

Aus dem Adolf Butenandt Institut-Molekularbiologie  
der Universität München

Vorstand: Prof. Peter.B.Becker

**Charakterisierung von Chromatinfaktoren mit Hilfe von Antikörpern:  
Von der Fruchtfliege zum humanen Prostatakarzinom und zurück**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Philipp Greif**

aus

München

2005

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

Berichterstatter: Prof. Dr. P.B. Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Chr. Stief  
Prof. Dr. J. Diebold

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. A. Eberharter

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2005

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>Chromatin</b>	<b>5</b>
1.1.1	Chromatinstruktur und -regulation	5
1.1.2	Histonmodifizierung und DNA-Methylierung	8
1.1.3	ATP-abhängiges Chromatin Remodelling	11
1.1.4	Chromatin Remodelling Faktoren der ISWI-Familie	14
1.1.5	Toutatis - ein neues Protein der ACF1-WSTF-BAZ Familie	17
<b>1.2</b>	<b>Klinisch bedeutsame Störungen der Chromatinstruktur</b>	<b>20</b>
1.2.1	Genetische Syndrome und Chromatinfaktoren	20
1.2.2	Histonacetylierung und Leukämie	21
1.2.3	Die Rolle vom SWI/SNF Komplex bei Tumorerkrankungen	22
1.2.4	EZH2 und der Verlauf des Prostatakarzinoms	22
<b>1.3</b>	<b>Das Prostatakarzinom als Modell der Karzinogenese</b>	<b>24</b>
<b>1.4</b>	<b>Fragestellungen</b>	<b>29</b>
1.4.1	Expressionsniveau von ISWI im Prostatakarzinom	29
1.4.2	Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen Toutatis Protein	29
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>Teil A</b>	<b>30</b>
2.1.1	Tissue Microarray	30
2.1.2	Immunhistochemie	30
2.1.3	<i>Nuclear Texture Analysis</i>	31
<b>2.2</b>	<b>Teil B</b>	<b>32</b>
2.2.1	Standardmethoden der Molekularbiologie	32
2.2.2	Klonierung und Proteinexpression	32
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.2.4	Coomassiefärbung	34
2.2.5	Silberfärbung	34
2.2.6	Western Blots	34
2.2.7	Herstellung der Antikörper mit der Hybridom-Technik	35
2.2.8	Präparation von <i>Drosophila</i> Embryo Extrakt	35
2.2.9	Chromatographie	37
2.2.10	Massenspektrometrie	37
2.2.11	Immunfluoreszenz	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse Teil A - Expression der ATPase ISWI im Prostatakarzinom</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Tissue Microarray</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Klassische histologische Evaluation der Immunfärbung</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Quantitative Analyse der Immunfärbung</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse Teil B – Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen rekombinantes Toutatis Protein</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Klonierung von zwei DNA-Fragmenten</b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>Proteinexpression in E.coli</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>Herstellung und Selektion der monoklonalen Antikörper</b>	<b>50</b>
<b>4.4</b>	<b>Proteinreinigung aus Drosophila Embryos</b>	<b>52</b>

---

4.5	<b>Immunfluoreszenz</b> .....	58
5	<b>Diskussion</b> .....	59
5.1	<b>Welche Rolle spielt ISWI in den Zellen des Prostatakarzinoms?</b> .....	59
5.2	<b>Ist Toutatis Teil eines DNA-Reparatur-Komplexes?</b> .....	61
6	<b>Zusammenfassung</b> .....	65
7	<b>Anhang</b> .....	66
7.1	<b>Abkürzungen</b> .....	66
7.2	<b>Materialien</b> .....	67
7.2.1	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien .....	67
7.2.2	Vektoren und Konstrukte .....	68
7.2.3	Primer .....	68
7.2.4	Bakterienstämme .....	68
7.2.5	Zelllinien .....	68
7.2.6	Antikörper .....	69
7.2.7	Enzyme und Kits .....	69
7.2.8	Geräte .....	69
7.2.9	Software .....	71
7.3	<b>Proteinsequenzen</b> .....	72
7.4	<b>Literatur</b> .....	73
7.5	<b>Veröffentlichungen</b> .....	83
7.6	<b>Danksagung</b> .....	84
7.7	<b>Lebenslauf</b> .....	85

# 1 Einleitung

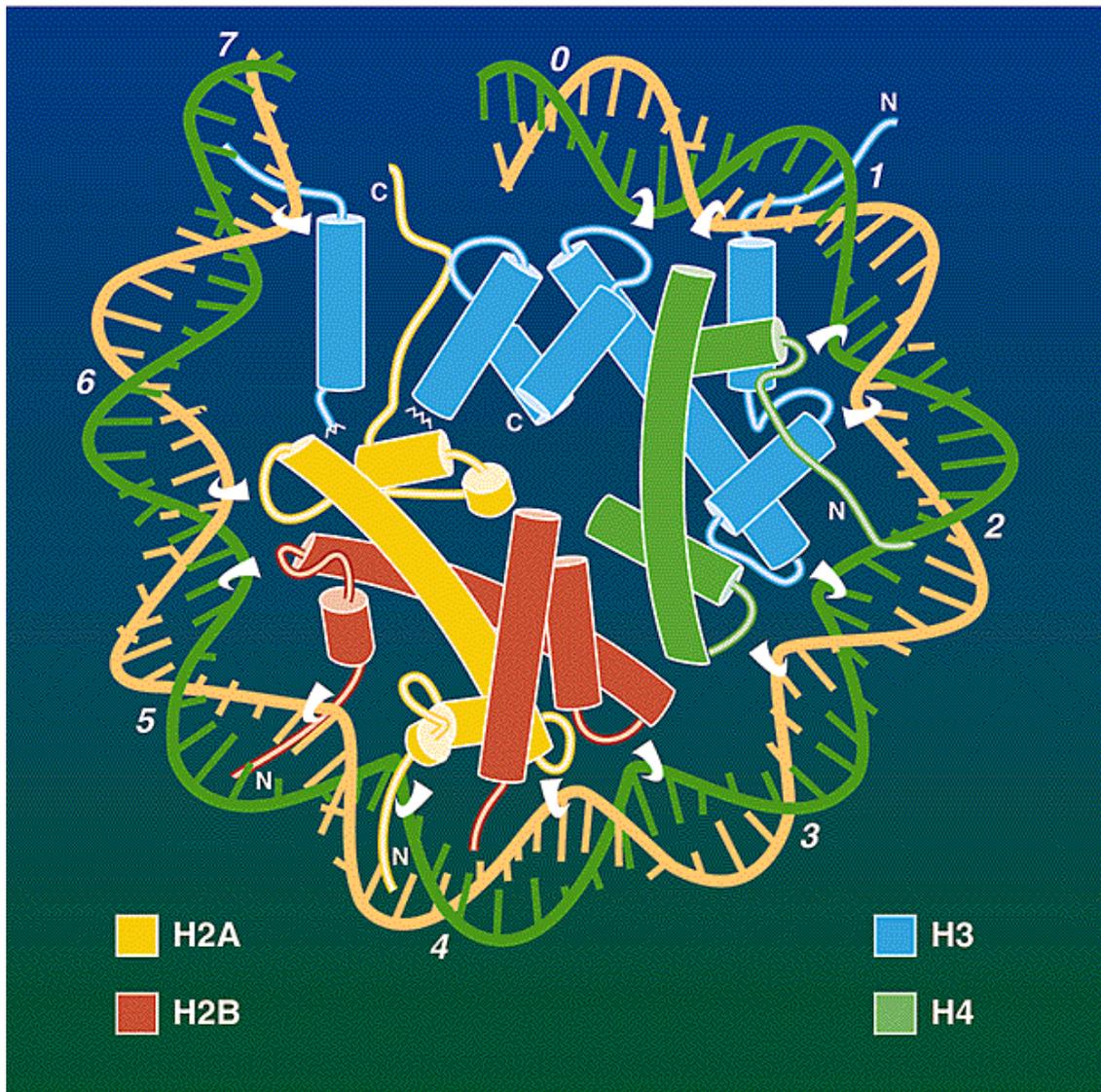
## 1.1 Chromatin

Um die aktuellen Grenzen der biomedizinischen Forschung zu überwinden, ist es unerlässlich, die molekulare Funktionsweise der Zellen bis ins Detail zu verstehen. Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms beispielsweise hat uns eine enorme Datenmenge geliefert. Wie diese genetischen Datenbank allerdings im lebenden Organismus verwaltet wird, verstehen wir noch kaum. Wir wissen zwar, dass die Basensequenz der DNA abgelesen und in Protein übersetzt werden kann. Da aber jede unserer Zellen den Bauplan des gesamten menschlichen Organismus in ihrem Kern beherbergt, liegt es nahe, dass nicht alle Gene gleichzeitig aktiv sind. Die Aktivierung eines bestimmten Gens zu einem exakten Zeitpunkt erfordert jedoch mehr Information als nur die Reihenfolge der Basenpaare. Ein Schlüssel zur Regulation der Erbinformation ist deren räumliche Komprimierung. Die Natur liefert unsere Erbanlagen gut verpackt als Chromatin.

### 1.1.1 Chromatinstruktur und -regulation

Die beim Menschen etwa 2 m lange DNA ist im Zellkern mit einem Durchmesser von etwa  $10^{-5}$  m untergebracht. Die Organisation der DNA in Form von Chromatin bei allen eukaryotischen Organismen macht diese Komprimierung möglich (1-3). Als erster hat der Zellbiologe W. Flemming den Begriff „Chromatin“ im Jahre 1880 verwendet, um auszudrücken, dass sich der Kerninhalt gut für die Darstellung im Lichtmikroskop anfärben lässt (*chromos*, griechisch für Farbe).

Die aktuelle Definition von Chromatin im Zeitalter der Biochemie umfasst einen Komplex aus DNA und Proteinen. Nukleosomen, die sich wiederholenden Grundelemente des Chromatins, bestehen aus rund 150 Basenpaaren DNA, die sich wie ein Faden um die spulenartig angeordneten Histonproteine windet (siehe Abb. 1). Das Histonoktamer bildet den Kern des Nukleosoms und besteht aus einem zentralen (H3/H4)<sub>2</sub> Tetramer und zwei peripheren H2A/H2B Dimeren (4-6). Alle Histone haben eine ähnliche Struktur mit jeweils einer annähernd globulären Domäne und einem flexiblen Arm am N-Terminus, den sogenannten *Histone Tails* gemeinsam. Die *Histone Tails* sind besonders reich an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin, die durch bestimmte Enzyme kovalent modifiziert werden können. Die Sequenzen der Histonproteine haben sich im Laufe der Evolution kaum

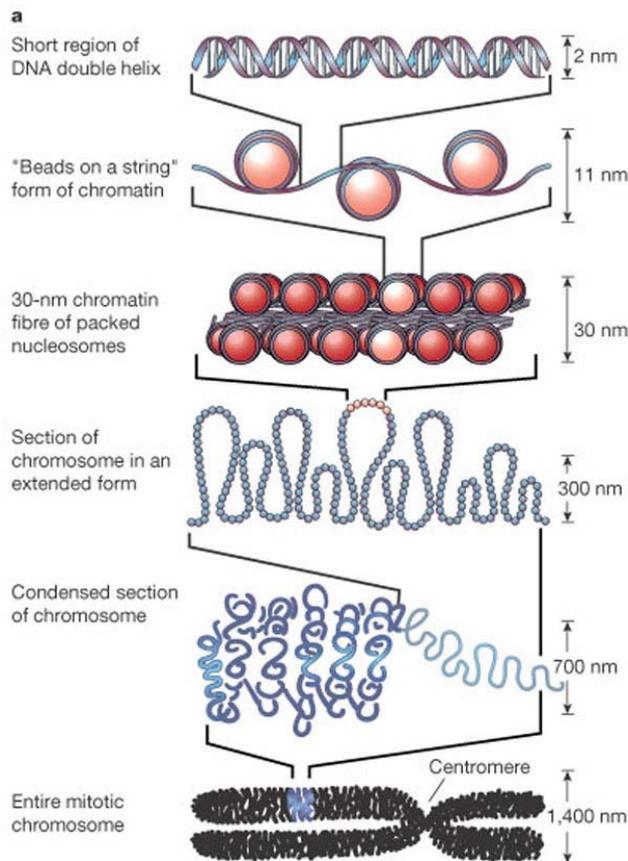


**Abb. 1** Die Struktur des Nucleosoms. Dieses Bild zeigt vereinfacht die Kristallstruktur des Histonoktamers mit einer DNA-Schleife von 73 Basenpaaren nach Luger et al (6). Die *Histone Tails* sind jeweils mit einem N markiert und die Wechselwirkung zwischen Histonen und DNA sind als weiße Haken dargestellt.

verändert und sind deshalb von der Hefe bis zum Menschen sehr ähnlich. Dies ist ein Hinweis, dass die Organisation des Chromatins bei allen höheren Organismen nach demselben Prinzip funktioniert.

Neben den Histonen sind auch Proteine des Transkriptionsapparates, wie Polymerasen und Transkriptionsfaktoren, mit dem Chromatin assoziiert. Eine weitere Klasse der Nicht-Histon Proteine ist die *High Mobility Group* (HMG). Die kleinen HMGB Proteine beispielsweise leisten mit ihrer Eigenschaft, DNA zu biegen, einen Beitrag zur Fluidität des Chromatins (7;8) Unter dem Elektronenmikroskop ähnelt das entfaltete Chromatin einer Perlenkette mit der sogenannten *Linker-DNA* zwischen den Nucleosomen (9). Der Durchmesser dieser Nucleosomenkette beträgt etwa 10nm. Unter physiologischen Bedingungen jedoch, im Inneren des Zellkerns, ist unter dem Elektronenmikroskop allerdings ein Durchmesser der

Chromatinfäden von 30 nm zu messen (10). Die 10 nm Nucleosomen-Faser muss also durch eine Faltstruktur höherer Ordnung weiter verpackt sein (siehe Abb. 2). Dabei sind sowohl die Kontakte zwischen benachbarten Nucleosomen als auch das *Linker* Histon H1, welches die Ein- und Austrittsstelle der 1,65 superhelikalen DNA-Windungen überdeckt, von Bedeutung. Der exakte Aufbau dieser Struktur höherer Ordnung ist jedoch noch umstritten (11;12).



