte man erwartet, dass die Histonacetylierung nach Aktivierung zunimmt und dass sich wohl auch die Methylierung einiger spezifischer Histonreste ändert (s. Abb. 5.2B). Schon in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts beobachteten Pogo und Kollegen, dass die Histonacetylierungsaktivität in Lymphozyten nach Stimulierung zunimmt, d. h. dass mehr markiertes Acetat in Histone eingebaut wird (Pogo et al., 1966). Untersuchungen einer IL-2-abhängigen murinen T-Zelllinie ergaben, dass sich der Acetylierungsgrad der Lysine von H4 in Abhängigkeit vom Zellzyklus ändert (Taplick et al., 1998). In Fibroblasten, die durch Serumentzug in einen ruhenden Zustand gebracht und

dann wieder aktiviert werden können, nahm die H4-Acetylierung nach verschiedenen Stimuli, wie FCS oder UV-Licht, stark zu (Alberts et al., 1998). Über die Methylierung von Histonen ist weit weniger bekannt. Man beobachtete allerdings in HeLa Zellen, dass sich die Methylierung von H4 R3 und von H4 K20 im Zellzyklus verändert (Rice et al., 2002).

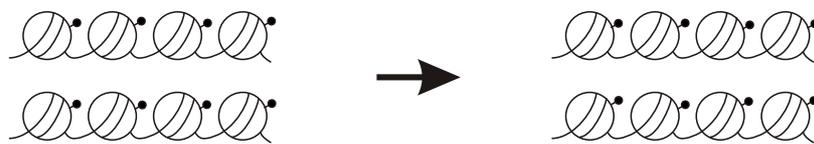
Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Modifikationen der Gesamthistone im Wesentlichen konstant blieben, ist es doch unwahrscheinlich, dass sich Histonmodifikationen nach T-Zellstimulierung grundsätzlich nicht verändern (vgl. Abb. 5.2A). Vielmehr wurde beobachtet, dass die Expression von CBP, aber auch von den Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 induziert wurde. Man kann wahrscheinlich davon ausgehen, dass nach der T-Zellstimulierung sowohl die Mengen von HATs als auch von HDACs zunehmen. Dadurch würde das Gleichgewicht der beiden Enzymarten und damit der Gesamtacetylierung bestehen bleiben. Lokal, auf der Ebene einzelner Gene, könnten sich dabei die Acetylierungen durchaus ändern (s. Abb. 5.2C). Bei Markierungsanalysen, wie sie Pogo und Kollegen durchführten (Pogo et al., 1966), würde man in diesem Fall eine Zunahme der Acetylierung beobachten. Frisch eingebautes Acetat wäre markiert und würde detektiert, während das gerade abgebaute Acetat noch keine Markierung aufwies.

Mit den Analysen von Alberts und Kollegen ist das vorliegende Ergebnis schwerer in Einklang zu bringen (Alberts et al., 1998), jedoch sollte man die unterschiedlichen Zellsysteme beachten. Alberts et al. verwendeten eine Fibroblastenzelllinie, die durch Serumentzug in einen ruhenden Zustand versetzt worden war. Die primären T-Zellen, die in der vorliegenden Arbeit benutzt wurden, waren von Beginn an in einem ruhenden Zustand und wurden mit 10% Serum kultiviert. Die Aktivierung erfolgte hier also in Gegenwart der Wachstumsfaktoren, die im Serum enthalten sind. Dies entspricht in etwa der physiologischen Situation. Die vorhandenen Wachstumsfaktoren könnten das Niveau der Gesamtacetylierung bereits im ruhenden Zustand beeinflussen. Als weiterführendes Experiment könnte man primäre T-Zellen mit wenig (1%) oder keinem Serum kultivieren. Auch Taplick und Kollegen führten ihre Analysen in einem abweichenden Zellsystem durch (Taplick et al., 1998). Im Gegensatz zu den primären T-Zellen der vorliegenden Arbeit benutzten sie eine T-Zelllinie, die abhängig vom Wachstumsfaktor IL-2 proliferiert. Möglicherweise bewirken alleine die unterschiedlichen Aktivierungswege – zum einen eine Stimulierung mit PHA und PMA und zum anderen mit IL-2 – das unterschiedliche Ergebnis. Darüberhinaus verwendeten Taplick und Kollegen Antikörper, die spezifisch bestimmte Reste erkannten. Das Modifikationsmuster, das sie dabei beobachteten, könnte unter der hier vorliegenden Analyse der H4-Gesamtacetylierung verborgen sein. Schließlich werden polyklonale primäre T-Zellen, die in der vorliegenden Arbeit benutzt wurden, wahrscheinlich ungleichmäßiger aktiviert als eine monoklonale T-Zelllinie, so dass an Zellzyklusphasen gekoppelte Veränderungen „verwischen“. Hier liegt auch der Unterschied zur Analyse in HeLa Zellen von Rice und Kollegen, bei der Methy-

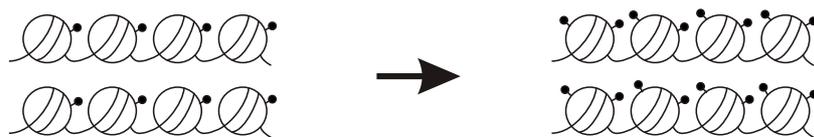
lierungsänderungen in Abhängigkeit vom Zellzyklus beobachtet wurden (Rice et al., 2002).

Aufbauend auf den vorgestellten Ergebnissen kann man das Modell aufstellen, dass sich das Niveau der Histonmodifikationen global nicht ändert, aber dass sehr wohl lokale Veränderungen auftreten (s. Abb. 5.2C). Dies wird durch Beobachtungen auf Genebene gestützt. Auf verschiedenen aktivierten Genen wurde nach T-Zellstimulierung ein Anstieg der H3 K4-Trimethylierung beobachtet, während Western Blots zeigten, dass sich das Niveau dieser Modifikation global nicht verändert. Bedenkt man, dass etwa 75% des gesamten menschlichen Genoms aus intergenischer DNA bestehen (Venter et al., 2001), kann man sich eine Erweiterung dieses Modells vorstellen. Möglicherweise verursacht diese nicht-transkribierte DNA ein Grundniveau an Histonmodifikationen. Änderungen von Histonmodifikationen, die der Transkriptionsaktivierung, -reprimierung oder der Vorbereitung dieser Ereignisse dienen, würden nur einen Bruchteil des Genoms, nämlich die Gene und ihre regulierenden Sequenzen, treffen. Mit dem Hintergrund der Histonmodifikationen der nichtcodierenden DNA würden die Änderungen in transkribierten Bereichen wenig ins Gewicht fallen. Somit bliebe das globale Niveau an Histonmodifikationen gleich. Nur bestimmte Signalwege, wie z. B. die

A) Keine Veränderung der Histonmodifikationen



B) Veränderung der Histonmodifikationen



C) Globales Gleichgewicht und Veränderung der Histonmodifikationen auf Ebene der Gene

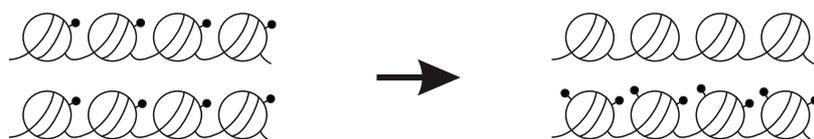


Abbildung 5.2: **Histonmodifikationen während der T-Zellaktivierung.**

Aktivierung ruhender Fibroblasten mit Serum, würden zu einer globalen Änderung des Modifikationsniveaus führen.

Trotz allem scheint die lokale Änderung von Histonmodifikationen in T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen. So werden in CD4⁺-T-Zellen die Loci von IL-4 und INF- γ nach Stimulierung an H3 und H4 acetyliert (Avni et al., 2002; Fields et al., 2002). Entsprechend den in der Umgebung vorhandenen Cytokinen differenzieren die CD4⁺-T-Zellen zu T_H1- oder T_H2-Zellen. In diesen Zelllinien bleibt dann entweder der IL-4- (T_H2) oder der INF- γ -Locus (T_H1) hyperacetyliert, selbst wenn die Gene nicht aktiv transkribiert werden. Histonacetylierung korreliert hier also mit Transkriptionskompetenz (s. a. 1.2.3). In der vorliegenden Arbeit wurde die Methylierung von H3 K4 als wichtige, lokale Histonmodifikation in T-Lymphozyten identifiziert. Nach der Aktivierung primärer T-Zellen nahm die Trimethylierung dieser Aminosäure an den meisten der getesteten Gene zu, was aber in der Analyse der Gesamthistonpopulation nicht ins Gewicht fällt (s. a. 5.3.3).

5.3.2 CBP als genspezifische Histonacetyltransferase oder als allgemeiner Cofaktor mit der Aufgabe eines Brückenmoleküls

Die relativ gleich bleibenden Niveaus der Histonmodifikationen, insbesondere der Acetylierung, waren auch unter dem Aspekt überraschend, dass die Menge der Histonacetyltransferase CBP nach T-Zellstimulierung stark zunahm. Neben einem Anstieg der CBP-Menge wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass dieser Cofaktor nach T-Zellaktivierung in offenen Chromatinregionen des Zellkerns konzentriert war. Auf der Ebene einzelner Gene konnte allerdings keine Rekrutierung von CBP nachgewiesen werden.

Für den fehlenden Nachweis von CBP auf der Ebene einzelner Gene könnten verschiedene technische Ursachen verantwortlich sein. Zum einen waren die benutzten Bedingungen möglicherweise nicht geeignet. Dagegen spricht jedoch, dass unter denselben Bedingungen CBP in Jurkat J6 Zellen detektiert werden konnte (Jünemann, in Vorbereitung). Alternativ könnte das gewählte Zeitfenster falsch gewählt worden sein. Man kann sich gut vorstellen, dass CBP nur während eines bestimmten Zeitraums an ein Gen gebunden ist, z. B. während der PIC-Ausbildung. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit sehr unterschiedliche Gene benutzt – konstitutiv aktive, zellzyklusregulierte und durch T-Zellstimulierung induzierte. Je nach Regulation befinden sich die Gene also in verschiedenen Transkriptionsphasen. Wenn CBP nun als Histonacetyltransferase eine allgemeine Rolle in T-Zellen spielt, würde man erwarten, dass CBP zumindest an einen Teil der untersuchten Gene rekrutiert ist. Eine technische Ursache für die fehlende CBP-Detektion ist demnach zwar nicht auszuschließen, aber nicht wahrscheinlich.

Daneben könnte CBP bei der T-Zellaktivierung die Funktion eines spezifischen anstelle eines allgemeinen Cofaktors ausüben. Für diesen Fall wurden in der vorliegenden Arbeit möglicherweise Gene ausgewählt, auf denen CBP als spezifische Histonacetyltransferase keine Rolle spielt.

Als zusätzliche Variante kommt in Frage, dass eine andere Funktion von CBP als seine HAT-Aktivität bei der T-Zellaktivierung wichtig ist. Es ist bekannt, dass CBP als Brückenmolekül zwischen Transkriptionsaktivatoren und der allgemeinen Transkriptionsmaschine oder auch als Interaktionsplattform zum Aufbau von Multiproteinkomplexen dienen kann (Chan und La Thangue, 2001). In einer solchen Funktion könnte man erwarten, dass CBP nicht direkt an Nucleosomen gebunden ist. Bei einer ChIP wäre möglicherweise der Abstand zur DNA zu groß, um CBP mit der DNA zu vernetzen. Somit könnte CBP nicht auf den spezifischen Sequenzen nachgewiesen werden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann man annehmen, dass CBP in T-Lymphozyten wohl die Rolle einer genspezifischen Histonacetyltransferase oder eines allgemeinen Cofaktors in Form eines Brückenmoleküls ausübt. Möglicherweise treten auch beide Funktionen nebeneinander auf. Es scheint aber sicher, dass CBP in der T-Zellstimulierung eine wichtige Aufgabe übernimmt. Dies wird auch durch Veröffentlichungen zur Rolle von CBP in Signalwegen der T-Zellaktivierung deutlich (García-Rodríguez und Rao, 1998; Avots et al., 1999).