**Abb. 2** Die verschiedenen Ebenen der Chromatinstruktur von der DNA zum Chromosom nach Felsenfeld&Groudine 2003 (10). Ganz oben sieht man die DNA als Doppelhelix. Darunter sieht man die DNA in Form von Nucleosomen auf Histonproteine (als rötliche Kugeln gezeichnet) gewickelt. Es folgen schematische Darstellungen der Chromatinstrukturen höherer Ordnung bis zum Chromosom ganz unten, das während der Mitose am stärksten kondensiert ist. Jede Ebene ist jeweils eine Ausschnittvergrößerung der darunter liegenden.

Nach dem elektronenmikroskopischen Bild unterscheidet man dicht gepacktes Heterochromatin, welches man als dunkle Bereiche besonders häufig an der Innenseite der Kernhülle findet, und helleres, aufgelockertes Euchromatin im Kerninnenraum. Während der Mitose wird das gesamte Chromatin zu einzelnen Chromosomen verdichtet. Im Gegensatz zum Euchromatin bleibt das Heterochromatin auch nach der Mitose, während der Interphase, kondensiert. Heute wissen wir, dass diese beiden verschiedenen Bereiche auch einen unterschiedlichen funktionalen Zustand aufweisen (13). Das Heterochromatin ist genarm und transkriptionell eher inaktiv. Euchromatin hingegen ist sehr reich an Genen, von denen sich viele in einem aktiven Zustand befinden.

Ein DNA-Abschnitt, der innerhalb eines Nucleosoms liegt, ist für Regulatorproteine schwer zugänglich. Deshalb ist

die biologische Funktion der Chromatinstruktur nicht nur die räumliche Komprimierung der DNA, sondern sie spielt auch bei fundamentalen, nukleären Prozessen, wie z.B. Replikation, Reparatur, Rekombination oder Genexpression, eine entscheidende, regulatorische Rolle. Um die hinderliche Natur des Chromatins bei diesen grundlegenden Prozessen zu überwinden, existieren mehrere verschiedene Chromatin modifizierende Proteinkomplexe im Zellkern. Solche Proteinkomplexe sind also der Schlüssel zur Erbinformation im Chromatin-Format.

Man kann sie nach ihren enzymatischen Eigenschaften den folgenden Funktionen zuordnen: Histonmodifikation, DNA-Methylierung und Chromatin *Remodelling*. Diese drei Mechanismen werden in der weiteren Einleitung erklärt, da die Untersuchung von zwei verschiedenen Proteinen, die bei der Chromatinregulation eine Rolle spielen, Gegenstand dieser Arbeit ist. Wenn wir verstehen wollen, wie die genetische Datenbank in lebenden Zellen des Menschen funktioniert, ist es unvermeidbar, die Regulation des Chromatins zu erforschen.

### 1.1.2 Histonmodifizierung und DNA-Methylierung

Die Regulation des Chromatins durch kovalente Veränderungen umfasst DNA-Methylierung und Histonmodifikationen. Diese Veränderungen können über die Mitose hinaus erhalten bleiben und werden auch unter dem Begriff Epigenetische Marker zusammengefasst. Im Allgemeinen beschreibt die Epigenetik vererbte Änderungen der Genaktivität, die nicht durch eine Änderung der Basensequenz der DNA erklärbar sind (14).

Sind z.B. die Cytosinbasen des Promotors eines Gens methyliert, so ist die Transkription des Gens nicht möglich. Auffälligerweise wurde bei den verschiedensten Krebserkrankungen eine übermäßige Methylierung bestimmter Tumorsuppressorgene festgestellt (15). Die DNA-Methylierung betrifft hauptsächlich sogenannte *CpG-Islands*, also Regionen, welche reich an den aufeinander folgenden Basen Cytosin und Guanin sind. Solche *CpG-Islands* befinden sich in der Regel im Bereich des Promotors am 5'-Ende eines Gens, dort wo Transkriptionsfaktoren mit der DNA interagieren. Die Enzyme, die für Übertragung von Methylgruppen auf die DNA verantwortlich sind, kann man nach ihrer Funktion unterscheiden. Die sogenannten *de novo* Methyltransferasen sorgen für die Entstehung bestimmter DNA-Methylierungsmuster während der Embryonalentwicklung (16;17). Die Erhaltung dieses Musters über die Zellteilung hinaus, also die Methylierung der im Lauf der Replikation synthetisierten DNA-Einzelstränge nach der Vorlage des ursprünglichen Doppelstrangs, wird von einer *Maintenance* Methyltransferase gewährleistet (18;19). Warum verhindert nun die DNA-Methylierung die Transkription? Zunächst können bestimmte Transkriptionsfaktoren nicht an den Promotor binden, wenn dieser methyliert ist (20). Hinzu kommt, dass Proteine mit einer *methyl-CpG-binding* Domäne (MBD) die Methylgruppe erkennen und dadurch Repressorkomplexe spezifisch rekrutiert werden (21). Derartige Repressorkomplexe haben oft die Eigenschaft, Acetylgruppen von den Histonproteinen zu

entfernen (Deacetylase Aktivität). Die MBD-Proteine schlagen also eine Brücke von der DNA-Methylierung zur Ebene der Histonmodifikationen.

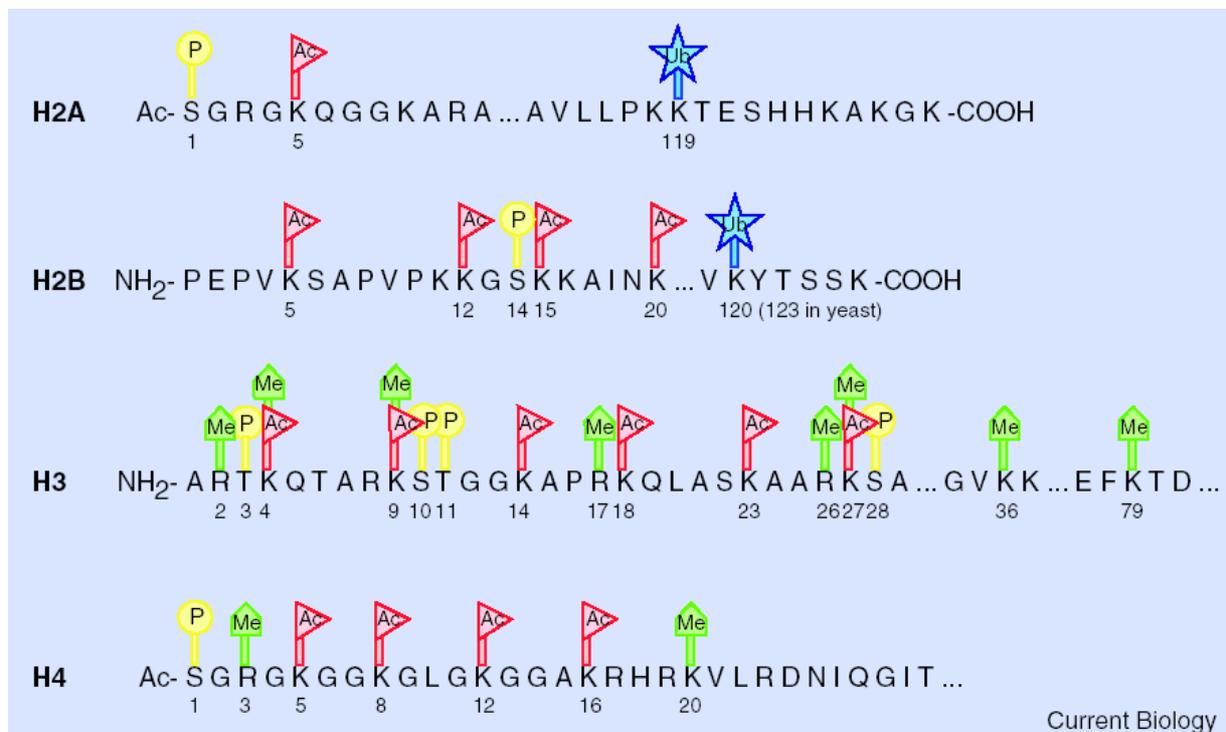
Unter Histonmodifikationen versteht man posttranslationale Modifikationen am N-Terminus der Histonproteine, an den sogenannten *Histone Tails*, die aus dem Nukleosom herausragen. Am besten untersucht sind die Modifikationen Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung (22). Acetylierung bedeutet Veränderung der normalerweise positiven Ladung einer Lysin-Seitengruppe durch die Übertragung einer negativ geladenen Acetylgruppe. Man ging zunächst davon aus, dass diese Ladungsänderung den Kontakt zwischen benachbarten Nukleosomen schwächt und damit eine Auflockerung der Chromatinstruktur verursacht (23). Unterstützt wird dieses Modell durch die Beobachtung, dass hyperacetyliertes Chromatin empfindlicher ist gegenüber dem Abbau durch das Enzym DNase I (24;25). Viele der Enzyme, die Acetylgruppen auf Histone übertragen, die als Histonacetyltransferasen (HATs) bezeichnet werden, sind als Co-Aktivatoren der Transkription identifiziert worden (26). Die Gegenspieler der HATs werden Histondeacetylasen (HDACs) genannt und sind mit der Repression der Transkription assoziiert (27). Man findet HDACs in einigen Repressorkomplexen, die spezifisch an methylierte DNA binden und auf diese Weise DNA-Methylierung und Histondeacetylierung zu konsekutiven Schritten der Inaktivierung eines Gens machen (28). Die Reihenfolge dieser beiden Schritte ist aber nicht immer klar.

Ladungsänderung allein kann allerdings nicht die Effekte der Histonacetylierung erklären. Wichtig ist auch die Funktion des acetylierten Lysins als Marker, der von regulierenden Faktoren erkannt wird. Die sogenannte Bromodomäne konnte als Bindungsmodul für diesen Marker identifiziert werden. Man findet sie in vielen Transkriptionsfaktoren wie z.B. den HATs Gcn5 und PCAF (29;30). Auch das in dieser Arbeit untersuchte Toutatis Protein enthält eine Bromodomäne (Abschnitt 1.1.5).

Während Histonphosphorylierung zusammen mit der Acetylierung synergistisch zu einer Öffnung des Chromatins führt, entsprechen umgekehrt deacetylierte bzw. dephosphorylierte Histone eher einer repressiven Chromatinstruktur. Die Histonmethylierung kann, je nach Position der methylierten Aminosäure, sowohl einen aktivierenden als auch einen hemmenden Effekt auf die Genexpression haben (31). Die Tatsache, dass die Aminosäuren Arginin und Lysin nicht nur einfach, sondern auch zweifach und Lysin sogar dreifach methyliert werden können, mit unterschiedlichen Folgen, verleiht diesem Mechanismus enorme Komplexität. Das Lysin 9 am Histon H3 (H3K9) beispielsweise kann sowohl methyliert als auch acetyliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Acetylierung von H3K9 die Transkription der DNA im Chromatinformat begünstigt (32;33). Das dreifach methylierte H3K9 dagegen wird

vom Heterochromatin Protein 1 (HP1) erkannt, das möglicherweise die Überführung des Chromatins in einen repressiven Zustand vermittelt (34;35). HP1 enthält eine Chromodomäne, welche an methyliertes H3K9 bindet (36). Diese konservierte Domäne findet man auch in anderen Chromatin assoziierten Proteinen, wobei für diesen Proteinabschnitt nicht nur Interaktion mit Histonen, sondern auch mit DNA und RNA beschrieben sind (37). Die Modifikation von H3K9, das sowohl acetyliert als auch methyliert werden kann, scheint also eine Schlüsselfunktion für die Regulation der Transkription zu haben.

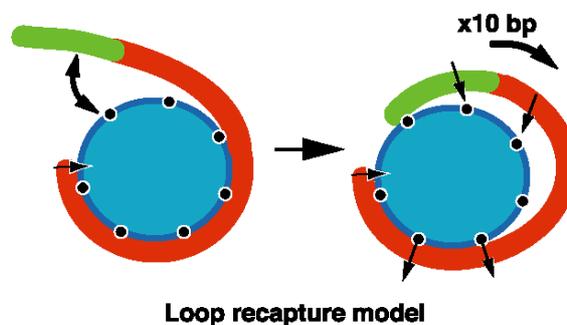
Wie viele der theoretisch möglichen Kombinationen von Histonmodifikationen tatsächlich existieren und welche Bedeutung sie für die Chromatinregulation haben ist noch ungewiss (Abb. 3). In einem Modell wird angenommen, dass es einen Histon-Code gibt, der epigenetische Information durch ein systematisches Modifikationsmuster verschlüsselt (38).



**Abb. 3** Mögliche kovalente Modifikationen an verschiedenen Positionen der *Histon Tails* nach Peterson&Laniel 2004 (39). Dargestellt sind Acetylierung (Ac), Methylierung (Me), Phosphorylierung (P) und Ubiquitylierung (Ub). Besonders wichtig für die Regulation der Transkription ist die Modifikation des Lysin 9 am Histon H3 (H3K9), das sowohl acetyliert als methyliert werden kann.

### 1.1.3 ATP-abhängiges Chromatin Remodelling

Angesichts der Tatsache, dass DNA und Histone durch eine große Anzahl von schwachen Interaktionen zusammengehalten werden ist es kaum verwunderlich, dass Energie benötigt wird um ein Nukleosom zu mobilisieren (6). Chromatin *Remodelling* Faktoren nutzen die Energie der ATP-Hydrolyse, um die Position der Nukleosomen so zu verändern, dass verschiedene Abschnitte der DNA für die Interaktion mit regulierenden Faktoren zugänglich werden (40-43). Die Leistung dieser molekularen Maschinen ermöglicht eine dynamische Struktur des Chromatins, wobei individuelle DNA-Sequenzen vorübergehend exponiert werden ohne jedoch die globale Kondensierung der DNA zu verändern. Was passiert dabei mit den Histonen? Eine Möglichkeit wäre, dass die Histonoktamere vollständig von der DNA abgelöst werden. Dafür sprechen z.B. Untersuchungen des PHO5-Promotors in Hefe, wobei während der Transkriptionsaktivierung die Histone zunächst hyperacetyliert werden und schließlich den Kontakt mit der Promotor-DNA verlieren (44-46). Eine andere Möglichkeit besteht in der Verschiebung des Histonoktamers entlang der DNA. Eine solche Schlitterbewegung bezeichnet man auch als Nukleosom-*Sliding*. Für diesen Mechanismus der Mobilisierung eines Nukleosoms gibt es unterschiedliche Hypothesen (40). Das *Twisting*-Modell schlägt vor, dass eine Drehbewegung der DNA für die Verschiebung des Nukleosoms verantwortlich ist. Eine Reihe von Experimenten sprechen gegen diese Vorstellung. So bleiben z.B. Einzelstrangbrüche der DNA ohne Folge für die Bewegung des Nukleosoms. Das aktuelle *Loop Recapture* Modell postuliert, dass die *Remodelling* Maschinen kleine DNA Schleifen in das Nukleosom „pumpen“. Während die Schleife um das Nukleosom wandert, rutscht das Histonoktamer in die entgegengesetzte Richtung (Abb. 4). Schließlich besteht auch noch die Möglichkeit, dass eine DNA Schleife lediglich von der Oberfläche des Nukleosoms gelöst und damit zugänglich wird, ohne jedoch die Position des Nukleosoms zu verändern (47).



**Abb. 4** Das *Loop Recapture* Modell nach Längst&Becker 2004 (40). Durch ATP-abhängiges Chromatin *Remodelling* wird eine DNA-Schleife von der Oberfläche des Nukleosoms gelöst und wandert um das Histonoktamer. Das Ergebnis ist eine Verschiebung des Nukleosoms entlang der DNA.

Chromatin *Remodelling* Faktoren sind Proteinkomplexe, die aus zwei bis zwölf Untereinheiten bestehen. Alle diese Faktoren enthalten eine katalytische Untereinheit aus der Swi2 Familie der ATPasen. Die Enzyme dieser großen Familie kann man nach ihrer Sequenz außerhalb der ATPase-Domäne klassifizieren. Die wichtigsten Gruppen nach dieser Einteilung sind SWI/SNF, ISWI, CHD und Ino80/SWR.

Zuerst wurde der SWI/SNF-Komplex in Hefezellen entdeckt (48). Der Name wurde von folgenden Eigenschaften des Komplexes abgeleitet: *Switch* steht für die Beteiligung am Wechsel des Paarungstyps und Mutationen der Suc2 Untereinheit führen zu einem Phänotyp, der als *Sucrose non fermenting* (SNF) bezeichnet wird. Alle ATPasen der SWI/SNF Familie haben ein Bromodomäne gemeinsam. Diese konservierte Domäne wurde ursprünglich in der ATPase Brahma in *Drosophila* beschrieben und ist in vielen Chromatin assoziierten Proteinen zu finden (49;50). Für die HATs PCAF und Gcn5 konnte gezeigt werden, dass die Bromodomäne spezifisch an acetylierte Histone bindet (29;30). In der Hefe ist der SWI/SNF Komplex mit der ATPase Swi2/Snf2 sowohl an der Aktivierung als auch an der Repression der Transkription beteiligt (51). Das *Drosophila* Homolog von Swi2/Snf2 ist das Brahma-Protein, welches ursprünglich als ein Gegenspieler der Polycomb Proteine bei der Regulation von homeotischen Genen entdeckt wurde (52). Homeotische Proteine sind Schlüsselregulatoren, die das Expressionsmuster vieler Gene über die Zellteilung hinaus konstant halten (53). Sie sind also wichtig für die Zelldifferenzierung. Ihre Fehlregulation wird unter anderem für die Entstehung von Krebszellen verantwortlich gemacht (54). Polycomb Proteine reprimieren und Trithorax Proteine aktivieren die homeotischen Gene. Brahma ist also ein Trithorax Protein. Beim Menschen hat Brahma zwei Homologe, die als katalytische Untereinheiten von *Remodelling* Komplexen bekannt sind: hBRG1 (Brahma Related Gene 1) und hBRM (Brahma). Obwohl sie sehr ähnlich sind, scheinen ihre biologischen Funktionen keineswegs redundant zu sein. Bei Experimenten mit *Knock Out* Mäusen stellte man fest, dass BRM entbehrlich ist. Die homozygoten Null-Mutanten von BRG1 hingegen sterben früh während ihrer Entwicklung und bei den Heterozygoten treten gehäuft Tumore auf (55). Weitere Zusammenhänge des SWI/SNF Komplexes mit Tumorerkrankungen werden in Abschnitt 1.2.3 beschrieben.

Das Vorhandensein von zwei SANT-like Domänen am C-Terminus, wobei eine davon wichtig für die Interaktion mit dem Nukleosom ist, charakterisiert die ISWI-Familie (*Imitation Switch*) der Chromatin *Remodelling* ATPasen (56). Da die humanen Isoformen von diesem Enzym im experimentellen Teil dieser Arbeit untersucht wurden, folgt eine ausführlichere Beschreibung der ISWI enthaltenden Faktoren im nächsten Abschnitt.

ATPasen der CHD-Familie (*Chromodomain-Helicase-DNA-binding*) erkennt man an der Chromodomäne, einem Proteinmodul mit einer Vielzahl von Interaktionspartnern, einschließlich DNA, Histonen und RNA (37). Die prominenteste dieser ATPasen ist Mi-2 und wurde ursprünglich als Autoantigen bei Dermatomyositis, einer schweren Autoimmunerkrankung identifiziert (57). Mi-2 interagiert mit Histondeacetylasen im NuRD-Komplex (*Nucleosome Remodelling histone Deacetylase*). Im Zusammenspiel mit dem Protein MBD2 (*methyl-CpG-binding domain Protein 2*) bindet, deacetyliert und remodelliert NuRD Nukleosomen, die methylierte DNA enthalten (28). An diesem Beispiel erkennt man sehr schön, durch welchen Mechanismus DNA-Methylierung die Inaktivierung eines Gens verursachen kann.

Mit der Identifizierung von Ino80 (*Inositol 80*) und SWR1 (*Swi2/Snf2-Related 1*) wurden der wachsenden Swi2-Großfamilie zwei neuartige ATPasen hinzugefügt. Ihre markante Eigenschaft ist eine eingeschobene Aminosäuresequenz innerhalb der konservierten ATPase Domäne. Komplexe mit einer solchen Art von ATPase konnten bisher nur aus Hefezellen gereinigt werden (58-60). Beide ATPasen interagieren mit Proteinen, die mit der Helicase RuvB in Bakterien verwandt sind, was auf die DNA Reparatur als mögliche Funktion dieser Komplexe hinweist. Darüber hinaus hat der SWR Komplex die Fähigkeit, das Histon H2A gegen eine Variante innerhalb eines Nukleosoms auszutauschen (60).

### 1.1.4 Chromatin Remodelling Faktoren der ISWI-Familie

Die flexible Anordnung der Nucleosomen wird von Chromatin Remodelling Komplexen gewährleistet. Eine Klasse dieser molekularen Remodelling Maschinen beinhalten die ATPase *Imitation Switch* (ISWI) als katalytische Untereinheit (Abb. 5). Bis heute sind in der Fruchtfliege *Drosophila* die drei verschiedenen Proteinkomplexe *Nucleosome Remodelling Factor* (NURF), *ATP-dependent Chromatin Assembly and Remodelling Factor* (ACF) und *Chromatin Accessibility Complex* (CHRAC), mit dem Bestandteil ISWI beschrieben (62-64).

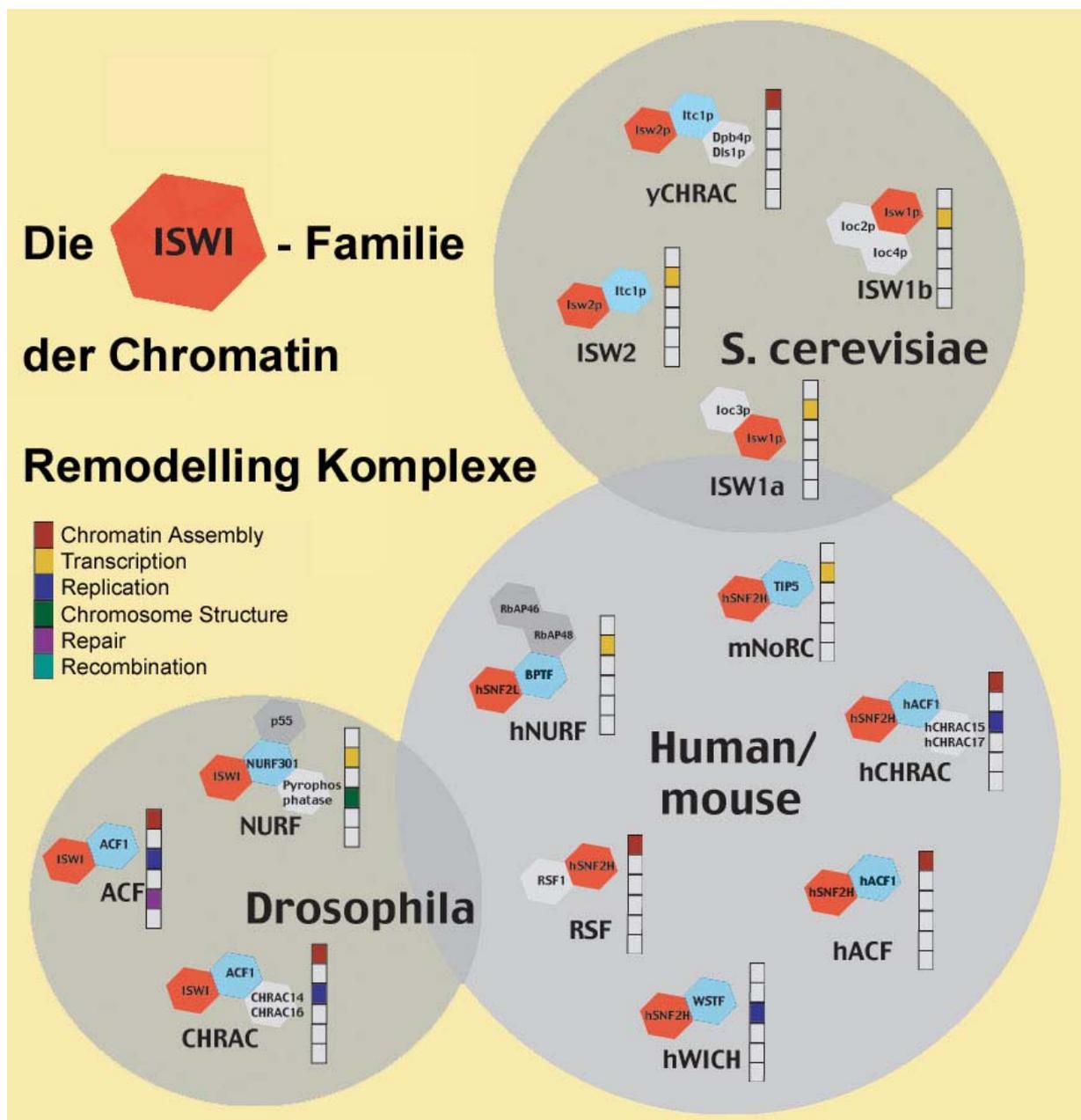


Abb. 5 zeigt die Chromatin Remodelling Komplexe der ISWI-Familie in den Organismen Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), Säugetier (Mensch/Maus) und Hefe (*S.cerevisiae*), modifiziert nach Eberharter&Becker 2004 (61). Die bekannten Funktionen der einzelnen Proteinkomplexe sind durch einen Farb-Code angegeben.

Alle drei Komplexe haben die Fähigkeit, Nukleosomen auf benachbarte DNA-Segmente zu verschieben. Vergleichbare Komplexe existieren beim Menschen. Sie enthalten Homologe von ISWI, die beiden Isoformen Snf2H und Snf2L. Studien ihrer unterschiedlichen Expressionsmuster zeigen, dass Snf2H überwiegend in proliferierenden Zellpopulationen vorhanden ist, während Snf2L vorherrschend in endgültig differenzierten Zellen exprimiert wird (65). Mäuse bei denen das *snf2h*-Gen ausgeschaltet wurde sind nicht lebensfähig und sterben in einem frühen Stadium der Embryonalentwicklung (66). Eine immer größer werdende Familie von Snf2H beinhaltenen Faktoren ist bekannt. Dagegen wurde bisher nur ein Snf2L assoziierter Komplex, nämlich hNURF, identifiziert. hNURF ist im Gehirn angereichert und spielt eine Schlüsselrolle bei der neuronalen Differenzierung (67). Trotz der soeben beschriebenen Zuordnung der beiden Isoformen zu verschiedenen Komplexen, findet man in einer geringen Anzahl der hauptsächlich Snf2H beinhaltenen Komplexe, wie hCHRAC oder hACF, Snf2L anstatt Snf2H (68).

Die bisher bekannten Funktionen von ISWI assoziierten Faktoren sind vielfältig. In *Drosophila* verursachen dominant negative Mutationen von ISWI strukturelle Veränderungen im männlichen X-Chromosom (69). Dieser als *X-Chromosome Puffing* bezeichnete Phänotyp deutet an, dass ISWI für die Erhaltung von Chromatinstrukturen höherer Ordnung verantwortlich ist. Immunfärbungen von polytären Chromosomen, die aus *Drosophila* Speicheldrüsen präpariert werden, zeigten, dass ISWI und die RNA Polymerase II weitgehend an unterschiedlichen Stellen lokalisiert sind (69). Die RNA Polymerase II ist mit transkriptionell aktivem Chromatin assoziiert, also findet man ISWI eher in transkriptionell nicht aktivem Chromatin. Deshalb wird dem Protein eine Rolle als Repressor zugeschrieben. Es gibt weitere Ergebnisse, die zu dieser Rolle passen. Durch das Zusammenspiel von Snf2H und Tip5 im *Nucleolar Remodelling Complex* (NoRC) werden HDACs und DNA-Methyltransferasen rekrutiert, was zur Inaktivierung der ribosomalen Gene im Nukleolus führt (70;71). Im Gegensatz zu der vorgeschlagen Repressorfunktion stehen Untersuchungen des dNURF Komplexes. Zuerst wurde gezeigt, dass dNURF durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Aktivierung der Transkription *in vitro* ermöglicht (63;72). Später stellte sich bei *in vivo* Versuchen heraus, dass die Transkription von bestimmten Hitzeschock-Genen nach Mutation von NURF301, also der regulatorischen Untereinheit des dNURF Komplexes, dramatisch eingeschränkt ist (73). Aus Hefezellen gibt es Daten, die zeigen das zwei verschiedene Komplexe, nämlich Isw1a und Isw1b, zusammen den Ablauf der Transkription koordinieren. (74). Darüber hinaus hat ISWI auch eine Aufgabe bei der Zellteilung, denn ein Snf2H-Acf1 Komplex wird während der DNA Replikation zum

pericentromeren Heterochromatin rekrutiert (75). Die Abwesenheit von jeweils einem der beiden Proteine verlangsamt den Ablauf der Replikation erheblich.