5.3.3 H3 K4-Methylierung in der T-Zellaktivierung

Im vergangenen Jahr wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass der Methylierungsgrad von Histonlysinresten eine Rolle in der Transkription spielt. In *S. cerevisiae* beobachtete man, dass die Trimethylierung von H3 K4 nach der Transkriptionsaktivierung einiger Gene zunahm, während die Dimethylierung sich kaum oder nicht änderte (Santos-Rosa et al., 2002; Ng et al., 2003). Santos-Rosa und Kollegen interpretieren die Trimethylierung als Zeichen von Transkriptionsaktivität und die Dimethylierung als Zeichen von Transkriptionskompetenz. Ng und Kollegen sehen dagegen die H3 K4-Trimethylierung als „Erinnerungsmarke“ der Transkription. Ihrer Meinung nach wird eine vor kurzem beendete Transkription durch H3 K4-Trimethylierung markiert. Diese Markierung wird für einige Zeit beibehalten, jedoch nicht über mehrere Generationen vererbt. Mittlerweile wurde der Methylierungsgrad von H3 K4 auch in einer humanen Glioblastomalinie untersucht. Martens und Kollegen beobachteten, dass nach Aktivierung mit PMA der Promotor des Collagenasegens zunächst an H3 K4 di- und danach trimethyliert wird (Martens et al., 2003). Die Dimethylierung fällt mit der Rekrutierung des Präinitiationskomplexes zusammen und ist die erste Histonmodifikation, die in Erscheinung tritt. Dimethylierte Reste werden dann in Laufe der Initiation ein weiteres Mal methyliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals die H3 K4-Trimethylierung in primären humanen Zellen untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Mar-

tens und Kollegen war die H3 K4-Dimethylierung an den meisten der untersuchten Gene konstant. Lediglich am 3'-Ende des CD25- und des IL-2-Gens sowie am *downstream* Enhancer des TCR β -Locus nahm sie zu. Die H3 K4-Trimethylierung hingegen erhöhte sich an den getesteten Genen, außer an EF1 α und H2B. Die vorliegenden Ergebnisse entsprechen somit eher denen aus *S. cerevisiae*. Primäre humane Zellen lassen sich möglicherweise besser mit Hefezellen als mit einer humanen Zelllinie vergleichen. Eine Zelllinie könnte durch Transformation schon zu stark verändert sein, um den physiologischen Zustand erkennen zu lassen.

Auffällig im Vergleich zu den übrigen Ergebnissen war die Zunahme der H3 K4-Dimethylierung an den 3'-Enden des IL-2- und des CD25-Gens sowie am Enhancer des TCR β -Locus. Eine mögliche Erklärung für den Anstieg wäre, dass vielleicht sowohl die Di- als auch die Trimethylierung an den betreffenden Genen deutlich ansteigen. Während nun am 5'-Ende die neu entstehenden Dimethyl-Lysine quantitativ weiter methyliert würden, ist möglicherweise die Trimethylierungsaktivität am 3'-Ende der Gene oder auch am Enhancer schwächer. Dadurch entstanden hier im Wesentlichen Dimethyl-Lysine. Als Folge wäre eine Zunahme der H3 K4-Dimethylierung nur am 3'-Ende sichtbar, während am 5'-Ende ein Anstieg der Trimethylierung zu beobachten wäre.

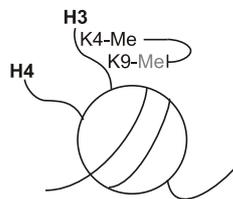
Wie bei der Dimethylierung gab es auch bei der H3 K4-Trimethylierung Ausnahmen, nämlich das EF1 α - und das H2B-Gen. Bei beiden Genen blieb die Methylierung konstant, während RNA-Polymerase II rekrutiert wurde. Von Histongen weiß man, dass ihre Expression in der S-Phase des Zellzyklus zunimmt (Übersicht in Osley, 1991; Marzluff und Duronio, 2002). Die H3 K4-Trimethylierung des H2B-Gens in nicht stimulierten T-Zellen resultiert möglicherweise daher, dass das Gen hier bereits exprimiert wird. Zudem beruht die höhere Expression der Histone in der S-Phase zum Teil auch auf der effizienteren Prozessierung der prä-mRNA. Bei EF1 α dagegen beobachtete man während der Differenzierung naiver T-Zellen in T_H1- oder T_H2-Zellen konstante RNA-Mengen (Hamalainen et al., 2001). Die Rekrutierung von RNA-Polymerase II – und damit die Transkriptionsaktivierung – in der vorliegenden Arbeit beruht möglicherweise auf der unterschiedlichen Aktivierung. Hamalainen und Kollegen stimulierten naive T-Zellen mit CD32-B7-exprimierenden Fibroblasten und PHA in Gegenwart von Cytokinen. Die relativ konstante H3 K4-Trimethylierung des EF1 α -Gens mag hingegen wie auch bei H2B dadurch verursacht sein, dass es bereits in ruhenden Zellen exprimiert wird.

Man weiß, dass die H3 K4-Trimethylierung in *S. cerevisiae* von Set1 katalysiert wird (Santos-Rosa et al., 2002). Dagegen ist nicht sicher, welches Enzym diese Modifikation in höheren eukaryontischen Zellen erzeugt. Gute Kandidaten sind Set7/9 und MLL. Allerdings konnte bis jetzt für beide Enzyme noch keine H3 K4-Trimethyltransferaseaktivität gezeigt werden (Wang et al., 2001a; Nishioka et al., 2002a; Milne et al., 2002). Martens und Kollegen beobachteten eine Korrelation zwischen der H3 K4-Di- bzw. Trimethylierung und der Anwesenheit von Set9 auf dem Promotor des Collagenasegens (Martens et al., 2003). Diese Beobach-

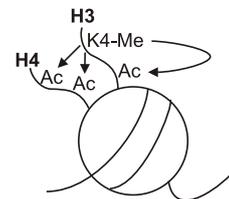
tung gibt zumindest einen Hinweis darauf, dass Set9 diese Funktion in höheren Eukaryontenzellen erfüllen könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei der T-Zellstimulierung die H3 K4-Trimethylierung aktivierter Gene ansteigt. H3 K4-Methylierung und insbesondere H3 K4-Trimethylierung sind ein Merkmal aktiv transkribierter Gene (Strahl et al., 1999; Santos-Rosa et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass H3 K4-Trimethylierung die Transkription erleichtert (Nishioka et al., 2002a), wofür verschiedene Mechanismen denkbar sind (s. Abb. 5.3). Die Methylierung von H3 K4 kann andere aktivierende Histonmodifikationen, wie z. B. die Acetylierung von H3 und H4 (Wang et al., 2001a), erleichtern. Daneben kann sie Histonmodifikationen unterbinden, die eine Voraussetzung für die Heterochromatinbildung sind, wie z. B. die Methylierung von H3 K9 (Wang et al., 2001a; Nishioka et al., 2002a). Außerdem verhindert die H3 K4-Methylierung die Bindung von reprimierenden Faktoren wie dem NuRD-Komplex (Nishioka et al., 2002a; Zegermann et al., 2002). Möglicherweise erleichtert sie andererseits auch die Rekrutierung aktivierender Faktoren. Die Methylierung von H3 K4 ist demnach ein wichtiges Instrument zur Regulierung der Transkriptionsaktivität, das auch in T-Zellen zum Einsatz kommt.

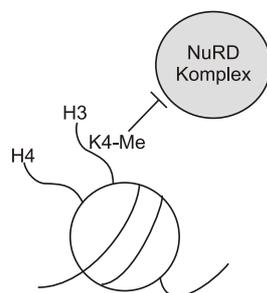
A) Verhindern weiterer Histonmodifikationen



B) Erleichtern weiterer Histonmodifikationen



C) Inhibieren der Bindung von Faktoren



D) Rekrutieren von Faktoren

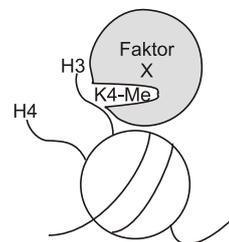


Abbildung 5.3: Mögliche Funktionen der H3 K4-Methylierung.

5.3.4 Die Änderung der Chromatinstruktur in der T-Zellaktivierung

Schon seit vielen Jahren ist bekannt, dass die Stimulierung ruhender T-Lymphozyten mit Änderungen der Chromatinstruktur sowohl auf der Ebene des Zellkerns (Tokuyasu et al., 1968; Kaczmarek et al., 1987) als auch auf der Ebene von Genen (Siebenlist et al., 1986; Rao et al., 2001) einhergeht (s. a. 1.2.3). Entgegen der Lehrbuchmeinung (Janeway und Travers, 1996) und früherer Veröffentlichungen (Tokuyasu et al., 1968; Kaczmarek et al., 1987) wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass das Chromatin nicht aktivierter Lymphozyten nicht in einem stark kondensierten Zustand vorliegt. Vielmehr war hier ein intermediärer Zustand zwischen kondensiertem und dekondensiertem Chromatin zu erkennen. Man kann diese intermediäre Chromatinstruktur als eine Art „Wartestruktur“ interpretieren. Das nicht zu stark kondensierte Chromatin erlaubt wahrscheinlich unmittelbar nach Aktivierung die schnelle Umverteilung von Transkriptionsfaktoren und -cofaktoren und damit auch die schnelle und effiziente Steigerung der Transkriptionsaktivität. Nach Stimulierung bilden sich sehr dichte und sehr offene Chromatinregionen aus. Diese Beobachtung auf der Ebene des Zellkerns entspricht den Vorgängen auf Ebene der Expression einzelner Gene. So haben Teague und Kollegen festgestellt, dass es nach der Stimulierung von T-Lymphozyten sowohl zur Induktion als auch zur Repression von Genen kommt (Teague et al., 1999). Diese Regulation auf der Ebene einzelner Gene könnte mit der Ausbildung dichter und offener Regionen korrelieren.

Nicht nur an der DNA, sondern auch an modifizierten Histonen zeigt sich die Änderung der Chromatinstruktur nach T-Zellaktivierung. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die H3 K4-Di- und vor allem die Trimethylierung nach Stimulierung in offenen Chromatinregionen und in angrenzenden Bereichen konzentriert sind. Die H3 K9-Dimethylierung dagegen – im Allgemeinen ein Kennzeichen von Heterochromatin – blieb nach Aktivierung im ganzen Kern lokalisiert. Die Verteilung des Heterochromatins könnte sich zwar nach T-Zellstimulierung ändern, wurde aber mit dem verwendeten Antikörper vermutlich nicht detektiert. Maison und Kollegen beobachteten, dass sie perizentrisches Heterochromatin nur mit Antikörpern gegen verzweigte, methylierte H3-Schwänze nachweisen konnten (Maison et al., 2002). Antikörper gegen lineare Peptide, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, erlaubten diesen Nachweis hingegen nicht. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bleibt die Lokalisierung der allgemeinen H3 K9-Methylierung, die nicht mit Heterochromatin korreliert, nach Aktivierung unverändert.

Die Experimente, mit denen die Lokalisierung der H3 K4-Methylierung analysiert wurden, ließen die Frage offen, in welcher Reihenfolge die Dekondensierung des Chromatins und die Methylierung von H3 K4 ablaufen. Einerseits könnte die Methylierung von H3 K4 der Rekrutierung von *chromatin remodeling* Komplexen dienen, die zur Dekondensierung des Chromatins führen. Möglicherweise

gibt es Domänen, die spezifisch methyliertes H3 K4 erkennen, so wie die Bromodomäne acetylierte Lysine (Dhalluin et al., 1999) bindet und die Chromodomäne methyliertes H3 K9 (Bannister et al., 2001). Andererseits könnte die Öffnung des Chromatins eine Voraussetzung für die Rekrutierung von H3 K4-spezifischen HMTasen sein. In diesem Fall mag die H3 K4-Methylierung notwendig sein, um die offene Chromatinstruktur aufrechtzuerhalten.

Aufbauend auf älteren Veröffentlichungen gibt die vorliegende Arbeit Hinweise darauf, dass die Umordnung der Chromatinstruktur ein wichtiger Prozess in der T-Zellaktivierung ist. Der Schritt zu einer Chromatinstruktur mit offenen und kondensierten Regionen wird auch bei der Betrachtung von Jurkat Zellen, einer transformierten T-Zelllinie, deutlich. In diesen transkriptionell sehr aktiven Zellen sind offene und kondensierte Bereiche noch stärker ausgeprägt als in aktivierten primären Lymphozyten. Daneben unterstützen die Ergebnisse die Bedeutung der H3 K4-Trimethylierung sowie der Cofaktoren Brg1 und CBP für die T-Zellstimulierung. Ihre Lokalisierung in decondensierten Regionen des Zellkerns weist auf ihre Funktion bei der Transkriptionsaktivierung hin.