Zusammengefasst können ATPasen der ISWI-Familie nicht einer einzigen Funktion zugeordnet werden, sondern es sind eher die interagierenden Proteine, die den biologischen Kontext bestimmen. Ob ISWI-Proteine von Bedeutung für die Entstehung und das Wachstum von Tumoren sind, ist allerdings noch kaum untersucht worden. Es gibt lediglich Hinweise, dass Snf2H in proliferierenden Leukämiezellen exprimiert wird und eine experimentelle Induktion der Differenzierung die Expression drosselt (76). Umgekehrt kann auch ein Ausschalten der Snf2H Expression die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen anhalten (66). Im Kontext der beschriebenen Rolle von Snf2H bei der Replikation sowie der bevorzugten Expression des Proteins in proliferierenden Zellen wäre es interessant, die Expression von ISWI in Karzinomzellen zu untersuchen.

In den *Remodelling* Komplexen interagiert ISWI mit regulatorischen Untereinheiten. Sie sind homolog zu Acf1 und können ebenfalls zu einer Proteinfamilie zusammengefasst werden (Abb. 5). Im nächsten Abschnitt wird ein neues Mitglied dieser Familie, das Gegenstand des experimentellen Teils der Arbeit ist, vorgestellt.

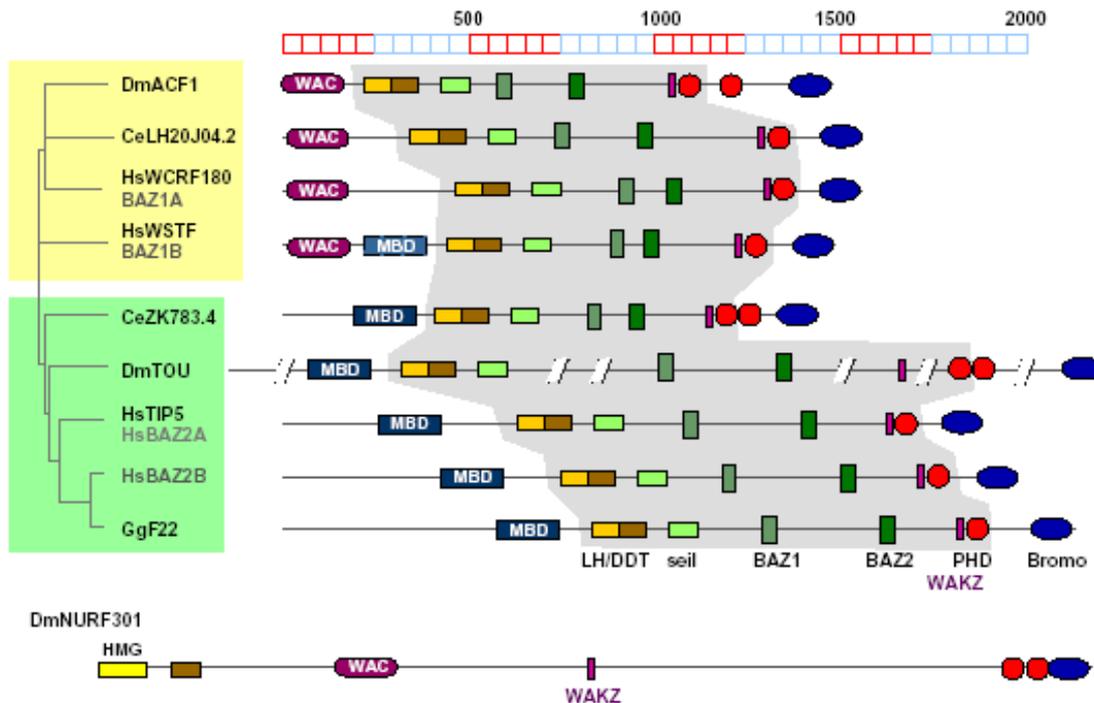
### 1.1.5 Toutatis - ein neues Protein der Acf1-WSTF-BAZ Familie

Nachdem alle Zellen eines Organismus die gleiche genetische Information enthalten, die einzelnen Zellen aber völlig unterschiedliche Aufgaben erfüllen, ist es offensichtlich, dass in differenzierten Zellpopulationen jeweils verschiedene Gene aktiv sein müssen. Das Genexpressionsmuster einer Zelle kann von homeotischen Proteinen über die Zellteilung hinaus aufrechterhalten werden. Diese Proteine sind also Schlüsselregulatoren und wurden ursprünglich in *Drosophila* entdeckt, weil sie für die richtige Identität der Körpersegmente verantwortlich sind. Ihre Funktionsweise ist aber auch beim Menschen sehr ähnlich geblieben. Sie werden durch zwei Proteingruppen reguliert: Proteine der Polycomb-Gruppe sind Repressoren und Proteine der Trithorax-Gruppe funktionieren als Aktivatoren der homeotischen Gene (77). Es gibt viele Hinweise, dass Proteine dieser beiden Gruppen ihre Aktivator- bzw. Repressorfunktion durch Veränderungen des Chromatins ausüben. So ist z.B. die Chromatin *Remodelling* ATPase Brahma ein Mitglied der Trithorax-Gruppe und die Histonmethyltransferase *Enhancer of Zeste* gehört zu den Polycomb-Proteinen (34;52). Im Zusammenspiel etablieren sie eine Art zelluläres Gedächtnis, das die Genexpression auf der Ebene des Chromatins steuert und nach der Zellteilung an die Tochterzellen vererbt wird. Dieses zelluläre Gedächtnis erlaubt nicht nur eine Entwicklung des Körpers nach einem gesunden Bauplan, sondern es verhindert auch im späteren Leben die Entstehung von Krebszellen (54). Eine besondere Eigenschaft von Trithorax-Genen ist, dass sie den Phänotyp von Mutationen ihrer Gegenspieler aus der Polycomb-Gruppe supprimieren, wenn sie selbst mutiert werden. Die meisten Trithorax Gene, wie z.B. das bereits erwähnte Brahma, wurden auf Grund dieser Qualität entdeckt (52). Eines der in *Drosophila* etwa 40 bekannten Polycomb Gene ist *polyhomeotic* (*ph*). Mutationen im *ph*-Gen verursachen einen speziellen Phänotyp bei den männlichen Fliegen, der sich durch zusätzliche kammartige Häkchen an den Hinterbeinen bemerkbar macht und deshalb als *Extra-Sex-Combs* bezeichnet wird. Bei einem genetischen *Screening* nach Suppressoren des *Extra-Sex-Combs*-Phänotyps in *Drosophila* konnte das Gen *toutatis* (*tou*) identifiziert werden (78). Somit ist *tou* ein Gegenspieler von *polyhomeotic* und ein neues Mitglied der Trithorax Gruppe.

Durch den Vergleich der Sequenz von Tou mit anderen Proteinen kann es in eine Familie von Proteinen mit ähnlicher Domänen-Architektur eingeordnet werden. Alle Proteine der Acf1-WSTF-BAZ-Familie haben eine Bromodomäne, einen PHD-Finger (*Plant Homeodomain*) gemeinsam (Abb. 6). PHD-Finger werden durch Zink-Ionen stabilisiert und sind als Module der Proteininteraktion in vielen Chromatin assoziierten Proteinen bekannt (79). Für Bromodomänen konnte am Beispiel von zwei HATs gezeigt werden, dass sie acetylierte

ACF1 - WSTF - BAZ family

Approximate cartoon



Raa 19-FEB-2002

Abb. 6 Der Vergleich von Aminosäuresequenzen erlaubt Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Proteinen zu erkennen. Alle Proteine der Acf1-WSTF-BAZ-Familie haben eine Bromo-Domäne, PHD-Finger und weitere noch nicht funktionell charakterisierte Domänen gemeinsam. Solche Homologien sind durch Symbole entsprechend der Position innerhalb des linearen, nicht gefalteten Proteins dargestellt. Die Länge der Proteine liegt (vgl. Maßstab) zwischen 1500 und 3000 Aminosäuren. Diese annähernd maßstabgerechte Darstellung (*Approximate Cartoon*) wurde von R. Aasland im Jahr 2002 erstellt.

Histone binden (50). Nach weiteren homologen Abschnitten, deren Funktionen noch wenig bekannt sind, kann man die Mitglieder der Proteinfamilie in Untergruppen einteilen. Die Familienmitglieder Acf1, WSTF, Tip5 und NURF301 sind regulatorische Untereinheiten von Chromatin *Remodelling* Komplexen der ISWI-Familie. Zusammen mit der ATPase ISWI und weiteren Interaktionspartnern bilden sie die Komplexe ACF, CHRAC, WICH (WSTF-ISWI Chromatin Remodelling Complex), NoRC (Nucleolar Remodelling Complex), und NURF (63;64;68;72;80). Außerdem ist ein Komplex, der WSTF zusammen mit der ATPase BRG1 (Brahma Related Gene 1) beinhaltet, gereinigt worden (81). Der Einfluss der regulatorischen Untereinheiten auf das Nukleosomen *Remodelling* durch die Komplexe ist enorm. Acf1 z.B. macht die Bewegung der Nukleosomen nicht nur effizienter, sondern die Zugabe von Acf1 zur ATPase ISWI ändert auch die Richtung der Bewegung, im Vergleich zur Mobilisierung durch ISWI allein (82). Dabei spielen Kontakte zwischen dem PHD-Finger von Acf1 und Histonen eine wichtige Rolle (83).

Alle bisher charakterisierten Proteine der Acf1-WSTF-BAZ-Familie sind Bestandteile von Nukleosom *Remodelling* Komplexen. Die enge Verwandtschaft von Toutatis mit den Proteinen dieser Familie zusammen mit der genetischen Zuordnung zur Trithorax Gruppe ergibt einen starken Hinweis, dass dieses Protein Bestandteil eines Chromatin *Remodelling* Komplexes sein könnte. Um diese Hypothese zu bestätigen, ist eine biochemische Charakterisierung von Toutatis und seinen Interaktionspartnern notwendig.

## 1.2 Klinisch bedeutsame Störungen der Chromatinstruktur

Das Erstellen von Gen-Expressionsprofilen von Tumorzellen ist eine vielversprechende Hilfe für schwierige klinische Entscheidungen, denn das Expressionsniveau bestimmter Proteine, wie z.B. BRG1 beim Lungenkrebs, hat prognostischen Wert für Tumorerkrankungen (84;85). Chromatin assoziierte Faktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung (86). Deshalb sind diese Proteine nicht nur für die Diagnostik interessant, sondern bieten auch Angriffsfläche für die Therapie. Außerdem können immer mehr Erbkrankheiten auf eine gestörte Regulation des Chromatins zurückgeführt werden (87).

### 1.2.1 Genetische Syndrome und Chromatinfaktoren

Eine zunehmende Anzahl angeborener Syndrome und Erbkrankheiten sind auf Mutationen in Genen, die Chromatinfaktoren kodieren, zurückzuführen. Seit der Identifikation des *X-linked Alpha Thalassemia Mental Retardation* (ATRX) Gens im Jahr 1995, konnte es zahlreichen Formen der X-chromosomalen mentalen Retardierung als Krankheitsgen zugeordnet werden (88). Dazu gehören unter anderem das ATRX-Syndrom, Carpenter-Syndrom, Juberg-Marsidi-Syndrom, Smith-Fineman-Myers-Syndrom sowie die X-assoziierte mentale Retardierung mit spastischer Paraplegie. Das ATRX-Protein ist homolog zu ATPasen der SNF2 Familie, seine Funktion ist jedoch noch nicht geklärt. Bei Patienten mit Mutationen im *ATRX*-Gen findet man veränderte DNA-Methylierungsmuster bestimmter Zielgene. Da ATRX keine DNA-Methyltransferaseaktivität hat, bleibt es bisher unklar, auf welchem Wege diese Veränderungen entstehen. Die Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen ist ein wahrscheinlicher Mechanismus. Es gibt ein ähnliches Beispiel aus der Botanik: Die Abwesenheit der Chromatin *Remodelling* ATPase DDM 1 (*Deficient in DNA-Methylation*) führt zum Verlust von DNA-Methylierung bei Pflanzen (89).

Bei anderen Syndromen wurde die Ursache für veränderte DNA-Methylierung bereits gefunden. Ein Beispiel dafür ist das ICF-Syndrom, welches durch Immunschwäche und faziale Anomalien geprägt ist (87). Als Ursache wurde ein Defekt des *DNMT3B*-Gens, das eine DNA-Methyltransferase kodiert, gefunden. Daraus folgt eine ungenügende Methylierung der DNA in der Nähe der Centromere, wo die Schwesterchromatiden eines Chromosoms aneinandergeheftet sind. Die Hypomethylierung dieser Region führt zur Auflockerung des Chromatins und deshalb zur Instabilität. Das fatale Ergebnis ist ein Auseinanderbrechen einiger Chromosomen, vor allem in Lymphozyten, wodurch sich die Immunschwäche erklären lässt.

Das Rett-Syndrom ist mit einer Inzidenz von 1:10.000 weiblichen Geburten eine der häufigsten Ursachen von geistiger Behinderung bei Frauen (90). Nach einer normalen Entwicklung während des ersten Lebensjahres folgt eine Regression, gekennzeichnet durch Sprachverlust und Bewegungsstörungen. Diese Krankheit konnte auf eine Mutation des X-chromosomalen *MeCP2* (*Methyl-CpG-binding Protein 2*) Gens zurückgeführt werden (91). MeCP2 gehört zur bereits erwähnten Gruppe der MBD-Proteine, welche das Bindeglied zwischen methylierter DNA und Repression der Transkription durch Histondeacetylierung darstellen (92). Die Fehlfunktion von MeCP2 beim Rett-Syndrom führt anscheinend zu fehlender Repression bestimmter Gene und somit zu einem falschen Genexpressionsmuster. Dafür spricht, dass in Zellen von Patientinnen mit Rett-Syndrom eine Histonhyperacetylierung nachgewiesen werden konnte (93). Da MeCP2 normalerweise in Nervenzellen besonders angereichert ist, lässt sich ein Zusammenhang zwischen den neurologischen Symptomen und der Mutation beim Rett-Syndrom herstellen (94).

Auch das Versagen von histonmodifizierenden Enzymen kann zu Erbkrankheiten führen. Mutationen der Histonacetyltransferase CBP (*CREB-binding Protein*) liegen dem Rubinstein-Taybi-Syndrom zu Grunde, wobei typische kardiale und Gesichtsanomalien auftreten (95). Der Austausch einer einzigen Aminosäure von CBP kann genügen, um die enzymatische Aktivität zu zerstören. CBP ist ein Coaktivator für viele Transkriptionsfaktoren. Welche davon mit den Symptomen der Rubinstein-Taybi-Krankheit zusammenhängen ist noch unbekannt.

### 1.2.2 Histonacetylierung und Leukämie

Einige Arten von Leukämie können ursächlich auf chromosomale Translokationen zurückgeführt werden. Als Folge der Translokationen werden Fusionsproteine exprimiert. Bei der akuten myeloischen Leukämie sowie einer gemischten Form der Leukämie ist die Histonacetyltransferase CBP Teil eines solchen Fusionsproteins und folglich in seiner Funktion verändert (96;97). Durch die Translokation gelangt CBP unter die Kontrolle von anderen Promotoren und es kommt somit zu einer veränderten Histonacetylierung. Das Resultat ist eine dramatische Fehlregulation der Transkription.

Leukämie assoziierte Fusionsproteine können auch durch Interaktion mit Histondeacetylasen (HDACs) die Transkription einzelner Gene vermindern (98). Ebenso kann das Onkoprotein Laz 3 bei Non-Hodgkin-Lymphomen HDACs rekrutieren (99). Wenn die Inaktivierung durch HDACs die Gene von Wachstumsregulatoren betrifft, kann dies eine maligne Transformation der Zellen verursachen. Eine pharmakologische Hemmung dieser Enzyme mit Substanzen wie

Trichostatin A oder Butyratderivaten kann zur Wachstumshemmung oder Apoptose führen. In klinischen Phase I und II Studien konnte bereits eine gute Verträglichkeit und Wirksamkeit einiger dieser Substanzen nachgewiesen werden (100). Somit ist die Hemmung von HDACs ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Medikamente gegen Krebserkrankungen. Weitere Studien sind notwendig, um HDAC Inhibitoren in der Tumorthherapie zu etablieren.

### 1.2.3 Die Rolle vom SWI/SNF Komplex bei Tumorerkrankungen

Mutationen im Gen der katalytischen Untereinheit von SWI/SNF Chromatin *Remodelling* Komplexen, BRG1, sind in verschiedenen humanen Tumorzelllinien nachgewiesen (101). Es ist auch bekannt, dass die Aktivität der SWI/SNF Komplexe für die Funktion der Wachstumsregulatoren pRB, p53 und BRCA1 notwendig ist (102). Für diesen Zusammenhang spricht auch die Beobachtung, dass die Abwesenheit der ATPase Brahma zur Zellproliferation führt und die maligne Transformation im Maus-Modell begünstigt (103;104). Auch der Androgenrezeptor, ein Angriffspunkt der Hormontherapie beim Prostatakrebs, benötigt SWI/SNF Aktivität (105). Darüber hinaus stellte man in Gewebeproben von Lungenkrebspatienten fest, dass ein Verlust von Brahma und BRG1 in den Tumorzellen mit einem kurzen Überleben der Patienten vergesellschaftet ist (106). Diese Erkenntnisse erlauben nicht nur die Verwendung von BRG1 und Brahma als Prognosefaktoren, sondern weisen auch auf eine mögliche Funktion der Proteine als Tumorsuppressoren hin. SNF5/INI1 ist eine weitere Untereinheit des SWI/SNF Komplexes. In rhabdoiden Tumoren, einer bösartigen Form von Weichteiltumoren, die vor allem bei Kindern auftritt, wurden als erstes Mutationen von SNF5/INI1 gefunden (107). Derartige Mutationen gibt es auch bei Leukämie und Keimbahnmutationen dieses Gens erhöhen das Risiko, an verschiedenen Tumoren zu erkranken (108;109). Die Stabilität des Komplexes sowie die Expression der anderen Untereinheiten bleiben dabei unverändert. Fehlende Transkription von Wachstumsregulatoren durch die Inaktivität von SNF5/INI1 wird in diesem Zusammenhang als mögliche Ursache der Krebsentstehung diskutiert.

### 1.2.4 EZH2 und der Verlauf des Prostatakarzinoms

Die nach dem Lungenkrebs zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache bei Männern in Westeuropa und den USA ist das Prostatakarzinom (110). Die Überexpression des Proteins *Enhancer of Zeste Homologue 2* (EZH2) korreliert beim Prostatakarzinom mit einer

schlechten Prognose (111). Ein vergleichbarer Zusammenhang wurde auch für Brustkrebs gefunden (112). Das EZH2-homologe Protein in *Drosophila*, E(z) konnte kürzlich als eine Histonmethyltransferase identifiziert werden (34). Dieses Protein gehört zur Gruppe der Polycomb Proteine, welche eine hemmende Wirkung auf homeotische Gene haben, die das Genexpressionsmuster einer Zelle regulieren. Eine Überexpression von EZH2 kann somit die Repression einer Vielzahl von Genen zur Folge haben. Die Hemmung der Transkription von Genen, die einem Fortschreiten der Krebserkrankung entgegenwirken, ist in diesem Zusammenhang ein möglicher Mechanismus der Metastasierung (113).

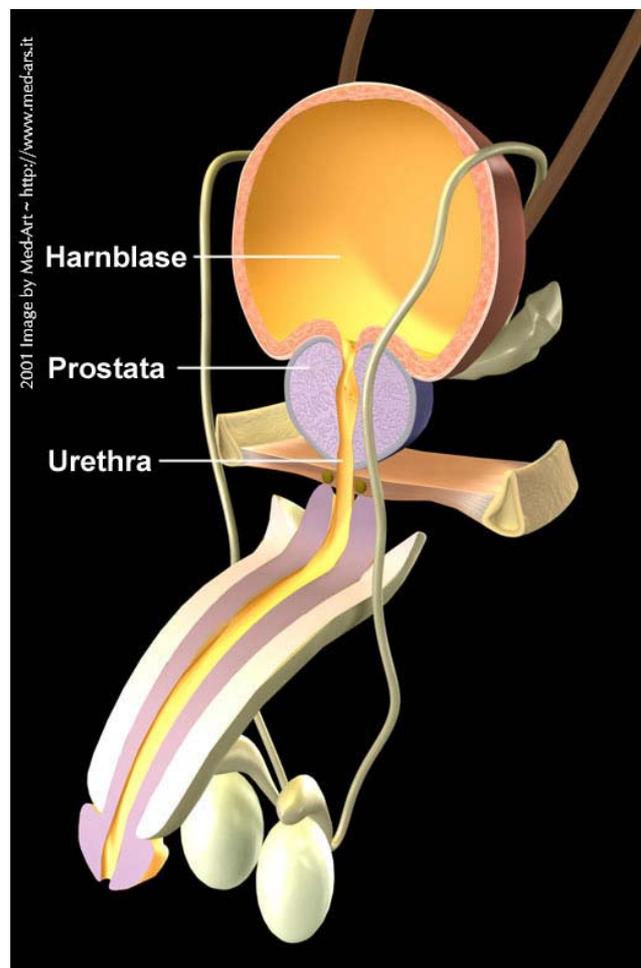
Diese Beispiele zeigen, dass bereits die Fehlfunktion einzelner Faktoren für die komplexe Chromatinregulation fatale Folgen haben kann. Nur ein besseres Verständnis dieser fundamentalen Vorgänge in allen eukaryotischen Zellen macht Hoffnung auf neue Therapiemöglichkeiten für bisher kaum heilbare Krankheiten.

### 1.3 Das Prostatakarzinom als Modell der Karzinogenese

Die Prostata ist eine exokrine Drüse des männlichen Urogenitaltrakts, die sich unterhalb der Harnblase befindet und von der Urethra durchzogen wird. Ihre physiologische Funktion besteht in der Produktion eines alkalischen Sekrets, welches etwa ein Drittel des Ejakulats darstellt und Glykoproteine sowie sogenannte Prostatosomen enthält. Prostatosomen sind membranöse Vesikel voller Enzyme, die unter anderem aktivierend auf Spermien wirken (114).

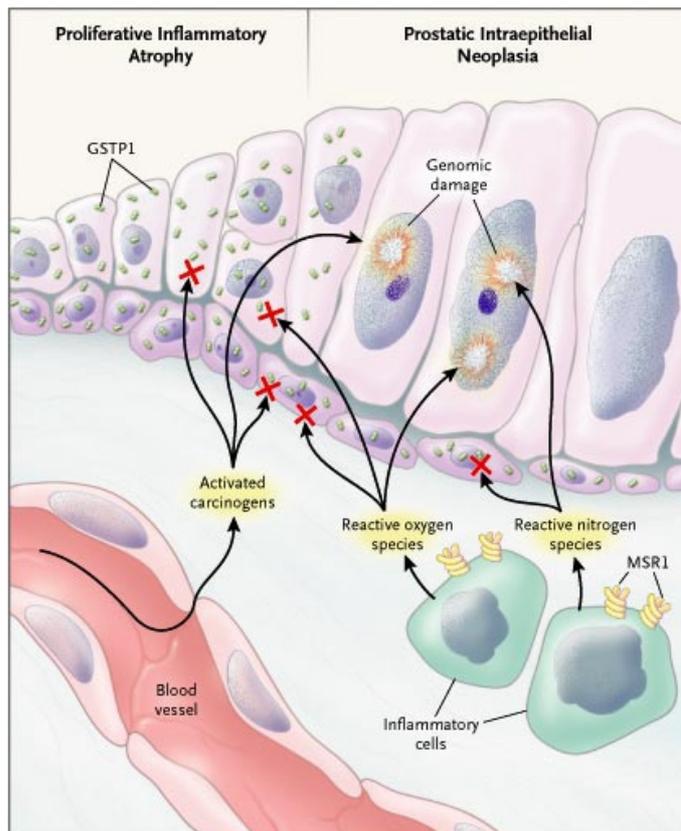
Die Prostata ist das bei Männern am zweithäufigsten von Krebs betroffene Organ. Epidemiologische Studien in den USA zeigten, dass aktuell einer von sechs Männern an einem Prostatakarzinom (PCa) erkrankt und einer von 30 Männern am metastasierenden PCa verstirbt (115). Ursächlich spielen sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle bei

dieser Erkrankung. Die Inzidenz und die Mortalität sind hoch in Westeuropa und Nordamerika, am höchsten bei Afroamerikanern, niedrig hingegen in Asien (116). Das Risiko der Asiaten, an Prostatakrebs zu erkranken, steigt allerdings wenn sie nach Nordamerika immigrieren, was auf den Einfluss der Lebensgewohnheiten und Umweltfaktoren hinweist (117). Eine Ernährung, die reich an tierischen Fetten ist, erhöht das Risiko. Eine gemüse- und obstreiche Ernährung dagegen scheint vor Prostatakrebs zu schützen, was wahrscheinlich auf den höheren Gehalt an Antioxidantien zurückzuführen ist (110). Kürzlich wurde in einer Studie gezeigt, dass eine hohe Ejakulationsfrequenz mit einem geringen Prostatakrebsrisiko korreliert (118). Eine stärkere Wirkung von kanzerogenen Substanzen im Sekret bei einer längeren Verweildauer in den Drüsen erscheint in diesem Zusammenhang als plausible



**Abb. 7 Die anatomische Lokalisation der Prostata: Die Drüse befindet sich direkt unter der Harnblase und wird von der Urethra durchzogen (modifiziert nach [www.med-ars.it](http://www.med-ars.it) 2001)**

Ursache. Vor 3 Jahren zeigte eine Studie aus dem österreichischen Bundesland Tirol, dass durch Screening-Untersuchungen des Prostata spezifischen Antigens (PSA) das PCa früh diagnostiziert werden kann, was eine deutliche Senkung der Mortalität ermöglicht (121;122). Das PSA ist ein Glykoprotein, das in den *Ductuli prostatici* der Prostata produziert wird und als Tumormarker verwendet wird. Der Blutwert kann aber auch bei gutartigen Veränderungen oder Entzündungen der Prostata erhöht sein. Häufig wechselnde Sexualpartner und sexuell



**Abb. 8** Die Progression der proliferativ-entzündlichen Atrophie (*Proliferative Inflammatory Atrophy*) zur intraepithelialen Neoplasie (*Prostatic Intraepithelial Neoplasia*) unter Berücksichtigung der Rolle von GSTP1 und MSR1 nach Nelson et al 2003. Das antioxidative GSTP1 kann alimentäre Karzinogene und oxidativen Stress durch Entzündungszellen, die den Rezeptor MSR1 tragen, abfangen (Das Abfangen der Oxidantien bzw. Karzinogene wird durch ein rotes Kreuz dargestellt). GSTP1 ist in über 90% der Prostatakarzinome durch Hypermethylierung inaktiviert (119;120). Zellen ohne die protektive Wirkung von GSTP1 erleiden eine Schädigung des Genoms. Mutationen im MSR1-Gen beeinträchtigen die Funktion der Makrophagen und verlängern somit den oxidativen Stress bei Entzündungen (110).

verschiedenen Liganden wie z.B. bakteriellen Mukopolysacchariden herstellt (siehe Abb. 8). Eine vermehrte Anzahl von Makrophagen findet man bei Entzündungen der Prostata. Die Stimulation des Androgen Rezeptors fördert die Progression des PCa, weshalb auch

übertragbare Infektionen erhöhen das Risiko an einem PCa zu erkranken (123;124). Da verschiedene Infektionen die Entstehung eines PCa begünstigen, nimmt man an, dass dabei eher die Entzündung als die Infektion selbst eine ursächliche Rolle spielt. Dafür spricht auch, dass zwei der Kandidatengene des hereditären PCa eine Funktion für die Infektionsabwehr haben. Diese Kandidatengene für das hereditäre PCa kodieren die Latente Endoribonuklease (RNASEL), den *Macrophage-Scavenger Receptor 1* (MSR1) und den Androgen-Rezeptor (110;125;126). RNASEL spielt vermutlich eine Rolle bei der interferonabhängigen Degradation von viraler RNA und somit bei der Abwehr von viralen Infektionen. MSR1 ist ein Membranrezeptor auf der Oberfläche von Makrophagen, der den Kontakt mit einer Reihe von

Antiandrogene für die Therapie der Krankheit verwendet werden (127). Mutationen im Gen des Androgen Rezeptors können dessen Funktion verstärken, was das Auftreten und Fortschreiten von Prostatakrebs begünstigt. Andererseits kommt es häufig im Verlauf der Krankheit zu einer Androgenresistenz, was die Prognose dramatisch verschlechtert, da folglich die Therapie mit Antiandrogenen nicht mehr wirksam ist.