5.4 Der SWI/SNF-Komplex in der T-Zellstimulierung

5.4.1 Mögliche Aufgaben von SWI/SNF-Komplexen bei der T-Zellaktivierung

Erst vor kurzem wurde eine essentielle Funktion von SWI/SNF-Komplexen bei der Entwicklung von T-Zellen aufgedeckt. SWI/SNF-Komplexe aus Säugern, auch BAF-Komplexe (Brg/Brm assoziierte Faktoren) genannt, regulieren die Expression der Corezeptoren CD4 und CD8 in Thymozyten (Chi et al., 2002). Die thymozytenspezifische Deletion des Brg1-Gens, einer der beiden alternativen ATPase-Untereinheiten in BAF-Komplexen aus Säugern, führte zur Blockierung einzelner Entwicklungsstufen in doppelnegativen, d. h. CD4⁻ CD8⁻, T-Zellen (Chi et al., 2003). Interessanterweise erfüllt Brm, die zweite der beiden alternativen ATPase-Untereinheiten, eine andere Funktion als Brg1. In Brm^{-/-} Mäusen scheint nämlich die Entwicklung der Thymozyten nicht beeinträchtigt (Reyes et al., 1998; Chi et al., 2002).

Auch in reifen, ruhenden T-Lymphozyten wurden Hinweise auf eine wichtige Rolle von Brg1 gefunden. Zhao und Kollegen beobachteten, dass nach T-Zellstimulierung Brg1 bzw. BAF-Komplexe an die nukleäre Matrix rekrutiert werden (Zhao et al., 1998). Die Rekrutierung erfordert das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat und wird über die Untereinheiten Brg1, BAF57 und β -Actin ermöglicht (Zhao et al., 1998; Rando et al., 2002). Reife, periphere T-Zellen, denen Brg1 fehlt, zeigen eine stark eingeschränkte Proliferation nach Aktivierung

mit verschiedenen Stimuli (Gebuhr et al., 2003). Zusammen mit diesen Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Annahme, dass Brg1 in T-Lymphozyten wichtige Aufgaben übernimmt.

Allerdings sind die exakten Funktionen von BAF-Komplexen noch nicht bekannt. So weiß man nicht, ob sie als allgemeine *chromatin remodeling* Komplexe agieren oder nur ein bestimmtes Repertoire an Genen regulieren. In *S. cerevisiae* stellte man fest, dass die Expression von nur etwa 1–6% der Gene vom SWI/SNF-Komplex abhängig ist (Holstege et al., 1998; Sudarsanam et al., 2000). Dagegen beobachteten Armstrong und Kollegen, dass der BRM-Komplex aus *D. melanogaster* die globale Transkription stark erleichtert (Armstrong et al., 2002). In Säugern sind auf Zellebene weder Brg1 noch Brm essentiell, obwohl homozygote Mäuseembryos mit einer Brg1-Nullmutation vor der Implantation sterben (Reyes et al., 1998; Bultman et al., 2000). Aufgrund dieser Veröffentlichungen kann man annehmen, dass zumindest Brg1 zunächst für die frühe Embryonalentwicklung und später auch für die Entwicklung bestimmter Zelltypen, wie T-Lymphozyten (s. o.), essentiell ist. Demnach beeinflussen BAF-Komplexe in solchen Zellen entweder zentrale Signalwege oder aber sie üben eine Funktion als globale Transkriptionsregulatoren aus.

SWI/SNF-Komplexe wurden zunächst als aktivierende Cofaktoren identifiziert, die indirekt möglicherweise auch die Expression einiger Gene reprimieren. In den letzten Jahren fanden sich jedoch zahlreiche Hinweise, dass SWI/SNF-Komplexe auch direkt an der Repression von Genen beteiligt sein können (Übersicht in Martens und Winston, 2003; s. a. 1.1.5.3). Gerade bei der Stimulierung von T-Lymphozyten wäre es durchaus denkbar, dass BAF-Komplexe sowohl eine aktivierende als auch eine reprimierende Funktion ausüben. Denn hier steigt bekanntlich nicht nur die allgemeine Transkriptionsaktivität an, sondern es kommt auch zur Repression zahlreicher Gene (Teague et al., 1999). Hieraus ergibt sich die Frage, wie die verschiedenen Funktionen von BAF-Komplexen in derselben Zelle differenziert werden können. Eine Möglichkeit wäre, dass unterschiedlich zusammengesetzte BAF-Komplexe leicht unterschiedliche Aktivitäten haben und mittels bestimmter Aktivatoren, Cofaktoren oder Histonmodifikationen spezifisch rekrutiert werden (s. a. 5.4.2). Die tatsächliche Existenz solcher heterogener BAF-Komplexe in einzelnen Zelltypen wurde von Wang und Kollegen gezeigt (Wang et al., 1996).

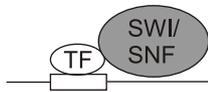
In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisierung von Brg1 in offenen Chromatinregionen und seine Rekrutierung an aktivierte Gene gezeigt. Diese Beobachtungen weisen auf die Funktion von BAF-Komplexen als Coaktivatoren in Lymphozyten hin. Allerdings können sie eine mögliche Rolle von Brg1 als Repressor nicht ausschließen. Zudem konnte für eine Reihe unterschiedlicher Gene beobachtet werden, dass Brg1 nach Stimulierung rekrutiert wird. Dies unterstützt die Annahme, dass Brg1 als allgemeiner Cofaktor bzw. als Cofaktor mit einer großen Zielgruppe an Genen dient.

5.4.2 Potentielle Wege der Rekrutierung von SWI/SNF

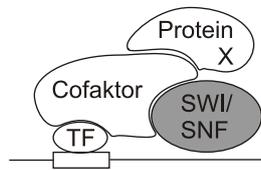
Die Rekrutierung von BAF-Komplexen ist ein wichtiger Vorgang, der ebenfalls im Detail nicht bekannt ist. Prinzipiell kann man zwei Möglichkeiten der Rekrutierung unterscheiden: zum einen über die Bindung an andere Proteine oder Proteinkomplexe, oder aber über die direkte Bindung an DNA bzw. Chromatin (s. Abb. 5.4).

A) Rekrutierung über Proteine

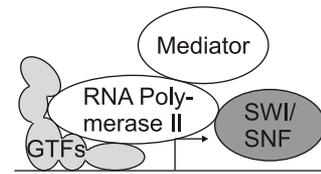
i) Rekrutierung über Transkriptionsfaktoren (TF)



ii) Rekrutierung über Cofaktoren



iii) Rekrutierung über das Holoenzym



B) Bindung an DNA und Chromatin

i) Direkte Bindung an DNA



ii) Bindung über modifizierte Histone

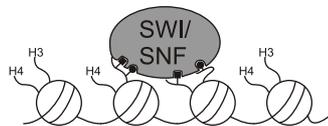


Abbildung 5.4: Mögliche Rekrutierungsmechanismen von SWI/SNF-Komplexen.

Sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen hat man die Interaktion von SWI/SNF-Komplexen mit vielen spezifischen Transkriptionsfaktoren beobachtet. SWI/SNF-Komplexe aus *S. cerevisiae* interagieren z. B. mit den Aktivatoren Gcn4, Hap4, Swi5 und VP16 (Neely et al., 1999), während Brg1 in humanen Zellen unter anderem mit zahlreichen Zinkfingerproteinen wechselwirken kann (Kadam und Emerson, 2003). Im Augenblick geht man davon aus, dass SWI/SNF-Komplexe generell über solche Transkriptionsfaktoren an ihre Zielpromotoren rekrutiert werden (Martens und Winston, 2003).

Allerdings gibt es auch Beispiele für abweichende Rekrutierungsmechanismen. So wird z. B. bei der Aktivierung durch den Thyroidhormon- oder den Androgenrezeptor der SWI/SNF-Komplex über den Cofaktor CBP/p300 an den Promotor gebunden (Huang et al., 2003). Man kann als weitere Möglichkeit also die Rekrutierung von BAF-Komplexen mittels Brückenmolekülen, die als Interaktionsplattformen dienen, ins Auge fassen. Ein anderer Weg ist die Einbindung des SWI/SNF-Komplexes in das RNA-Polymerase II-Holoenzym. Studien

in Hefe und in humanen Zelllinien zeigten, dass Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes zusammen mit RNA-Polymerase II aufgereinigt bzw. copräzipitiert werden können (Wilson et al., 1996; Cho et al., 1998; Neish et al., 1998). Jedoch widerlegen neuere Studien, dass diese Interaktion im Allgemeinen der Rekrutierung von SWI/SNF-Komplexen dient (Übersicht in Peterson und Workman, 2000).

SWI/SNF-Komplexe könnten alternativ auch durch die direkte Bindung an DNA oder Chromatin rekrutiert werden. Wang und Kollegen identifizierten BAF57, eine Untereinheit von BAF-Komplexen ohne Homolog in *S. cerevisiae*, als DNA bindendes Protein (Wang et al., 1998). Jedoch scheint diese Untereinheit, zumindest *in vitro*, nicht essentiell für die Bindung von SWI/SNF-Komplexen an DNA zu sein. Dagegen ermöglicht die Bromodomäne von Swi2/Snf2, der homologen Untereinheit von Brg1 und Brm in *S. cerevisiae*, die Verankerung von SWI/SNF-Komplexen an acetylierten Nucleosomen-Arrays (Hassan et al., 2002). Auf diese Weise bleiben die Komplexe selbst nach der Dissoziation von spezifischen Transkriptionsfaktoren assoziiert. Auch in Säugern scheint die Bromodomäne die Rekrutierung von BAF-Komplexen zu beeinflussen. Biggs und Kollegen beobachteten, dass Brm nicht mehr fest mit dem Kern assoziiert war, nachdem ein großer Teil der Bromodomäne durch Cathepsin G abgespalten worden war (Biggs et al., 2001). Neben der Bromodomäne, die acetylierte Lysine, insbesondere an Histonen, bindet, ist nur die Chromodomäne als Nucleosomen bindende Einheit bekannt (s. a. 1.1.5.1). Sie interagiert spezifisch mit methyliertem H3 K9, ist aber in SWI/SNF-Komplexen nicht vorhanden. Man könnte sich vorstellen, dass noch nicht identifizierte Domänen in BAF-Komplexen mit bestimmten Histonmodifikationen – oder auch mit Kombinationen spezifischer Modifikationen – interagieren. Die große Zahl möglicher Histonmodifikationen, ihre Kombination und die unterschiedlichen Modifikationsgrade ergeben eine Vielzahl von Interaktionsoberflächen, so dass über die Bindung geeigneter Domänen die spezifische Rekrutierung von BAF-Komplexen möglich wäre.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach T-Zellstimulierung die Rekrutierung von Brg1 und die Zunahme der H3 K4-Trimethylierung an aktivierten Genen beobachtet werden, nicht aber die Zunahme der H3 K4-Dimethylierung oder der H3 K14-Acetylierung. Möglicherweise dient also die H3 K4-Trimethylierung als Interaktionsoberfläche oder als Teil einer Interaktionsoberfläche für die Rekrutierung von BAF-Komplexen. Bisher konnte jedoch eine Bindung von SWI/SNF-Komplexen an Histon-H3-Peptide mit methyliertem K4 nicht nachgewiesen werden (E. Blazek, persönl. Mitteilung). Dies könnte unter Umständen aber auch daran liegen, dass die Interaktionsoberfläche komplexer als das trimethylierte H3 K4 ist und zusätzliche Modifikationen auf H3 oder auch H4 zur Interaktion benötigt werden.

Obwohl an einigen Modellgenen sowohl in Hefe als auch in Humanzelllinien die Rekrutierung Chromatin modifizierender Enzyme und der basalen Transkriptionsmaschine in Einzelheiten untersucht worden ist, hat sich bislang kein einheitliches Bild ergeben, wie und wann der SWI/SNF-Komplex an aktivierte

Gene rekrutiert wird. In *S. cerevisiae* wird der SWI/SNF-Komplex mit Hilfe des Aktivators Swi5 an das HO-Gen rekrutiert, was wiederum die Voraussetzung für die folgende Rekrutierung des SAGA-Komplexes ist (Cosma et al., 1999). Dagegen wird die Rekrutierung des humanen BAF-Komplexes an das IFN- β -Gen durch die vorhergehende Acetylierung der Promotor-Nucleosomen erleichtert und erst in Anwesenheit von CBP möglich (Agalioti et al., 2000). Während bei den beiden angeführten Beispielen die Bildung des PIC der letzte Schritt in der Genaktivierung ist, werden die Elemente der basalen Transkriptionsmaschine beim Collagenasegen und beim α_1 -Antitrypsinogen schon sehr früh gebunden (Martens et al., 2003; Soutoglou und Talianidis, 2002). Bei diesen beiden Genen ist die Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes der letzte Schritt bei der Genaktivierung. Die angeführten Beispiele lassen vermuten, dass die Art und der Zeitpunkt der Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes je nach Gen variiert. Letztendlich scheint die Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes auf unterschiedlichen Mechanismen zu beruhen, deren Kombination vielleicht eine Anpassung an die Regulation des aktivierten Gens ermöglicht.

5.4.3 Modell für die Funktion von Brg1 in T-Lymphozyten

Aufbauend auf den vorgestellten Veröffentlichungen und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann man ein Modell aufstellen, wie BAF-Komplexe in primären T-Zellen nach Stimulierung funktionieren und wie sie rekrutiert werden könnten (s. Abb. 5.5). Nach der Aktivierung von T-Lymphozyten nimmt, wie hier gezeigt wurde, die Menge an Brg1 stark zu. Unter der Voraussetzung, dass die anderen BAF-Untereinheiten nicht limitierend sind, steigt dadurch die Konzentration an aktiven BAF-Komplexen an. Schon zu Beginn der Aktivierung kann die lokale Konzentration in bestimmten Kernregionen erhöht werden, da BAF-Komplexe rasch mit der nukleären Matrix assoziieren. Mit Hilfe dieser beiden Mechanismen ist es möglich, die Menge an verfügbaren BAF-Komplexen rasch und andauernd zu erhöhen.

Sind nun – im Vergleich zu ruhenden T-Zellen – genügend BAF-Komplexe nahe transkriptionell inaktiver Chromatinregionen vorhanden, kann man sich zwei nahe liegende Szenarien vorstellen. BAF-Komplexe werden spezifisch mittels Transkriptionsaktivatoren an die zu aktivierenden Gene rekrutiert. Alternativ ist die Konzentration an BAF-Komplexen ausreichend, so dass diese über ihre DNA und Chromatin bindenden Eigenschaften an geeignete Bindungsstellen der inaktiven Chromatinregionen binden. Nach der Rekrutierung der BAF-Komplexe „öffnen“ diese die „geschlossene“ Chromatinstruktur. Dies ermöglicht die Bindung der benötigten Transkriptionsfaktoren und -cofaktoren mit Hilfe spezifischer Aktivatoren. Beide Szenarien lassen eine spezifische Aktivierung von Genen zu, da in jedem Fall genspezifische Aktivatoren erforderlich sind. Falls BAF-Komplexe

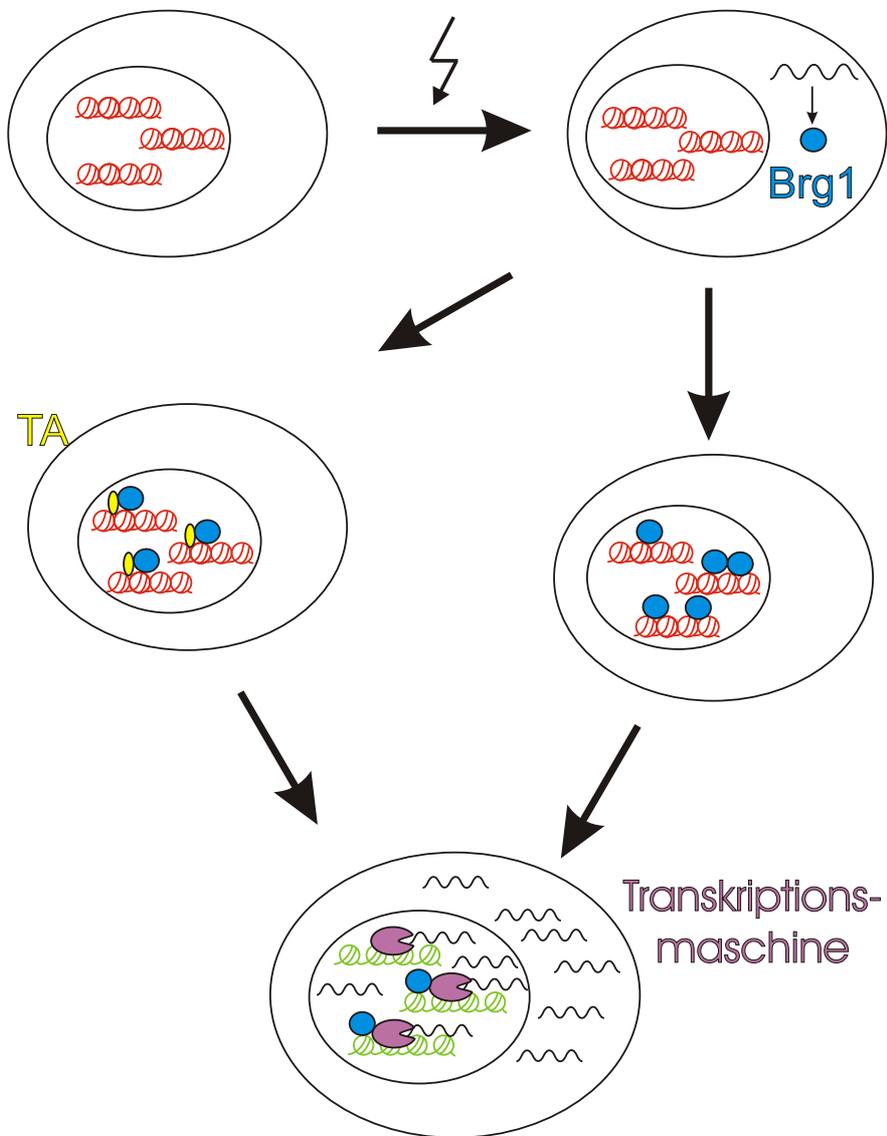


Abbildung 5.5: **Vereinfachtes Modell der Funktion von BAF-Komplexen bei der Aktivierung von T-Lymphozyten.** Nach der T-Zellaktivierung (Blitz) wird die Expression von Brg1 (blau) erhöht. BAF-Komplexe (blau) binden mit oder ohne Hilfe von Transkriptionsaktivatoren (gelb) an transkriptionell inaktive Regionen (rot) und „öffnen“ die Chromatinstruktur (grün). Dadurch können Transkriptionsfaktoren, -cofaktoren und die Transkriptionsmaschine (violett) leichter und effizienter binden. Dies führt zu einer Erhöhung der allgemeinen Transkriptionsaktivität (s. a. Text).

nur über ihre eigenen potentiellen Chromatinbindungsdomänen rekrutiert werden, sind zur endgültigen Aktivierung bestimmter Gene Transkriptionsaktivatoren notwendig, die die Cofaktoren und Elemente der basalen Transkriptionsmaschine rekrutieren. Eine unspezifische Aktivierung aller Gene im „geöffneten“ Chromatin ist demnach nicht möglich. Wahrscheinlich spielen daneben auch Histonmodifikationen bei der Bindung von BAF-Komplexen eine Rolle. Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Anstieg der H3 K4-Trimethylierung gibt Hinweise darauf, dass diese Modifikation möglicherweise in Zusammenhang mit der Rekrutierung von SWI/SNF-Komplexen steht.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es nach der T-Zellaktivierung zu einer erheblichen Zunahme der verfügbaren, aktiven BAF-Komplexe kommt. Dadurch kann das Chromatin in T-Zellen effizient von seiner „ruhenden“ in eine aktive Struktur umgewandelt werden. Die neue Chromatinstruktur wird so zugänglich für die Bindung von Transkriptionsaktivatoren, -cofaktoren und der basalen Transkriptionsmaschine. Letztendlich ist diese „Öffnung“ eine Voraussetzung für die Erhöhung der Transkriptionsaktivität, weil nur in leicht zugänglichem Chromatin Gene effizient transkribiert werden können.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Die Genexpression spielt in allen Lebewesen eine wichtige Rolle. Sie ermöglicht die Entwicklung von Organismen, die Differenzierung von Geweben und die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen. Dabei stellt die Transkription als erster Schritt der Expression einen zentralen Regulationspunkt dar. Seit vielen Jahrzehnten sind daher, neben der Aufklärung genspezifischer Regulationswege, grundlegende Mechanismen der Transkriptionsregulation von großem Interesse. Die meisten Erkenntnisse zum Ablauf der Transkription in Säugerzellen stammen aus transformierten Zelllinien. Diese liefern zwar große Materialmengen konstanter Qualität, unterscheiden sich aber deutlich von primären Zellen. Eines der wenigen primären Zellsysteme, das sich gut zur Untersuchung der allgemeinen Transkriptionsregulation eignet, bilden primäre humane T-Lymphozyten. Diese Zellen, die aus menschlichem Blut gewonnen werden, liegen in einem ruhenden Zustand (G_0 -Phase) vor. Im Körper werden T-Zellen nach dem Eindringen von Krankheitserregern durch spezifische Antigene stimuliert, während in Experimenten verschiedene chemische und biologische Substanzen die Aktivierung simulieren können. Aktivierte Lymphozyten zeichnen sich im Vergleich zu ruhenden durch höhere Transkriptionsaktivität, verstärkte Proteinsynthese, Proliferation und veränderte Genexpression aus. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Mechanismen in T-Lymphozyten die allgemeine Transkriptionsaktivität regulieren und zu ihrer Zunahme nach Stimulierung führen können.

Die Analyse der Proteinmengen genereller Transkriptionsfaktoren zeigte, dass ihre Konzentrationen nach Stimulierung nur mäßig anstiegen. Damit sind diese Elemente der basalen Transkriptionsmaschine in ruhenden T-Zellen – im Vergleich zu aktivierten – nicht limitierend. Dagegen verhielten sich die Mengen der Untereinheiten von RNA-Polymerase II nach T-Zellaktivierung unterschiedlich. Die größte Untereinheit hRPB1 sowie die strukturell wichtige Untereinheit hRPB3 nahmen nach Aktivierung deutlich zu. Ihre Limitierung in ruhenden Lymphozyten könnte die aktive Menge an RNA-Polymerase II regulieren, die nach Stimulierung aufgrund der Zunahme von hRPB1 und hRPB3 ansteigen würde. Während die Mengen anderer getesteter Untereinheiten konstant blieben, stiegen die Kon-

zentrationen der Untereinheiten hRPB4 und hRPB7 ebenfalls an. Die Homologe dieser Untereinheiten beeinflussen in *S. cerevisiae* die Stressantwort.

Eine weitere Möglichkeit zur Transkriptionsregulation wurde in der Phosphorylierung der großen Polymeraseuntereinheit hRPB1 gefunden. Nach T-Zellaktivierung nahm die Phosphorylierung sowohl an Serin 2 als auch an Serin 5 der C-terminalen Domäne (CTD) zu. Da die Phosphorylierung der CTD die Bindung von Elongations-, Terminations- und Prozessierungsfaktoren ermöglicht, bewirkt sie nach heutigem Kenntnisstand eine Steigerung der Prozessivität und der Effizienz der Transkription und damit auch der allgemeinen Transkriptionsaktivität. Neben der bekannten Zunahme der P-TEFb-Menge nach T-Zellstimulierung (Garriga et al., 1998) wurde in der vorliegenden Arbeit auch ein Anstieg der CDK7- und der CDK8-Konzentration beobachtet. Demnach sind alle drei bekannten CTD-Kinasen, P-TEFb (CDK9/Cyclin T), TFIIH (CDK7/Cyclin H) und Mediator (CDK8/Cyclin C), potentielle Regulatoren der Transkriptionsaktivität in T-Lymphozyten.