Mutationen von RNASEL und MSR1 wurden auch beim sporadisch auftretenden PCa gefunden (128). Auch epigenetische Veränderungen des sporadischen PCa konnten festgestellt werden: In über 90% der Fälle des PCa ist die Promotorregion des Gens der Gluthation-S-Transferase der Pi-Klasse (GSTP1) hypermethyliert, was eine Blockierung der Transkription verursacht (119;120). GSTP1 ist ein sogenanntes „*Care Taker*“-Gen, welches ein Enzym kodiert, das freie Radikale abfängt und die DNA vor Schäden durch Oxidation schützt (siehe Abb. 8). Ein weiteres Gen, das in etwa 50% der PCa Fälle hypermethyliert ist, kodiert das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, welches wichtig für das normale Zellwachstum ist (129;130). Somatische Mutationen findet man beim PCa, unter anderem in den Genen *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN) und *Cyclin-dependant Kinase Inhibitor* (CDKN1B) (131-133). Beide zugehörigen Proteine spielen eine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus, insbesondere bei der Apoptoseinduktion und werden im PCa vermindert

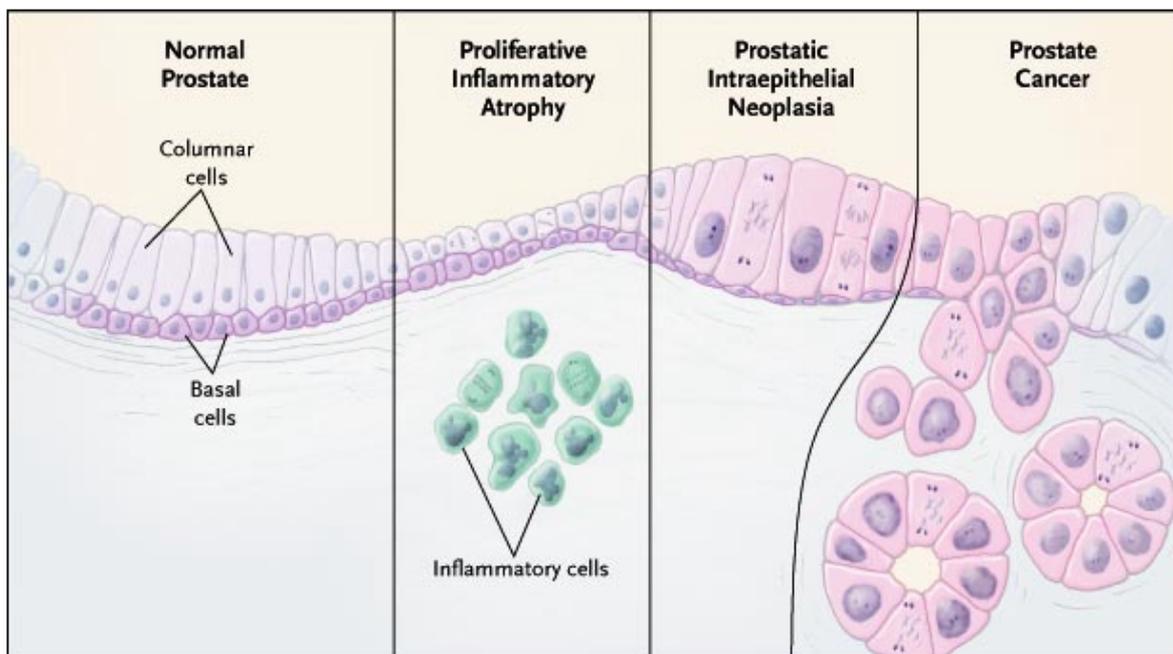
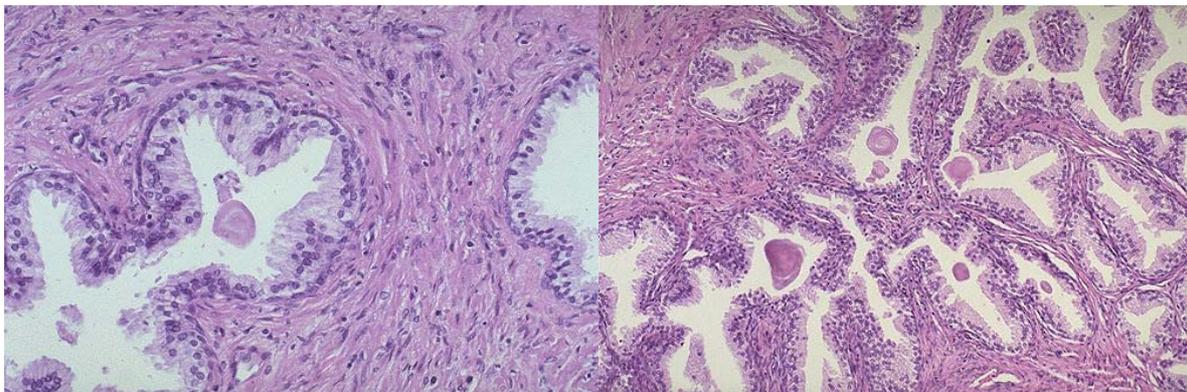


Abb. 9 zeigt die Karzinogenese des PCa nach Nelson et al 2003. Von links nach rechts sieht man normales Epithel der Prostata mit hochprismatischen Zellen (*Columnar Cells*) und Basalzellen (*Basal cells*), daneben die proliferative entzündliche Atrophie (*Proliferative Inflammatory Atrophy*) mit verkleinerten, atrophischen Epithelzellen. Weiter rechts ist die Intraepitheliale Neoplasie (*Prostatic Intraepithelial Neoplasia*) mit erhöhter Anzahl von Mitosen und vergrößerten Zellkernen dargestellt. Sobald die malignen Zellen die Basalmembran durchbrechen und infiltrierend wachsen spricht man von einem Prostatakarzinom (*Prostate Cancer*).

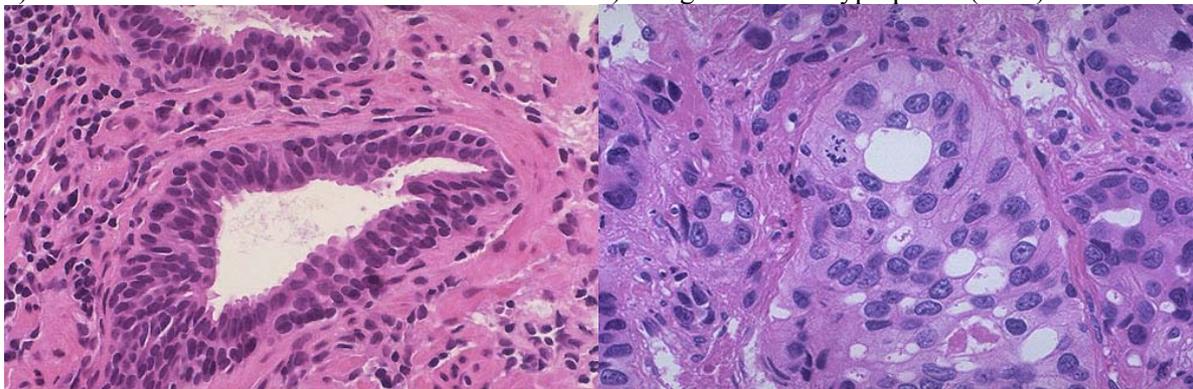
exprimiert. Erhöht hingegen ist die Expression von EZH2 (siehe 1.2.4) und dem „Care Taker“-Protein Alpha-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR) (134;135).

Zusammengefasst existiert für die Entstehung des PCa folgendes Modell (Abb. 8 und 9): Zunächst führen entzündliche Veränderungen zur Atrophie der Epithelzellen und zur Freisetzung von freien Radikalen. Diese Radikale bewirken zusammen mit Karzinogenen, die mit der Nahrung aufgenommen wurden, eine Schädigung des Genoms der Zellen. So entstehen Mutationen in Genen, die das Wachstum der Zellen kontrollieren und es kommt zu einem bösartigen, unkontrollierten Wachstum.



a) normale Prostata

b) benigne Prostatahyperplasie (BPH)



c) Intraepitheliale Neoplasie der Prostata (PIN)

d) niedrig differenziertes Prostakarzinom (PCa)

**Abb. 10** Histologische Bilder der Prostata nach Standardfärbung mit Hämatoxylin und Eosin aus dem *Web Pathology Laboratory* der University of Utah: a) Normale Prostata mit Stroma zwischen den Drüsen und *Corpora amylacea* im Lumen bei hoher Vergrößerung b) Benigne Prostatahyperplasie (BPH) mit proliferierenden Drüsen bei mittlerer Vergrößerung c) Intraepitheliale Neoplasie der Prostata (PIN) mit stratifiziertem Epithel und hyperchromatischen Zellkernen bei hoher Vergrößerung d) Niedrig differenziertes Prostatakarzinom (PCa) mit diffuser Drüsenarchitektur und atypischen Mitosen bei hoher Vergrößerung.

Ein Vergleich von gutartigem und bösartigem Gewebe der Prostata ist durch die histologischen Bilder in Abb. 10 veranschaulicht. In der normalen Prostata-drüse sieht man ein hochprismatisches, einschichtiges Epithel. Im Lumen der Drüse findet man regelmäßig Aggregate des Sekrets, die sogenannten *Corpora amylacea*, welche ein Anhalt für die

Gutartigkeit des Gewebes sind. Die Drüsen sind in Bindegewebe eingebettet. Bei der benignen Prostatahyperplasie proliferieren sowohl die Drüsen als auch das Stroma, was zu einem knotigen Umbau des Organs führt (136). Diese gutartige Erkrankung ist sehr häufig bei älteren Männern und wird durch eine Kompression der Urethra symptomatisch. Eine Vorstufe des PCa ist die Intraepitheliale Neoplasie (PIN) (137;138). Charakteristisch für PIN sind die Stratifizierung des Epithels mit mehreren Zellschichten und das Vorhandensein hyperchromatischer Zellkerne. Die Basalmembran ist bei PIN jedoch immer intakt. Diese Eigenschaften werden auch unter dem Begriff dysplastische Drüsen zusammengefasst. Je nach Ausprägung der histologischen Merkmale unterscheidet man *Low* und *High Grade* PIN (LPIN und HPIN). Rückblickend wurde bei vielen Patienten, bereits zehn oder mehr Jahre bevor es zum Auftreten eines PCa kam, PIN nachgewiesen. Bei etwa 50% der Patienten, bei denen man HPIN in einer Biopsie findet, ist auch PCa vorhanden. Urologen diskutieren momentan, ob eine medikamentöse Behandlung von HPIN sinnvoll ist, um das PCa-Risiko zu reduzieren bzw. eine operative Entfernung des Karzinoms zu vermeiden (139;140). Das histologische Bild des PCa ist durch eine durchbrochene Basalmembran und invasives Wachstum gekennzeichnet (141). Die Zellkerne sind hyperchromatisch und pleomorph. Je nachdem, wie stark die Anaplasie der Zellen und wie geordnet die Drüsenarchitektur ist, spricht man von einem hoch oder niedrig differenzierten PCa. Weitere Kriterien der Malignität sind prominente Nucleoli sowie atypische Mitosen. Diese Kriterien werden für verschiedene histologische *Grading*-Systeme verwendet, die prognostischen Wert besitzen (142). Problematisch beim *Tumour Grading* sind die subjektiven Unterschiede der Beobachtung des Gewebes durch verschiedene Pathologen. Auch mit Hilfe der Immunfärbung des Gewebes mit Antikörpern gegen Proteine, wie z.B. der Proliferationsmarker Ki-67 oder das Antiapoptose-Protein BCL2, können prognostische Aussagen getroffen werden (143). Zytometrische Analysen des DNA-Gehalts der Tumorzellen und morphologische Studien der Nuclei sind ebenfalls von Bedeutung für die Prognose der Patienten mit PCa (144). Diese molekularen Methoden werden noch kaum für die Routine-Diagnostik verwendet, sind aber äußerst vielversprechend und werden in Zukunft an Bedeutung gewinnen (84). Die Technik der Immunfärbung des Prostatagewebes wird auch in der Grundlagenforschung verwendet, um das Expressionsniveau bestimmter Proteine in den verschiedenen Stadien der Karzinogenese zu messen. Solche Studien fördern das Verständnis der molekularen Vorgänge der Krebsentstehung und schaffen die Voraussetzung für die Verbesserung von Diagnose und Therapie.

## **1.4 Fragestellungen**

Es wurden verschiedene Fragestellungen durch zwei voneinander unabhängige experimentelle Projekte bearbeitet. Beide Aufgaben befassen sich mit der Charakterisierung von Chromatin *Remodelling* Faktoren mit Hilfe von Antikörpern gegen diese Proteine.

### **1.4.1 Expressionsniveau von ISWI im Prostatakarzinom**

Die in Abschnitt 1.1.4 beschriebene ATPase ISWI ist bisher noch nicht in Karzinomzellen untersucht worden. Polyklonale ISWI-Antikörper, die beide Isoformen Snf2H und Snf2L erkennen, wurden in Gewebeproben von Patienten mit Prostatakarzinomen, sowie von Patienten mit gutartigen Prostatatumoren getestet. Die immunhistochemische Färbung wurde quantitativ verglichen. Die Experimente wurden im Department of Pathology an der Queens University Belfast / Nordirland durchgeführt.

### **1.4.2 Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen Toutatis Protein**

Ein Fragment des in 1.1.5 beschriebenen Toutatis Proteins wurde exprimiert und für die Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet. Nach Etablierung von Protokollen für Western-Blots und Immunfluoreszenz wurden diese Antikörper an *Drosophila*-Zellkernextrakten und *Drosophila*-Schneider-Zellen getestet. Solche Antikörper sind ein molekulares Werkzeug, um neue Proteinkomplexe zu reinigen und zu charakterisieren. Dieses Teilprojekt wurde am Adolf Butenandt Institut / Lehrstuhl für Molekularbiologie der Universität München bearbeitet.