Nicht am Enzym, sondern am *template* setzt die Regulation der Transkription durch die Chromatinstruktur an. Die Analyse von Histon modifizierenden Aktivitäten *in vitro* zeigte, dass nach T-Zellstimulierung eine Aktivität, die Histon H4 methylierte, zunahm. Der Aktivitätsanstieg wurde durch verschiedene Stimuli induziert und war spezifisch für primäre T-Lymphozyten im Vergleich zu anderen primären Zellen und zu transformierten Jurkat Zellen. Spezifitätstests mit Peptiden und gleiches Induktionsverhalten ließen darauf schließen, dass es sich bei der Aktivität wahrscheinlich um PRMT1 handelt, das Histon H4 an Arginin 3 (H4 R3) methylieren kann. Für PRMT1 konnte nach T-Zellstimulierung eine Zunahme sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Überraschenderweise blieb die Menge an methyliertem H4 R3 nach T-Zellaktivierung konstant. Auf der Suche nach alternativen Substraten von PRMT1 in T-Lymphozyten zeigte sich, dass die Menge an hnRNP A1 nach T-Zellstimulierung zunahm und dass das Protein an Arginin methyliert war. Möglicherweise erlaubt die Methylierung von hnRNP A1 in T-Lymphozyten eine effizientere Prozessierung und einen effizienteren Transport von RNA. PRMT1 wäre somit kein direkter Regulator der Transkriptionsaktivität. Es würde aber die Voraussetzungen dafür schaffen, dass nach der T-Zellaktivierung die größeren RNA-Mengen schnell und effektiv genutzt werden können.

Die bekannten Zusammenhänge zwischen Histonmodifikationen und der transkriptionellen Aktivität von Chromatin ließen vermuten, dass es während der T-Zellstimulierung zu Änderungen der Histonmodifikationen kommt, die die Erhöhung der Transkriptionsaktivität widerspiegeln. Die Analyse von Histonmodifikationen in Gesamtzellextrakten zeigte jedoch, dass sowohl die Acetylierung als auch die Methylierung von Histonen mehr oder weniger konstant blieb. Allerdings konnte auf der Ebene einzelner Zellen beobachtet werden, dass sich die Lokalisierung der Lysin 4-Methylierung auf Histon H3 (H3 K4) änderte. In aktivierten T-Lymphozyten konzentrierten sich die H3 K4-Di- und Trimethylierung in offe-

nen Chromatinregionen, die sich nach der Stimulierung ausbildeten. Die relativ gleichmäßige Chromatinstruktur ruhender Lymphozyten verwandelte sich nach Aktivierung in sehr dichte und in offene Regionen. Dies steht im Gegensatz zu früheren Veröffentlichungen, wo berichtet wurde, dass die Heterochromatin ähnlichen Kerne ruhender T-Zellen nach Stimulierung eine starke Dekondensierung erfuhren.

Die Analyse von Cofaktoren, die das Chromatin umstrukturieren und Histone modifizieren können, zeigte, dass die Mengen der SWI/SNF-Untereinheit Brg1 und der Histonacetyltransferase (HAT) CBP nach T-Zellaktivierung stark zunahm. Beide Enzyme fanden sich auf Zellebene in offenen Chromatinregionen wieder, scheinen also wichtige Funktionen bei der Transkription in Lymphozyten innezuhaben. Auf der Ebene einzelner Gene wurde Brg1 nach Stimulierung rekrutiert, CBP konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Damit ist die Rolle von CBP als allgemeiner Transkriptionscoaktivator mit HAT-Funktion in der T-Zellaktivierung fraglich. Brg1 dagegen scheint für das *remodeling* eines breiten Spektrums an Genen verantwortlich zu sein. Neben der Rekrutierung von Brg1 zeigten die getesteten Gene nach T-Zellstimulierung eine Zunahme der H3 K4-Trimethylierung. Die H3 K4-Dimethylierung hingegen blieb überwiegend konstant. Trotz des gemeinsamen Auftretens von Brg1 und H3 K4-Trimethylierung auf Genebene wurde auf der Ebene einzelner Zellen nur eine teilweise überlappende Lokalisierung beobachtet. Somit wurde kein direkter Hinweis auf einen möglichen ursächlichen Zusammenhang erhalten.

Die vorliegende Arbeit zeigte zum ersten Mal die Induktion der SWI/SNF-Untereinheit Brg1 nach T-Zellstimulierung und ihre Rekrutierung zu aktivierten Genen, die gleichzeitig mit einer Erhöhung der H3 K4-Trimethylierung auftritt. Dies macht den SWI/SNF-Komplex zu einem aussichtsreichen Kandidaten für die Regulation der allgemeinen Transkriptionsaktivität in T-Lymphozyten. Außerdem könnte die allgemeine Transkriptionsaktivität über die Menge und den Phosphorylierungsgrad der großen Untereinheit von RNA-Polymerase II gesteuert werden. Daneben wurde zum ersten Mal die Induktion der Methyltransferase PRMT1 nach T-Zellaktivierung gezeigt, die möglicherweise beim Transport und bei der Prozessierung von RNA in T-Lymphozyten eine Rolle spielt.

Literaturverzeichnis

- Acker, J., de Graaff, M., Cheynel, I., Khazak, V., Kédinger, C. und Vigneron, M. (1997) Interactions between the human RNA polymerase II subunits. *J. Biol. Chem.*, **272**, 16815–16821.
- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T. und Thanos, D. (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN- β promoter. *Cell*, **103**, 667–678.
- Agarwal, S. und Rao, A. (1998) Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity*, **9**, 765–775.
- Akhtar, A., Zink, D. und Becker, P. B. (2000) Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature*, **407**, 405–409.
- Alberts, A. S., Geneste, O. und Treisman, R. (1998) Activation of SRF-regulated chromosomal templates by Rho-family GTPases requires a signal that also induces H4 hyperacetylation. *Cell*, **92**, 475–487.
- Albig, W., Trappe, R., Kardalidou, E., Eick, S. und Doenecke, D. (1999) The human H2A and H2B histone gene complement. *Biol. Chem.*, **380**, 7–18.
- Albright, S. R. und Tjian, R. (2000) TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene*, **242**, 1–13.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R. und Mirsky, A. E. (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Biochemistry*, **51**, 786–794.
- Armstrong, J. A., Papoulas, O., Daubresse, G., Sperling, A. S., Lis, J. T., Scott, M. P. und Tamkun, J. W. (2002) The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *EMBO J.*, **21**, 5245–5254.
- Asturias, F. J., Jiang, Y. W., Myers, L. C., Gustafsson, C. M. und Kornberg, R. D. (1999) Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science*, **283**, 985–987.

- Aukrust, P., Svardal, A. M., Müller, F., Lunden, B., Nordøy, I. und Frøland, S. S. (1996) Markedly disturbed glutathione redox status in CD45RA⁺CD4⁺ lymphocytes in human immunodeficiency virus type 1 infection is associated with selective depletion of this lymphocyte subset. *Blood*, **88**, 2626–2633.
- Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S. J., Glimcher, L. H. und Rao, A. (2002) T_H cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat. Immun.*, **3**, 643–651.
- Avots, A., Buttmann, M., Chuvpilo, S., Escher, C., Smola, U., Bannister, A. J., Rapp, U. R., Kouzarides, T. und Serfling, E. (1999) CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity*, **10**, 515–524.
- Bannister, A. J. und Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, **384**, 641–643.
- Bannister, A. J., Schneider, R. und Kouzarides, T. (2002) Histone methylation: dynamic or static? *Cell*, **109**, 801–806.
- Bannister, A. J., Zegermann, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. und Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120–124.
- Bartkova, J., Zemanova, M. und Bartek, J. (1996) Expression of CDK7/CAK in normal and tumour cells of diverse histogenesis, cell-cycle position and differentiation. *Int. J. Cancer*, **66**, 732–737.
- Bauer, U.-M., Daujat, S., Nielsen, S. J., Nightingale, J. und Kouzarides, T. (2002) Methylation of arg17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep.*, **3**, 39–44.
- Becker, P. B. und Hörz, W. (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 247–273.
- Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E. und Sauer, F. (2002) Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic regulator Ash1. *Nature*, **419**, 857–862.
- Bengal, E., Flores, O., Krauskopf, D., Reinberg, D. und Aloni, Y. (1991) Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1195–1206.
- Bentley, D. (1999) Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 347–351.

- Berger, S. L. (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **12**, 142–148.
- Bhat, N. K., Thompson, C. B., Lindsten, T., June, C. H., Fujiwara, S., Koizumi, S., Fisher, R. J. und Papas, T. S. (1990) Reciprocal expression of human ETS1 and ETS2 genes during T-cell activation: Regulatory role for the proto-oncogene ETS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3723–3727.
- Biggs, J. R., Yang, J., Gullberg, U., Muchardt, C., Yaniv, M. und Kraft, A. S. (2001) The human brm protein is cleaved during apoptosis: The role of cathepsin G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3814–3819.
- Bodor, J., Bodorova, J. und Gress, R. E. (2000) Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *J. Leukoc. Biol.*, **67**, 774–779.
- Boffa, L. C., Karn, J., Vidali, G. und Allfrey, V. G. (1977) Distribution of N^G,N^G-dimethylarginine in nuclear protein fractions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 969–976.
- Boniface, J. J., Rabinowitz, J. D., Wülfing, C., Hampl, J., Reich, Z., Altman, J. D., Kantor, R. M., Beeson, C., McConnell, H. M. und Davis, M. M. (1998) Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands. *Immunity*, **9**, 459–466.
- Bonnet, F., Vigneron, M., Bensaude, O. und Dubois, M.-F. (1999) Transcription-independent phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) involves ERK kinases (MEK1/2). *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4399–4404.
- Boube, M., Joulia, L., Cribbs, D. L. und Bourbon, H.-M. (2002) Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from man to yeast. *Cell*, **110**, 143–151.
- Boyer, L. A., Langer, M. R., Crowley, K. A., Tan, S., Denu, J. M. und Peterson, C. L. (2002) Essential function for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol. Cell*, **10**, 935–942.
- Bøyum, A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood (Paper IV). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21** (Suppl. 97), 77–89.
- Briggs, S. D., Bryk, M., Strahl, B. D., Cheung, W. L., Davie, J. K., Dent, S. Y., Winston, F. und Allis, C. D. (2001) Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **15**, 3286–3295.

- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. und Allis, C. D. (1996) *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, **84**, 843–851.
- Bultman, S., Gebuhr, T., Yee, D., La Mantia, C., Nicholson, J., Gilliam, A., Randazzo, F., Metzger, D., Chambon, P., Crabtree, G. und Magnuson, T. (2000) A *Brg1* null mutation in the mouse reveals function differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol. Cell*, **6**, 1287–1295.
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L. und Sharp, P. A. (1989) Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell*, **56**, 549–561.
- Burke, T. W. und Kadonaga, J. T. (1997) The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAF_{II}60 of *Drosophila*. *Genes Dev.*, **11**, 3020–3031.
- Burley, S. K. und Roeder, R. G. (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 769–799.
- Butler, J. E. F. und Kadonaga, J. T. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.*, **16**, 2583–2592.
- Cakouros, D., Cockerill, P. N., Bert, A. G., Mital, R., Roberts, D. C. und Shannon, M. F. (2001) A NF-kappa B/Sp1 region is essential for chromatin remodeling and correct transcription of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgene. *J. Immunol.*, **167**, 302–310.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R. S. und Zhang, Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science*, **298**, 1039–1043.
- Castellano, R., Van Lint, C., Peri, V., Veithen, E., Morel, Y., Costello, R., Olive, D. und Collette, Y. (2002) Mechanisms regulating expression of the tumor necrosis factor-related *light* gene: Role of calcium signaling pathway in the transcriptional control. *J. Biol. Chem.*, **277**, 42841–42851.
- Chan, H. M. und La Thangue, N. B. (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell Sci.*, **114**, 2363–2373.
- Chevillard-Briet, M., Trouche, D. und Vandell, L. (2002) Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *EMBO J.*, **21**, 5457–5466.

- Chi, T. H., Wan, M., Lee, P. P., Akashi, K., Metzger, D., Chambon, P., Wilson, C. B. und Crabtree, G. R. (2003) Sequential role of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity*, **19**, 169–182.
- Chi, T. H., Wan, M., Zhao, K., Taniuchi, I., Chen, L., Littman, D. R. und Crabtree, G. R. (2002) Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes. *Nature*, **418**, 195–199.
- Chilson, O. P., Boylston, A. W. und Crumpton, M. J. (1984) Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor. *EMBO J.*, **3**, 3239–3245.
- Cho, H., Kim, T.-K., Mancebo, H., Lane, W. S., Flores, O. und Reinberg, D. (1999) A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev.*, **13**, 1540–1552.
- Cho, H. G., Orphanides, X., Sun, X. J., Yang, V., Ogryzko, E., Lee, Y., Nakatani, Y. und Reinberg, D. (1998) A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.*, **95**, 717–728.
- Choder, M. (1993) A growth rate-limiting process in the last growth phase of the yeast life cycle involves RPB4, a subunit of RNA polymerase II. *J. Bacteriol.*, **175**, 6358–6363.
- Choder, M. und Young, R. A. (1993) A portion of RNA polymerase II molecules has a component essential for stress responses and stress survival. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6984–6991.
- Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. und Strober, W. (Hrsg.) (1994) *Current Protocols in Immunology*, Bd. 1, Kap. 5.7.1. JohnWiley and Sons, New York.
- Conaway, J. W., Shilatifard, A., Dvir, A. und Conaway, R. C. (2000) Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 375–380.
- Conaway, R. C. und Conaway, J. W. (1993) General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 161–190.
- Cooke, A. und Kay, J. E. (1973) Effect of phytohemagglutinin on the nuclear RNA polymerase activity of human lymphocytes. *Exp. Cell Res.*, **79**, 179–185.
- Cooper, H. L. (1966) Synthesis of nonribosomal RNA by lymphocytes: a response to phytohemagglutinin treatment. *Science*, **152**, 516–518.

- Cosma, M. P., Tanaka, T. und Nasmyth, K. (1999) Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell*, **97**, 299–311.
- Crabtree, G. R. und Clipstone, N. A. (1994) Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 1045–1083.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M., David, P. E. und Kornberg, R. D. (2000) Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*, **288**, 640–649.
- Cramer, P., Bushnell, D. A. und Kornberg, R. D. (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 ångstrom resolution. *Science*, **292**, 1863–1874.
- Czernin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. und Pirrotta, V. (2002) *Drosophila* Enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal polycomb sites. *Cell*, **111**, 185–196.
- Dahmus, M. E. (1996) Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, **271**, 19009–19012.
- Davis, M. M. (2002) A new trigger for T cells. *Cell*, **110**, 285–287.
- van Delden, C. J., de Wit, H. J. C. und Smit Sibinga, C. T. (1998) Comparison of blood component preparation systems based on buffy coat removal: component specifications, efficiency, and process costs. *Transfusion*, **38**, 860–866.
- Delon, J., Grégoire, C., Malissen, B., Darce, S., Lemaître, F., Kourilsky, P., Abastado, J. P. und Trautmann, A. (1998) CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes. *Immunity*, **9**, 467–473.
- Denu, J. M. (2003) Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD⁺-dependent deacetylases. *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 41–48.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K. und Zhou, M.-M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491–496.
- Diehn, M., Alizadeh, A. A., Rando, O. J., Lu, C. L., Stankunas, K., Botstein, D., Crabtree, G. R. und Brown, P. O. (2002) Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11796–11801.

- Dikstein, R., Ruppert, S. und Tjian, R. (1996) TAF_{II}250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74. *Cell*, **84**, 781–790.
- Dotson, M. R., Yuan, C. X., Roeder, R. G., Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Jiang, Y. W., Li, Y., Kornberg, R. D. und Asturias, F. J. (2000) Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14307–14310.
- Dreyfuss, G., Choi, Y. D. und Adam, S. A. (1984) Characterization of heterogeneous nuclear RNA-protein complexes in vivo with monoclonal antibodies. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1104–1114.
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Piñol-Roma, S. und Burd, C. G. (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 289–321.
- Dubois, M.-F., Nguyen, V. T., Dahmus, M. E., Pagès, G., Pouysségur, J. und Bensaude, O. (1994) Enhanced phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II upon serum stimulation of quiescent cells: possible involvement of MAP kinases. *EMBO J.*, **13**, 4787–4797.
- Dubois, M.-F., Vincent, M., Vigneron, M., Adamczewski, J., Egly, J.-M. und Bensaude, O. (1997) Heat-shock inactivation of the TFIIH-associated kinase and change in the phosphorylation sites on the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 694–700.
- Dunaief, J. L., Strober, B. E., Guha, S., Khavari, P. A., Ålin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G. R. und Goff, S. P. (1994) The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell*, **79**, 119–130.
- Dutton, R. W., Bradley, L. M. und Swain, S. L. (1998) T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 201–223.
- Dvir, A., Conaway, R. C. und Conaway, J. W. (1996) Promoter escape by RNA polymerase II. A role for an ATP cofactor in suppression of arrest by polymerase at promoter-proximal sites. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23352–23356.
- Dvir, A., Conaway, R. G. und Conaway, J. W. (1997) A role for TFIIH in controlling the activity of early RNA polymerase II elongation complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9006–9010.
- Eberharter, A. und Becker, P. B. (2002) Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Rep.*, **3**, 224–229.

- Edwards, A. M., Kane, C. M., Young, R. A. und Kornberg, R. D. (1991) Two dissociable subunits of yeast RNA Polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 71–75.
- Fabbrizio, E., El Messaoudi, S., Polanowska, J., Paul, C., Cook, J. R., Lee, J.-H., Nègre, V., Rousset, M., Pestka, S., Le Cam, A. und Sardet, C. (2002) Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep.*, **3**, 641–645.
- Fang, J., Feng, Q., Ketel, C. S., Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Simon, J. A. und Zhang, Y. (2002) Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase. *Curr. Biol.*, **12**, 1086–1099.
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K. und Zhang, Y. (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr. Biol.*, **12**, 1052–1058.
- Fields, P. E., Kim, S. T. und Flavell, R. A. (2002) Cutting edge: changes in histone acetylation at the *IL-4* and *IFN- γ* loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J. Immunol.*, **169**, 647–650.
- Flores, O., Lu, H. und Reinberg, D. (1992) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIIH. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2768–2793.
- Frankel, A., Yadav, N., Lee, J., Branscombe, T. L., Clarke, S. und Bedford, M. T. (2002) The novel human protein arginine-N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **277**, 3537–3542.
- García-Rodríguez, C. und Rao, A. (1998) Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J. Exp. Med.*, **187**, 2031–2036.
- Garriga, J., Peng, J., Parreño, M., Price, D. H., Henderson, E. E. und Graña, X. (1998) Upregulation of cyclin T1/CDK9 complexes during T cell activation. *Oncogene*, **17**, 3092–3102.
- Gary, J. D. und Clarke, S. (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **61**, 65–131.
- Gebuhr, T. C., Kovalev, G. I., Bultman, S., Godfrey, V., Su, L. und Magnuson, T. (2003) The role of *Brg1*, a catalytic subunit of mammalian chromatin-remodeling complexes, in T cell development. *J. Exp. Med.*, **198**, 1937–1949.

- Geisberg, J. V., Holstege, F. C., Young, R. A. und Struhl, K. (2001) Yeast NC2 associates with the RNA polymerase II preinitiation complex and selectively affects transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 2736–2742.
- Geppert, T. D. und Lipsky, P. E. (1987) Accessory cell independent proliferation of human T4 cells stimulated by immobilized monoclonal antibodies to CD3. *J. Immunol.*, **138**, 1660–1666.
- Gil, D., Schamel, W. W. A., Montoya, M., Sánchez-Madrid, F. und Alarcón, B. (2002) Recruitment of Nck by CD3 ϵ reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell*, **109**, 901–912.
- Goppelt, A., Stelzer, G., Lottspeich, F. und Meisterernst, M. (1996) A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. *EMBO J.*, **15**, 3105–3116.
- Grant, P. A., Duggan, L., Côté, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., Berger, S. L. und Workman, J. L. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.*, **11**, 1640–1650.
- Grant, P. A., Eberharter, A., John, S., Cook, R. G., Turner, B. M. und Workman, J. L. (1999) Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5895–5900.
- Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Steger, D. J., Reese, J. C., Yates III, J. R. und Workman, J. L. (1998) A subset of TAFIIs are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell*, **94**, 45–53.
- Green, D. M., Marfatia, K. A., Crafton, E. B., Zhang, X., Cheng, X. und Corbett, A. H. (2002) Nab2p is required for poly(A) export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *J. Biol. Chem.*, **277**, 7752–7760.
- Grozinger, C. M. und Schreiber, S. L. (2002) Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem. Biol.*, **9**, 3–16.
- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, **389**, 349–352.

- Hamalainen, H. K., Tubman, J. C., Vikman, S., Kyrölä, T., Ylikoski, E., Warrington, J. A. und Lahesmaa, R. (2001) Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Anal. Biochem.*, **299**, 63–70.
- Hampsey, M. (1998) Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcription machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 465–503.
- Harlow, E. und Lane, D. (1999) *Using antibodies: A laboratory manual*, Kap. 8. Cold Spring Laboratory Press.
- Harper, J. W. und Elledge, S. J. (1998) The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective. *Genes Dev.*, **12**, 285–289.
- Hassan, A. H., Prochasson, P., Neely, K. E., Galasinski, S. C., Chandy, M., Carrozza, M. J. und Workman, J. L. (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*, **111**, 369–379.
- Hawkes, N. A. und Roberts, S. G. E. (1999) The role of human TFIIB in transcription start site selection in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, **274**, 14337–14343.
- He, D., Nickerson, J. A. und Penman, S. (1990) Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.*, **110**, 569–580.
- Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S. und Young, R. A. (1998) Temporal regulation of RNA Polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell*, **2**, 43–53.
- Herrmann, C. H., Carroll, R. G., Wei, P., Jones, K. A. und Rice, A. P. (1998) Tat-associated kinase, TAK, activity is regulated by distinct mechanisms in peripheral blood lymphocytes and promonocytic cell lines. *J. Virol.*, **72**, 9881–9888.
- Hirose, Y. und Manley, J. L. (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.*, **14**, 1415–1429.
- Hirschhorn, R., Troll, W., Brittinger, G. und Weissmann, G. (1969) Template activity of nuclei from stimulated lymphocytes. *Nature*, **222**, 1247–1249.
- Ho, C. K. und Shuman, S. (1999) Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme. *Mol. Cell*, **3**, 405–411.

- Holstege, F. C. P., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S. und Young, R. A. (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, **95**, 717–728.
- Holstege, F. C. P., van der Vliet, P. C. und Timmers, H. T. M. (1996) Opening of RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J.*, **15**, 1666–1677.
- Huang, Z.-Q., Li, J., Sachs, L. M., Cole, P. A. und Wong, J. (2003) A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription. *EMBO J.*, **22**, 2146–2155.
- Imbalzano, A. N., Zaret, K. S. und Kingston, R. E. (1994) Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J. Biol. Chem.*, **269**, 8280–8286.
- Imhof, A., Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y., Wolffe, A. P. und Ge, H. (1997) Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.*, **7**, 689–692.
- Izban, M. G. und Luse, D. S. (1992) Factor-stimulated RNA-polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. *J. Biol. Chem.*, **267**, 13647–13655.
- Jaehning, J. A., Stewart, C. C. und Roeder, R. G. (1975) DNA-dependent RNA polymerase levels during the response of human peripheral lymphocytes to phytohemagglutinin. *Cell*, **4**, 51–57.
- Jagus-Smith, R. und Kay, J. E. (1976) Messenger ribonucleic acid content of phytohemagglutinin-treated lymphocytes. *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 783–785.
- Janeway, C. A. und Travers, P. (1995) *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1. Auflage.
- Janeway, C. A. und Travers, P. (1996) *Immunobiology – The immune system in health and disease*, Kap. 1.10. Current Biology Ltd, London, und Garland Publishing Inc., New York, 2. Auflage.
- Jaskelioff, M. und Peterson, C. L. (2003) Chromatin and transcription: Histones continue to make their marks. *Nat. Cell Biol.*, **5**, 395–399.
- Jenkins, M. K., Pardoll, D. M., Mizuguchi, J., Quill, H. und Schwartz, R. H. (1987) T-cell unresponsiveness *in vivo* and *in vitro*: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol. Rev.*, **95**, 113–135.