## 2 Methoden

### 2.1 Teil A

#### 2.1.1 Tissue Microarray

Ein *Tissue Microarray* (TMA) wurde aus 276 Gewebeproben, welche aus 118 Paraffinblöcken mit Formalin-fixiertem Prostatagewebe entnommen wurden, zusammengestellt. Alle Gewebeproben wurden von R. Montironi (Universität Ancona) zur Verfügung gestellt. Die Zusammenstellung des *Microarrays* erfolgte durch Mahmoud El Far (Queens University Belfast). Die 118 Paraffinblöcke enthielten 20 Fälle von Benigner Prostata Hyperplasie (BPH), 20 Fälle von *Low Grade Intraepithelial Neoplasia* (LPIN), 18 Fälle von *High Grade Intraepithelial Neoplasia* (HPIN), 40 Fälle vom gut differenzierten Adenokarzinom der Prostata (*well* PCa) und 20 Fälle vom niedrig differenzierten Adenokarzinom der Prostata (*poor* PCa). Die Feinschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und die relevanten Bereiche des Gewebes wurden von einem erfahrenen Uro-Pathologen (R. Montironi) markiert. Jeweils zwei *Tissue Cores*, mit einem Durchmesser von 0.6 mm, wurden aus dem markierten Bereich des jeweiligen Paraffinblocks entnommen. Dafür wurde ein *Beecher Manual Arrayer* verwendet (Beecher Instruments Inc, USA). Die *Tissue Cores* wurden gemeinsam in einen neuen Paraffinblock gebettet und ein 5µm Schnitt wurde für die pathologische Begutachtung angefertigt. Die abschließende Beurteilung des TMA ergab, dass er 60 *Cores* mit BPH, 10 *Cores* mit LPIN, 10 *Cores* mit HPIN und 115 *Cores* mit PCa, wovon 55 *Cores* einem *Gleason Grade 3*, 35 *Cores* einen *Gleason Grade 4*, 21 *Cores* einem *Gleason Grade 3&4* und 5 *Cores* einem *Gleason Grade 5* entsprachen. Beim *Gleason Grading* wird die Malignität an Hand der Drüsenarchitektur beurteilt (145).

#### 2.1.2 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemische Färbung (IHC) wurde ein affinitätsgereinigter, polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Snf2L verwendet (146). Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Patrick Varga Weisz (Marie Curie Research Institute, Surrey) zur Verfügung gestellt. Vor der IHC wurden die Feinschnitte des TMA rehydriert und mit Citrat-Puffer (pH 6.0) bei 750 W in einem Microwellenherd für 22 min vorbehandelt. Der Primärantikörper wurde 1:500 in TBS-Puffer verdünnt und übernacht bei 4<sup>0</sup>C inkubiert. Für die Nachweisreaktion wurde das Envision Peroxidase System (Dako Corporation) nach

Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und mit Deckgläsern bedeckt.

### **2.1.3 Nuclear Texture Analysis**

Für die digitale Bildanalyse der IHC-Reaktion wurden ein kalibriertes Video-Mikroskop, bestehend aus einem Leitz Lichtmikroskop (Orthoplan), einer Sony 3 Chip CCD IRIS Modell DXC-930P Farb-Videokamera und der regulierbaren Lichtquelle Kingshill CL6123, verwendet.

Kalibrierung: Die Kalibrierung wurde mit Koehler Beleuchtung durchgeführt. Da Veränderungen der Beleuchtungsintensität die *Texture Analysis* beeinträchtigen, wurde eine eigene Software entwickelt (Jim Diamond, Queens University Belfast), um die Beleuchtungsstärke bei jeder Kalibrierung auf den gleichen Wert zu setzen. Für ein transparentes, leeres Blickfeld auf dem Objektträger wurde der mittlere Pixel-Grauwert auf 250 geeicht. Dies verbesserte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von verschiedenen Sitzungen, zwischen denen die Geräte ein- und ausgeschaltet wurden. Bei der Kalibrierung für die Messung der optischen Dichte (OD) wurden Filter im Bereich von OD 0.1 bis OD 3.0 eingesetzt. Nach Einsatz des jeweiligen OD-Filters in den Lichtstrahl wurden Bilder aufgezeichnet und für die Erstellung einer Graustufen-, OD-Kalibrationskurve mit dem Programm KS400 (Imaging Associates Ltd. UK) verwendet. Es wurde auch ein Bild ohne Filter für die Hintergrund-Subtraktion aufgenommen.

Digitale Bildaufnahmen: Alle Zellbilder wurden mit einem x100 Objektiv und Öl-Immersion aufgenommen. Anschließend wurden Artefakte und Schatteneffekte durch eine Hintergrund-Subtraktion mit einem KS400-Macro entfernt.

Zellkernsegmentierung und *Texture Analysis*: Die Nuclei wurden mit Hilfe von Software, die in KS400-Macro-Sprache geschrieben wurde (Jim Diamond, Queens University Belfast), manuell segmentiert. Dabei wurden die Grenzen des Zellkerns per Hand (Computer-Maus) gezeichnet. Nur glanduläre Nuclei wurden ausgewählt. Sie wurden als nukleäre Zelldatei für die anschließende *Texture Analysis* abgespeichert. Für jeden segmentierten Nukleus wurde der Blaukanal des RGB-Bildes mit Hilfe von *Texture Analysis* Software, die an der Queens University of Belfast entwickelt wurde (Peter Hamilton & Jim Diamond), ausgewertet. Insgesamt 65 *Texture Features*, basierend auf der Dichte und der Verteilung der Immunfärbung, wurden von jedem Nukleus extrahiert. Diese waren geometrische, diskrete, densitometrische und Harrick-*Features*. Die extrahierten *Features* wurden in eine Excel-Datei geschrieben. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS (Version

10/11) durchgeführt. Die Bilder in Abb. 12 wurden mit einer Leica DC300 Kamera und einem Leica DMLB Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

## **2.2 Teil B**

### **2.2.1 Standardmethoden der Molekularbiologie**

Die folgenden Standardmethoden wurden gemäß der in Sambrook et al., 2001, nachzulesenden Protokollen oder nach den Angaben der Hersteller durchgeführt: Polymerasekettenreaktion (PCR), Restriktionsverdau, Ligation, Gelelektrophorese, Gelextraktion (Pharmacia), Transformation kompetenter Bakterien, Isolierung von Plasmiden aus Bakterien (Miniprep, Maxiprep mit Quiagen-Kit).

### **2.2.2 Klonierung und Proteinexpression**

Die C-terminale cDNA des Toutatis Proteins, welche die letzten 735 Aminosäuren kodiert, wurde freundlicherweise von H.M. Bourbon (Institut de Genetique Humaine, Montpelliers) zur Verfügung gestellt (78). Die Proteinsequenz ist übersichtlich im Abschnitt 7.3 des Anhangs dargestellt. Mit den Primern Tou1-forw. (5'-GGG GGG GCA TAT GGA ACT CAC CTT GGA CTC GCA G-3'), Tou1-rev. (5'-GGG GAT CCC ATA ATG CTC TTG TCC CAA GC-3'), Tou2-forw. (5'-GGG GGG GCA TAT GAT CTC CCG GGC GCC TCC G-3') und Tou2-rev. (5'-GGG GAT CCC TTG CAG ACA GCC AGC TCC T-3') wurden die Fragmente Tou1 (627 bp) bzw. Tou2 (873 bp) unter Verwendung des PCR-Systems *High-Fidelity* (Roche) amplifiziert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente über ein 0,5% Agarosegel elektrophoretisch getrennt, ausgeschnitten und mit einem *Kit* von Amersham / Pharmacia isoliert. Die Ligation der Fragmente und des Expressions-Vektors *Pet15b* (Novagen) erfolgte an den Schnittstellen der Restriktionsenzyme Nde1 und Bam H1. Nach Einbringen der DNA in E.coli (BL21, Stratagene) durch Elektroporation, wurden die Bakterienzelllinien mit den als richtig identifizierten Plasmiden jeweils in 500 ml LB-Medium (0,1% Ampicilin) angeimpft und bei 37°C in einem Erlenmeierkolben geschüttelt. Sobald die Zellen eine optischen Dichte von 0,6 (Absorbtion gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm) erreichten, wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG (Isopropylthiogalactosid) induziert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur übernacht wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1000 rpm) in Lyse-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl,

0.05% NP40, 1 mM Imidazol) resuspendiert, durch zweimaliges Schockgefrieren und anschließendes Sonifizieren (2 x 2min, Amplitude 20%, auf Eis, Ultraschallgerät von Branson) aufgebrochen. Nach erneutem Abzentrifugieren (30 min, 20.000 rpm) befand sich das rekombinante Tou1 Protein (ca. 30 kDa) im Sediment und konnte mit Coomassie-Färbung nachgewiesen werden. Die *Inclusion bodies* wurden mit 8 M Harnstofflösung bei 60°C aufgelöst, wobei das Protein denaturiert wurde. Das rekombinante Tou2 (ca. 45 kDa) befand sich gelöst im Überstand des Lysats. Tou2 ließ sich nicht mit Coomassie anfärben, was auf eine Konzentration unter 50 ng / µl schließen lässt, konnte aber im Western Blot mit einem αHis-Antikörper nachgewiesen werden. Anschließend erfolgte eine Affinitätsreinigung des Tou 1 Proteins durch Bindung des *His-tags* an Talon-Sepharose (BD Biosciences). Nach dreimaligem Waschen mit 8 M Harnstofflösung wurde der pH-Wert durch Zugabe von HCl von 7, 6 auf 4,5 gesenkt, was zur Elution des Proteins führte. Durch Vergleich mit BSA-Standards auf einem SDS-PAGE wurde die Konzentration des Proteins auf etwa 1 µg / µl geschätzt. Auf diese Weise wurden rund 10 mg Tou1 angereichert.

### 2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde das Gelsystem der Firma Novex verwendet. Zwischen zwei zusammenhängende vorgefertigte Plastikplatten wurde zuerst ein Trenngel [2,4 ml Wasser, 2 ml Acrylamid (10% des Endvolumens), 1,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 30 µl 20% SDS, 30 µl 20% APS, 2,5 µl TEMED] und anschließend ein Sammelgel [1,4 ml Wasser, 0,33 ml Acrylamid (5% des Endvolumens), 0,25 ml 1M Tris (pH 6,8), 10 µl 20% SDS, 10 µl 20% APS, 2 µl TEMED] nacheinander eingegossen. Für unterschiedliche Auflösungen der Trenngele wurde die Menge des zugegebenen Acrylamids von 6-15% variiert. Die Gelkammer wurde mit Laufpuffer [192 mM Glycerin, 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS] gefüllt und die Proteinproben wurden mit vierfach konzentriertem SDS-Ladepuffer [200 mM Tris (pH 6,8), 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glyzerin, 4,2% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau] im Verhältnis 3 zu 1 versetzt. Danach wurden die Proben 3 min auf 95°C erhitzt und in die Probenaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 200 V durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers bzw. der 110 kDa Proteinstandard das untere Ende des Gels erreicht hatte. Nach dem Gellauf wurden die Plastikplatten getrennt und die Gele entweder für einen Western Blot verwendet oder mit Coomassie bzw. Silber angefärbt.

### 2.2.4 Coomassiefärbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die zu färbenden Gele für 5 min in der Fixierlösung [50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure] geschüttelt und anschließend mit Färbelösung [10% (v/v) Essigsäure, 0,025% (w/v) Coomassie (G-250)] für 45 min angefärbt. Das Entfärben erfolgte durch Zugabe und mehrfachen Austausch der Entfärbelösung [10% (v/v) Essigsäure] bis der Gelhintergrund klar wurde. Nach Erreichen des gewünschten Entfärbegrades wurde das Gel mit Hilfe des Geldokumentationssystems *Image Master VDS* (Pharmacia) fotografiert bzw. mit einem Scanner (Linotype Saphir Ultra 2, Linocolor) digitalisiert, archiviert und in einem Gelrockner auf Filterpapier getrocknet.

### 2.2.5 Silberfärbung

Das Gel wurde nach Auftrennung der Proteinproben übernacht in Fixierlösung [40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure] inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für 20 min mit Waschlösung [30% (v/v) Ethanol] gewaschen und 1 min in Thiosulfatlösung [0,02% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ] eingelegt. Nach dreimaligem kurzen Waschen mit Wasser wurde das Gel für eine Stunde in Silbernitratlösung [0,2% (w/v)  $\text{AgNO}_3$ ] inkubiert. Anschließend wurde noch dreimal kurz mit Wasser gewaschen und das Gel in den Entwickler [3% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,05% (v/v) Formaldehyd, 0,0004% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ] gelegt. Sobald die Banden die gewünschte Intensität angenommen hatten, wurde die Stop-Lösung [0,5% (w/v) Glycin] auf das Gel gegeben. Dokumentation und Trocknung erfolgten wie im vorherigen Abschnitt 2.2.4 beschrieben.

### 2.2.6 Western Blots

Proteinproben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in einem Transferpuffer [25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,02% (w/v) SDS] auf eine PVDF-Membran (Millipore) übertragen. Der Transfer erfolgte in einer Western Blot Kammer (Biorad) übernacht bei 50 V. Danach wurden unspezifische Bindungen mit 5% Milchpulver für 1 h blockiert. Der erste Antikörper wurde in PBS/0,1% Tween verdünnt und übernacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS/0,1% Tween wurde mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 1h inkubiert (in 2,5% Milchpulver, Verdünnung nach Angaben des Herstellers). Nach erneutem Waschen erfolgte die Nachweisreaktion mit dem ECL-Kit von Amersham. Schließlich wurde die Membran in

Folie verpackt und in einer Filmkassette gegen einen Röntgenfilm (Super RX, Fuji) exponiert und der Film nach der gewünschten Expositionszeit entwickelt.

### **2.2.7 Herstellung der Antikörper mit der Hybridom-Technik**

Das in *E.coli* exprimierte Tou1 Protein (Abschnitt 2.2.2) wurde in 8 M Harnstoffpuffer an Dr. Elisabeth Kremmer vom GSF Institut in Großhadern übergeben. Dort erfolgte die Herstellung von monoklonalen Antikörpern mit der Hybridom-Technik. Das Prinzip dieser Methode wird im Ergebnisteil B (Abschnitt 4.3) beschrieben.