- Jenuwein, T. (2001) Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol.*, **11**, 266–273.
- Jenuwein, T. und Allis, C. D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074–1080.
- Jones, E., Kimura, H., Vigneron, M., Wang, Z., Roeder, R. G. und Cook, P. R. (2000) Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against subunits of human RNA polymerases I, II, and III. *Exp. Cell Res.*, **254**, 163–172.
- Jünemann, S. (in Vorbereitung) Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kaczmarek, K., Calabretta, B., Elfenbein, I. B. und Mercer, W. E. (1987) Cell cycle analysis of human peripheral blood T lymphocytes in long-term culture. *Exp. Cell Res.*, **173**, 70–79.
- Kadam, S. und Emerson, B. M. (2003) Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell*, **11**, 377–389.
- Kadonaga, J. T. (2002) The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp. Mol. Med.*, **34**, 259–264.
- Kaiser, K. und Meisterernst, M. (1996) The human general co-factors. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 342–345.
- Kaiser, K., Stelzer, G. und Meisterernst, M. (1995) The coactivator p15(PC4) initiates transcriptional activation during TFIIA-TFIID-promoter complex formation. *EMBO J.*, **14**, 3520–3527.
- Kay, J. E. (1968) Early effects of phytohemagglutinin on lymphocyte RNA synthesis. *Eur. J. Biochem.*, **4**, 225–232.
- Khazak, V., Estojak, J., Cho, H., Majors, J., Sonoda, G., Testa, J. R. und Golemis, E. A. (1998) Analysis of the interaction of the novel RNA polymerase II (pol II) subunit hsRPB4 with its partner hsRPB7 and with pol II. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1935–1945.
- Kim, J. L., Nikolov, D. B. und Burley, S. K. (1993a) Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature*, **365**, 520–527.
- Kim, Y., Geiger, J. H., Hahn, S. und Sigler, P. B. (1993b) Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature*, **365**, 512–520.

- Kim, Y.-J., Björklund, S., Li, Y., Sayre, M. H. und Kornberg, R. D. (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*, **77**, 599–608.
- Kobor, M. S. und Greenblatt, J. (2002) Regulation of transcriptional elongation by phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1577**, 261–275.
- Koleske, A. J. und Young, R. A. (1994) An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature*, **368**, 466–469.
- Komarnitsky, P., Cho, E. J. und Buratowski, S. (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.*, **14**, 2452–2460.
- Koskela, K. und Lassila, O. (2003) Single-cell analysis of Ets1-transcription factor expression during lymphocyte activation and apoptosis. *Scand. J. Immunol.*, **57**, 56–61.
- Kouzarides, T. (1999) Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **9**, 40–48.
- Kouzarides, T. (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **12**, 198–209.
- Kretzschmar, M., Meisterernst, M. und Roeder, R. G. (1993) Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11508–11512.
- Kretzschmar, M., Stelzer, G., Roeder, R. G. und Meisterernst, M. (1994) RNA polymerase II cofactor PC2 facilitates activation of transcription by GAL4-AH in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3927–3937.
- Krogan, N. J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D. P., Beattie, B. K., Emili, A., Boone, C., Shilatifard, A., Buratowski, S. und Greenblatt, J. (2003) Methylation of Histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 4207–4218.
- Kuo, C. T. und Leiden, J. M. (1999) Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 149–187.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Reinberg, D. (2002) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.*, **16**, 2893–2905.

- Lachner, M. und Jenuwein, T. (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 286–298.
- Lachner, M., O’Carrol, D., Rea, S., Mechtler, K. und Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116–120.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Laing, T. J. und Weiss, A. (1988) Evidence for IL-2 independent proliferation in human T cells. *J. Immunol.*, **140**, 1056–1062.
- Lee, J. und Bedford, M. T. (2002) PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO Rep.*, **3**, 268–273.
- Lehmbacher, M. (2001) *Ein immunchemisches Verfahren zur Analyse von Transkriptionsnetzwerken in eukaryontischen Subproteomen*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Lennon, G. P., Sillibourne, J. E., Furrie, E., Doherty, M. J. und Kay, R. A. (2000) Antigen triggering selectively increases *TCR β V* gene transcription. *J. Immunol.*, **165**, 2020–2027.
- Leung, J. C. K., Lai, C. K. W., Chui, Y. L., Ho, R. T. H., Chan, C. H. S. und Lai, K. N. (1992) Characterization of cytokine gene expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells after activation with phorbol myristate acetate and phytohaemagglutinin. *Clin. Exp. Immunol.*, **90**, 147–153.
- Li, B., Howe, L., Anderson, S., Yates III, J. R. und Workman, J. L. (2003) The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, **278**, 8897–8903.
- Lin, J. und Weiss, A. (2001) T cell receptor signalling. *J. Cell Sci.*, **114**, 243–244.
- Lin, J.-X. und Leonard, W. J. (2000) The role of Stat5a and Stat5b in signaling by the IL-2 family cytokines. *Oncogene*, **19**, 2566–2576.
- Lin, W.-J., Gary, J. D., Yang, M. C., Clarke, S. und Herschman, H. R. (1996) The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 15034–15044.
- Litt, M. D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C. D. und Felsenfeld, G. (2001) Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken β -globin locus. *Science*, **293**, 2453–2455.

- Lu, H., Flores, O., Weinmann, R. und Reinberg, D. (1991) The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10004–10008.
- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J.-M. und Reinberg, D. (1992) Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA-polymerase II. *Nature*, **358**, 641–645.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. und Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251–260.
- Luger, K. und Richmond, T. J. (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **8**, 140–146.
- Ma, D., Olave, I., Merino, A. und Reinberg, D. (1996) Separation of the transcriptional coactivator and antirepression functions of transcription factor IIA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6583–6588.
- Ma, H., Bauman, C. T., Li, I. H., Strahl, B. D., Rice, R., Jelnek, M. A., Asward, D. W., Allis, C. D., Hager, G. L. und Stallcup, M. R. (2001) Hormon-dependent, CARM1-directed arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid regulated promoter. *Curr. Biol.*, **11**, 1981–1985.
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H. F. M., Quivy, J.-P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T. und Almouzni, G. (2002) Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and a RNA component. *Nat. Genet.*, **30**, 329–334.
- Malik, S., Gu, W., Wu, W., Qin, J. und Roeder, R. G. (2000) The USA-derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol. Cell*, **5**, 753–760.
- Marks, P. A., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T. und Kelly, W. K. (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 194–202.
- Marmorstein, R. (2001) Structure and function of histone acetyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 693–703.
- Martens, J. A. und Winston, F. (2003) Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **13**, 136–142.
- Martens, J. H., Verlaan, M., Kalkhoven, E. und Zantema, A. (2003) Cascade of histone modifications during collagenase gene activation. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 1808–1816.

- Marzluff, W. F. und Duronio, R. J. (2002) Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 692–699.
- Matsui, J., Segall, J., Weil, P. A. und Roeder, R. G. (1980) Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, **255**, 11992–11996.
- McGhee, J. D. und Felsenfeld, G. (1980) Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 1115–1156.
- Meisterernst, M., Roy, A. L., Lieu, H. M. und Roeder, R. G. (1991) Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell*, **66**, 981–993.
- Milne, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D. und Hess, J. L. (2002) MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol. Cell*, **10**, 1107–1117.
- Mitchell, B. S., Song, J. J., Johnson, E. E., Chen, E. und Dayton, J. S. (1993) Regulation of human deoxycytidine kinase expression. *Adv. Enzyme Regul.*, **33**, 61–68.
- Mittler, G., Kremmer, E., Timmers, H. T. M. und Meisterernst, M. (2001) Novel critical role of a human Mediator complex for basal RNA polymerase II transcription. *EMBO Rep.*, **2**, 808–813.
- Mizzen, C. A., Yang, X.-J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T., Nakatani, Y. und Allis, C. D. (1996) The TAF_{II}250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*, **87**, 1261–1270.
- Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A.-M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M.-A., Chauvin, J. P., Pierres, M. und He, H.-T. (1998) Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.*, **17**, 5334–5348.
- Moreland, R. J., Tirode, F., Yan, Q., Conaway, J. W., Egly, J.-M. und Conaway, R. G. (1999) A role for the TFIIH XPB DNA helicase in promoter escape by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, **274**, 22127–22130.
- Mowen, K. A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B. T., Shual, K., Herschman, H. R. und David, M. (2001) Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription. *Cell*, **104**, 731–741.

- Mueller, G. C. und Le Mathieu, M. (1966) Induction of ribonucleic acid synthesis in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 100–107.
- Myers, L. C. und Kornberg, R. D. (2000) Mediator of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 729–749.
- Müller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E. L., O'Connor, M. B., Kingston, R. E. und Simon, J. A. (2002) Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* polycomb group repressor complex. *Cell*, **111**, 197–208.
- Neely, K. E., Hassan, A. H., Wallberg, A. E., Steger, D. J., Cairns, B. R., Wright, A. P. und Workman, J. L. (1999) Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Mol. Cell*, **4**, 649–655.
- Neish, A. S., Anderson, S. F., Schlegel, B. P., Wei, W. und Parvin, J. D. (1998) Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 847–853.
- Ng, H. H. und Bird, A. (2000) Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 121–126.
- Ng, H. H., Robert, F., Young, R. A. und Struhl, K. (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol. Cell*, **11**, 709–719.
- Nguyen, V. T., Giannoni, F., Dubois, M.-F., Seo, S.-J., Vigneron, M., Kédinger, C. und Bensaude, O. (1996) In vivo degradation of RNA-Polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2924–2929.
- Nichols, R. C., Wang, X. W., Tang, J., Hamilton, J., High, F. A., Herschman, H. R. und Rigby, W. F. C. (2000) The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization. *Exp. Cell Res.*, **256**, 522–532.
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U.-M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E. und Kouzarides, T. (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, **412**, 561–565.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P. und Reinberg, D. (2002a) Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.*, **16**, 479–489.

- Nishioka, K., Rice, J. C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., Chuikov, S., Valenzuela, P., Tempst, P., Steward, R., Lis, J. T., Allis, C. D. und Reinberg, D. (2002b) PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. Cell*, **9**, 1201–1213.
- Noma, K.-I., Allis, C. D. und Grewal, S. I. S. (2001) Transition in distinct histone H3 methylation patterns are the heterochromatin boundaries. *Science*, **293**, 1150–1155.
- Näär, A., Lemon, B. D. und Tjian, R. (2001) Transcriptional coactivator complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 475–501.
- Ogryzko, V. V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R. L., Howard, T., Yang, X.-J., Howard, B. J., Qin, J. und Nakatani, Y. (1998) Histone-like TAFs within PCAF histone acetylase complex. *Cell*, **94**, 35–44.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. und Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**, 953–959.
- Ohkuma, Y. und Roeder, R. G. (1994) Regulation of TFIIH ATPase and kinase activities by TFIIIE during active initiation complex formation. *Nature*, **368**, 160–163.
- Olnes, M. I. und Kurl, R. N. (1994) Isolation of nuclear extracts from fragile cells: A simplified procedure applied to thymocytes. *Biotechniques*, **17**, 828–829.
- Osley, M. A. (1991) The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 827–861.
- Palancade, B., Dubois, M. F., Dahmus, M. E. und Bensaude, O. (2001) Transcription-independent RNA polymerase II dephosphorylation by the FCP1 carboxy-terminal domain phosphatase in *Xenopus laevis* early embryos. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6359–6368.
- Peterson, C. L. (2002) Chromatin remodeling enzymes: taming the machines. *EMBO Rep.*, **3**, 319–322.
- Peterson, C. L. und Workman, J. L. (2000) Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **10**, 187–192.
- Pham, A. D. und Sauer, F. (2000) Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAF_{II}250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science*, **289**, 2357–2360.

- Pinto, I., Ware, D. E. und Hampsey, M. (1992) The yeast *SUA7* gene encodes a homolog of human transcriptional factor TFIIB and is required for normal start site selection. *Cell*, **68**, 977–988.
- Plana, M., Viñas, O., De la Calle-Martin, O., Lozano, F., Inglés-Esteve, J., Romero, M., Alberola-Ila, J., Yagüe, J., Vilella, R. und Vives, J. (1991) Induction of interleukin 2 (IL 2) and interferon- γ and enhancement of IL 2 receptor expression by a CD26 monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.*, **21**, 1085–1088.
- Pogo, B. G. T., Allfrey, V. G. und Mirsky, A. E. (1966) RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 805–812.
- Poppema, S., Lai, R., Visser, L. und Yan, X. J. (1996) CD45 (leukocyte common antigen) expression in T and B lymphocyte subsets. *Leuk. Lymphoma*, **20**, 217–222.
- Rachez, C. und Freedman, L. P. (2001) Mediator complexes and transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 274–280.
- Rajpurohit, R., Paik, W. K. und Kim, S. (1994) Effect of enzymic methylation of heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 on its nucleic-acid binding and controlled proteolysis. *Biochem. J.*, **304**, 903–909.
- Rando, O. J., Zhao, K., Janmey, P. und Crabtree, G. R. (2002) Phosphatidylinositol-dependent actin filament binding by the SWI/SNF-like BAF chromatin remodeling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2824–2829.
- Rao, S., Procko, E. und Shannon, M. F. (2001) Chromatin remodeling, measured by a novel real-time polymerase chain reaction assay, across the proximal promoter region of the *IL-2* gene. *J. Immunol.*, **167**, 4494–4503.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D. und Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593–599.
- Reyes, J. C., Barra, J., Muchardt, C., Camus, A., Babinet, C. und Yaniv, M. (1998) Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2 α). *EMBO J.*, **17**, 6979–6991.
- Reyes, J. C., Muchardt, C. und Yaniv, M. (1997) Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J. Cell. Biol.*, **137**, 263–274.

- Rice, J. C., Nishioka, K., Sarma, K., Steward, R., Reinberg, D. und Allis, C. D. (2002) Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev.*, **16**, 2225–2230.
- Riggins, P. S. und Clipstone, N. A. (2001) T cell activation signals upregulate CBP-dependent transcriptional-activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 842–850.
- Roeder, R. G. (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 327–335.
- Rudd, C. E. (1999) Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell*, **96**, 5–8.
- Sagerström, C. G., Kerr, E. M., Allison, J. P. und Davis, M. M. (1993) Activation and differentiation requirements of primary T cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8987–8991.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487–491.
- Sambrook, S., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Bd. 3, Kap. B. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Auflage.
- Sanders, M. E., Makgoba, M. W. und Shaw, S. (1988) Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-induced and suppressor-induced subsets. *Immunol. Today*, **9**, 195–199.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C. T., Schreiber, S. L., Mellor, J. und Kouzarides, T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, **419**, 407–410.
- Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J. L., Harwood, J., Diffley, J. F. X. und Hammerschmidt, W. (2001) Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J.*, **20**, 4588–4602.
- Scorilas, A., Black, M. H., Talieri, M. und Diamandis, E. P. (2000) Genomic organization, physical mapping, and expression analysis of the human protein arginine methyltransferase 1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **278**, 349–359.

- Shen, E. C., Henry, F. M., Weiss, V. H., Valentini, S. R., Silver, P. A. und Lee, M. S. (1998) Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev.*, **12**, 679–691.
- Siebenlist, U., Durand, D. B., Bressler, P., Holbrook, N. J., Norris, C. A., Kamoun, M., Kant, J. A. und Crabtree, G. R. (1986) Promoter region of interleukin-2 gene undergoes chromatin structure changes and confers inducibility on chloramphenicol acetyltransferase gene during activation of T cells. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3042–3049.
- Sif, S., Saurin, A. J., Imbalzano, A. N. und Kingston, R. E. (2001) Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin-remodeling complexes. *Genes Dev.*, **15**, 603–618.
- Soutoglou, E. und Talianidis, I. (2002) Coordination of the PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science*, **295**, 1901–1904.
- Sterner, D. E., Wang, X., Bloom, M. H., Simon, G. M. und Berger, S. L. (2002) The SANT domain of Ada2 is required for normal acetylation of histones by the yeast SAGA complex. *J. Biol. Chem.*, **277**, 8178–8186.
- Stokes, D. G., Tartof, K. D. und Perry, R. P. (1996) CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7137–7142.
- Strahl, B. D. und Allis, C. D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41–45.
- Strahl, B. D., Ohba, R., Cook, R. G. und Allis, C. D. (1999) Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14967–14972.
- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M. und Ben-Neriah, Y. (1994) JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell*, **77**, 727–736.
- Sudarsanam, P., Iyer, V. R., Brown, P. O. und Winston, F. (2000) Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3364–3369.
- Sun, X., Zhang, Y., Cho, H., Rickert, P., Lees, E., Lane, W. und Reinberg, D. (1998) NAT, a human complex containing srp polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription. *Mol. Cell*, **2**, 213–222.
- Svejstrup, J. Q., Vichi, P. und Egly, J.-M. (1996) The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 346–350.

- Szabo, S. J., Gold, J. S., Murphy, T. L. und Murphy, K. M. (1993) Identification of *cis*-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells: Roles for NF-Y and NF-AT_c. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4793–4805.
- Taams, L. S., Smith, J., Rustin, M. H., Salmon, M., Poulter, L. W. und Akbar, A. N. (2001) Human anergic/suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur. J. Immunol.*, **31**, 1122–1131.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T. und Shinkai, Y. (2001) Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.*, **276**, 25309–25317.
- Tang, J., Gary, J. D., Clarke, S. und Herschman, H. R. (1998) PRMT3, a type I protein arginine *N*-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 16935–16945.
- Tang, J., Kao, P. N. und Herschman, H. R. (2000) Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3. *J. Biol. Chem.*, **275**, 19866–19876.
- Taplick, J., Kurtev, V., Lagger, G. und Seiser, C. (1998) Histone H4 acetylation during interleukin-2 stimulation of mouse T cells. *FEBS Lett.*, **436**, 349–352.
- Teague, T. K., Hildeman, D., Kedl, R. M., Mitchell, T., Rees, W., Schaefer, B. C., Bender, J., Kappler, J. und Marrack, P. (1999) Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12691–12696.
- Thomas, J. O. und Kornberg, R. D. (1978) The study of histone-histone associations by chemical cross-linking. *Meth. Cell Biol.*, **18**, 429–440.
- Thompson, C. M., Koleske, A. J., Chao, D. M. und Young, R. A. (1993) A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA binding-protein in yeast. *Cell*, **73**, 1361–1375.
- Tillyer, C. R. und Butterworth, P. H. W. (1978) The relationship between the activities of different pools of RNA polymerase I and II during PHA stimulation of human lymphocytes. *Nucl. Acids Res.*, **5**, 2099–2111.
- Tirode, F., Busso, D., Coin, F. und Egly, J.-M. (1999) Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol. Cell*, **3**, 87–95.

- Tokuyasu, K., Madden, S. C. und Zeldis, L. J. (1968) Fine structure alterations of interphase nuclei of lymphocytes stimulated to growth activity in vitro. *J. Cell Biol.*, **39**, 630–660.
- Tong, J. K., Hassig, C. A., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E. und Schreiber, S. L. (1998) Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodeling complex. *Nature*, **395**, 917–921.
- Tora, L. (2002) A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.*, **16**, 673–675.
- Tsukiyama, T. (2002) The *in vivo* functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 422–429.
- Vandenbark, A. A., Ferro, A. J. und Barney, C. L. (1980) Inhibition of lymphocyte transformation by a naturally occurring metabolite: 5'-methylthioadenosine. *Cell. Immunol.*, **49**, 26–33.
- Varga-Weisz, P. (2001) ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene*, **20**, 3076–3085.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A. und weitere Autoren (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304–1351.
- Verrijzer, C. P. (2001) Transcription factor TFIID – not so basal after all. *Science*, **293**, 2010–2011.
- Verrijzer, C. P., Yokomori, K., Chen, J.-L. und Tjian, R. (1994) *Drosophila* TAF_{II}150: similarity to yeast gene TSM-1 and specific binding to core promoter DNA. *Science*, **264**, 933–941.
- Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P. und Zhang, Y. (2001a) Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4 specific methyltransferase. *Mol. Cell*, **8**, 1207–1217.
- Wang, H., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J., Tempst, P. und Zhang, Y. (2001b) Methylation of histone 4 at arginine 3 facilitates transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*, **293**, 853–857.
- Wang, W., Chi, T., Xue, Y., Zhou, S., Kuo, A. und Crabtree, G. R. (1998) Architectural DNA binding by a high-mobility-group/kinesin-like subunit in mammalian SWI/SNF-related complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 492–498.

- Wang, W., Côté, J., Xue, Y., Zhou, S., Khavari, P. A., Biggar, S. R., Muchardt, C., Kalpana, G. V., Goff, S. P., Yaniv, M., Workman, J. L. und Crabtree, G. R. (1996) Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J.*, **15**, 5370–5382.
- van Wauwe, J. P., de Mey, J. R. und Goossens, J. G. (1980) OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J. Immunol.*, **124**, 2708–2713.
- Weil, P. A., Luse, D. S., Segall, J. und Roeder, R. G. (1979) Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell*, **18**, 469–484.
- Weiss, A. und Littman, D. R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, **76**, 263–274.
- Werten, S., Stelzer, G., Goppelt, A., Langen, F. M., Gros, P., Timmers, H. T. M., Van der Vliet, P. C. und Meisterernst, M. (1998) Interaction of PC4 with melted DNA inhibits transcription. *EMBO J.*, **17**, 5103–5111.
- West, A. G., Gaszner, M. und Felsenfeld, G. (2002) Insulators: Many functions, many mechanisms. *Genes Dev.*, **16**, 271–288.
- Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X. und Tora, L. (1998) Function of TAF_{II}-containing complex TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature*, **380**, 187–191.
- Willy, P. J., Kobayashi, R. und Kadonaga, J. T. (2000) A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science*, **290**, 982–985.
- Wilson, C. J., Chao, D. M., Imbalazano, A. N., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E. und Young, R. A. (1996) RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell*, **84**, 235–244.
- Wolos, J. A., Frondorf, K. A., Davis, G. F., Jarvi, E. T., McCarthy, J. R. und Bowlin, T. L. (1993) Selective inhibition of T cell activation by an inhibitor of S-adenosyl-L-homocystein hydrolase. *J. Immunol.*, **150**, 3264–3273.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. und Seed, B. (1998) Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity*, **8**, 723–732.
- Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B. M., Montminy, M. und Evans, R. M. (2001) A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science*, **294**, 2507–2511.

- Xue, Y., Wong, J., Moreno, G. T., Young, M. K., Côté, J. und Wang, W. (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell*, **2**, 851–861.
- Yamagoe, S., Kanno, T., Kanno, Y., Sasaki, S., Siegel, R. M., Lenardo, M. J., Humphrey, G., Wang, Y., Nakatani, Y., Howard, B. H. und Ozato, K. (2003) Interaction of histone acetylases and deacetylases in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 1025–1033.
- Yudkovsky, N., Ranish, J. A. und Hahn, S. (2000) A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature*, **408**, 225–229.
- Zegermann, P., Canas, B., Pappin, D. und Kouzarides, T. (2002) Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J. Biol. Chem.*, **277**, 11621–11624.
- Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.-P., Lane, W. S. und Reinberg, D. (1998) The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*, **95**, 279–289.
- Zhang, Y. und Reinberg, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.*, **15**, 2343–2360.
- Zhao, K., Wang, W., Rando, O. J., Xue, Y., Swiderek, K., Kuo, A. und Crabtree, G. R. (1998) Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell*, **95**, 625–636.

Lebenslauf

Name: Barbara Günzler
Geburtsdatum: 10. November 1973
Geburtsort: Kösching
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1980–1984 Grundschule Auf der Schanz, Ingolstadt
1984–1993 Katharinen-Gymnasium, Ingolstadt

Studium

1993–1999 Studium der Biochemie, Universität Bayreuth
1998–1999 Diplomarbeit bei Prof. Schmid am Lehrstuhl Biochemie der Universität Bayreuth zum Thema „Stabilisierung des Kälteschockproteins CspB aus *Bacillus subtilis* durch gerichtete Evolution“
1999–2003 Doktorandin am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München und an der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München

Praktikum

1997 Industriepraktikum bei der Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Penzberg

Auslandsaufenthalte

1990 Schüleraustausch mit dem Pedare Christian College, Adelaide, Australien
1997–1998 ERASMUS-Auslandssemester an der Université Denis-Diderot, Paris, Frankreich

Berufserfahrung

seit 2003 Freiberufliche klinische Monitorin