### **2.2.8 Präparation von *Drosophila* Embryo Extrakt**

Für die Herstellung eines Zellkernextrakts wurden Fliegenembryonen von *Drosophila melanogaster* (Oregon R) in der Kultur des Adolf Butenandt Instituts gesammelt. Der Proteinextrakt wurde nach einem Protokoll, beschrieben bei Nightingale et al. 1999, präpariert (147). Die Fliegen legten ihre Embryonen auf Apfelsaft-Agarplatten, mit denen Futter in Form von einer Hefepaste in die Kultur gebracht wurde. Diese Platten wurden alle 12 Stunden gewechselt und die entnommenen Platten bei 4°C gelagert. Das Alter der Embryonen betrug somit 0-12 Stunden. Die über mehrere Tage hinweg gesammelten Embryonen wurden von den Apfelsaft-Agarplatten, mit Hilfe von einem Haushaltspinsel und kaltem Leitungswasser abgewaschen. Durch drei übereinander liegende Siebe mit immer kleineren Maschen wurden die Embryonen aufgereinigt. Die Embryonen wurden in einen Plastikbecher überführt und mit Embryo-Waschpuffer [0,7% (w/v) NaCl, 0,04% (v/v) Triton-X 100] auf 200 oder 400 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Zum anschließenden Dechorionieren der Embryonen wurde 60 ml Natriumhypochloritlösung (mit 6-14% aktivem Chlor) pro 200 ml Embryosuspension dazugegeben und die Mischung für 2,5 min auf einem Magnetrührer gerührt. Sofort darauf wurden die Embryonen in das feinste Sieb überführt und für 10 min mit kaltem Leitungswasser gewaschen. Um die Chorionhüllen abzutrennen, wurden die Embryonen wieder in einen Plastikbecher gegeben und in 1 l Embryowaschpuffer resuspendiert. Durch kräftiges Rühren wurde der Vorgang des Ablösens der Embryohüllen beschleunigt. Nachdem sich die Embryonen unten im Becher abgesetzt hatten, wurden die oben schwimmenden Hüllen durch Dekantieren abgetrennt und verworfen. Dieser Schritt wurde noch zweimal mit jeweils 1 l 0,7% NaCl-Lösung wiederholt. Die Embryonen wurden durch einen Büchnertrichter abgenutscht, einmal mit 200 ml destilliertem Wasser gewaschen und durch das Vakuum auf dem Filterpapier getrocknet. Die Embryonen wurden abgewogen und sofort

auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Pro g Embryonen wurden 6 ml Nu-I Puffer [15 mM Hepes-KOH, pH 7.6, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA (pH 8.0), 0,5 mM EGTA (pH 8.0), 350 mM Saccharose] vorbereitet, d.h. der Puffer wurde mit 1 mM DTT und 0,2 mM PMSF versehen. Die Embryonen wurden in 1 ml pro g Embryo Nu-I resuspendiert und durch einen Yamato-Homogenisierer passiert (5 Passagen bei 1500 rpm). Die Kerne bleiben bei diesem Schritt intakt. Das Homogenat wurde durch ein Miracloth-Tuch filtriert und direkt in einen GSA-Zentrifugenbecher gegeben. Das Miracloth-Tuch wurde mit dem restlichen Nu-I-Puffer durchgespült. Im anschließenden Zentrifugationsschritt wurden die Kerne abgetrennt. Die Zentrifugation erfolgte im GSA Rotor der Sorvall Zentrifuge für 15 min bei 8000 rpm. Der Überstand, bestehend aus Cytoplasma, wurde anschließend vorsichtig abgegossen, und die Seitenwände der Zentrifugenbecher wurden mit Einmal-Papiertüchern von Lipiden befreit. Das Kernpellet wurde pro g Embryo in 1 ml Nu-II Puffer [15 mM Hepes (pH 7.6), 110 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA (pH 8.0)], nach Zugabe von DTT und PMSF, resuspendiert. Dabei wurde vermieden, das unter dem Kernpellet liegende gelbe Dotterpellet mitzususpendieren. Zur vollständigen Resuspension wurde ein Hand-Homogenisierer mit losem Kolben verwendet. Das Volumen der resuspendierten Kerne wurde in einem Messzylinder bestimmt. Die resuspendierten Kerne wurden auf Ultrazentrifugenbecher aufgeteilt, und es wurde jeweils 10% des Volumens an 4 M Ammoniumsulfatlösung hinzugefügt, um die Kernproteine zu extrahieren. Die Zentrifugenbecher wurden für 20 min auf einem Drehrad rotiert und dann in einer gekühlten Ultrazentrifuge für eine Stunde bei 35 000 rpm zentrifugiert (Ti 60 Rotor). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit einer 10 ml-Pipette abgenommen. Das Volumen des Überstandes wurde gemessen und pro ml wurden 0,3 g Ammoniumsulfatpulver über einen Zeitraum von 5 min dazugegeben. Anschließend wurde für weitere 10 min gerührt. Die ausgefallenen Proteine wurden in der Sorvallzentrifuge (SS34 Röhrchen) für 30 min bei 15 000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Seiten der Zentrifugenröhrchen wurden von Lipiden befreit. Das Proteinpellet wurde aus dem Röhrchen entnommen und mit Hilfe eines kleinen Homogenisators in 0,2 ml HEMG40-Puffer [25 mM Hepes (pH 7.6), X mM KCl (HEMG 40= HEMG + 40 mM KCl), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, pH 8.0, 10 % (v/v) Glycerol] pro g Embryo resuspendiert. Die Proteinlösung wurde zunächst dreimal 45 min gegen HEMG40 (je 1 l) dialysiert und dann über Nacht gegen 3 l HEMG100. Am nächsten Morgen wurde das noch nicht vollständig in Lösung gegangene Protein durch Zentrifugation (15 000 rpm im SS34 Rotor der Sorvallzentrifuge für 10 min)

abgetrennt und der Überstand, genannt „TRAX“, wurde in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.9 Chromatographie

Die Materialien für die Chromatographie wurden von Amersham-Pharmacia (Mono Q HR 5/5), Superose 6 HR 10/30) und von Bio-Rad (Bio-Rex 70) bezogen. Proteinextraktion, Dialyse und Chromatographie fanden bei  $4^{\circ}\text{C}$  statt. Der Zellkernextrakt (Trax) wurde aus 50 g 0-12 Stunden alten *Drosophila* Embryonen präpariert und mit Hilfe einer Bio-Rex 70 Kationenaustauschersäule fraktioniert. Die Säule wurde zuvor equilibriert mit CB-100 Puffer [CB:10mM HEPES pH7.6, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM Phenylmethylsulfonyl-Fluoride (PMSF) und Proteaseinhibitoren; CB-100: CB + 100 mM KCl]. Das 0,25 M KCl Eluat der Bio-Rex 70 Säule wurde in CB-100 dialysiert auf eine Mono Q HR 5/5 Säule geladen. Das gebundene Material wurde mit 20 Säulenvolumen eines linearen Gradienten von CB-100 bis CB-1000. Die mit Hilfe von Western-Blots identifizierten Toutatis-Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und anschließend auf eine Superose 6 HR 10/30 in CB-200 geladen. Mit den Toutatis beinhaltenden Fraktionen wurden anschließend Silber- und Coomassiefärbungen sowie Massenspektrometrie durchgeführt.

### 2.2.10 Massenspektrometrie

Die Proben für die massenspektrometrische Analyse wurden zunächst mittels SDS-PAGE separiert. Das Gel wurde anschließend mit kolloidalem Coomassie gefärbt und alle deutlich erkennbaren Banden wurden ausgeschnitten. Die isolierten Banden wurden jeweils mit 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  in ein Eppendorf Röhrchen eingelegt und direkt an Dr. J. Regula vom Zentrallabor für Proteinanalytik (ZfP) am Adolf Butenandt Institut übergeben. Nach einem Trypsin-Verdau wurden die Proben dort mit der MALDI-TOF Methode analysiert. Die Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des *Mascot Search Engine* von der Firma Matrix Science ausgewertet (<http://www.matrixscience.com/>).

### 2.2.11 Immunfluoreszenz

Die *Drosophila* Schneider Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen und mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) / PBS für 7.5

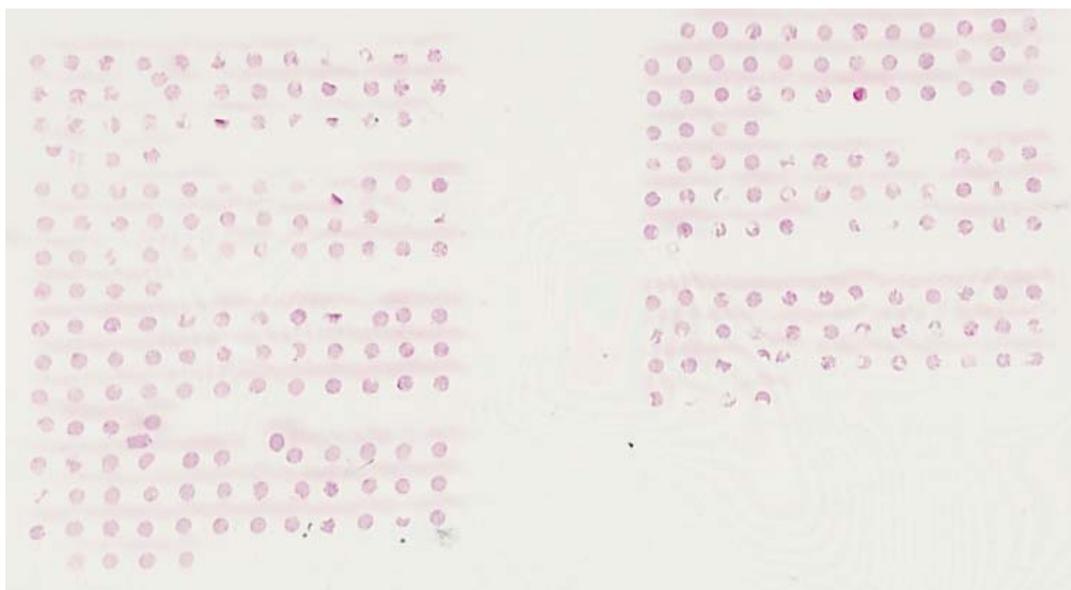
---

Minuten auf Eis fixiert, mit 1% (w/v) PFA/ 0.25% (v/v) TritonX / PBS für 7.5 Minuten auf Eis permeabilisiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Für eine Stunde wurden nun unspezifische Bindungen 2% (w/v) BSA / 5% (v/v) Ziegen Serum blockiert. Der erste Antikörper wurde in Blockierlösung verdünnt und für eine Stunde inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS für je 5 Minuten wurde mit dem zweiten Antikörper, verdünnt in Blockierlösung, ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen in PBS für je 5 Minuten wurde mit 1 µg / ml DAPI in PBS für 2 Minuten zur DNA-Kernfärbung inkubiert und wiederum einmal mit PBS für 5 Minuten gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschen mit 0.1 M n-propyl-gallat / 50% (v/v) Glycerin in PBS auf Objektträgern fixiert. Die Bilder der gefärbten Zellen in Abb. 30 wurden mit Hilfe eines *Axiophot* Mikroskops (Zeiss) und einer *Regita Exi* CCD Kamera (Q Imaging, Burnaby, Canada) aufgenommen. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop 6.0.

### 3 Ergebnisse Teil A - Expression der ATPase ISWI im Prostatakarzinom

#### 3.1 Tissue Microarray

Ein *Tissue Microarray* (TMA) enthält eine Vielzahl von verschiedenen Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger (siehe Abb. 11). Diese Anordnung ermöglicht es, eine große Anzahl von Proben unter den gleichen experimentellen Bedingungen anzufärben. Bei der Immunhistochemie (IHC) sind somit die Inkubationszeiten der Primär- bzw. Sekundärantikörper sowie die Konzentrationen der verwendeten Reagenzien für alle Gewebeproben des TMA gleich. Dies erlaubt einen direkten Vergleich der Färbungsintensität und somit Rückschlüsse auf das Expressionsniveau des untersuchten Proteins in den jeweiligen Geweben. IHC-Färbungen von Gewebeschnitten sind altbewährt und ein wichtiger Bestandteil der Routinediagnostik in der Pathologie. Die Anwendung des TMA ist eine neue Methode, die den Fortschritt in der Krebsforschung in den letzten Jahren beschleunigt hat (148-150). Nach dem Vorbild der neuen DNA-Technologien mit hohem Durchsatz wurde der TMA 1998 von Kononen et al. entwickelt, indem man archivierten Gewebeproben Stanzbiopsien entnahm und in einen neuen Paraffinblock setzte (151). Das ausgestanzte Material wird als Gewebekern oder *Tissue Core* bezeichnet. So wurde es möglich bis zu 1000 Gewebeproben auf einem Objektträger mit wenigen Mikrolitern Antiserum zu färben. Bis



**Abb. 11 zeigt den Tissue Microarray (TMA) nach der histopathologischen Standardfärbung mit Hämatoxylin und Eosin. Auf dem Objektträger befinden sich 276 Tissue Cores, die aus Formalin fixiertem Gewebe in Paraffinblöcken entnommen wurden.**

dahin konnte mit der konventionellen Methode jeweils nur eine einzige Probe auf einem Objektträger analysiert werden. Neben der IHC kann auch *In Situ Hybridisierung* zur Darstellung von DNA und RNA auf dem TMA angewendet werden. Seit der Etablierung des TMA konnten wichtige Erkenntnisse über die verschiedensten Tumore gewonnen werden. Unterschiedliche Profile der Genexpression in hereditären Mammakarzinomen konnten beispielsweise mit Hilfe eines TMA den Mutationen der BRCA1 und BRCA2 Gene zugeordnet werden (152). Ebenso fand man mit dieser Technik die Überexpression des Her-2 Proteins bei Brustkrebs sowie die Amplifizierung des Androgenrezeptor Gens im Prostatakarzinom (153;154).

<b>Diagnose</b>	<b>Tissue Cores</b>	<b>Patienten</b>	<b>Nuclei</b>
BPH	23	13	709
Low Grade PIN	5	5	160
High Grade PIN	5	4	163
hoch diff. PCa	30	23	990
niedrig diff. PCa	35	19	1126

**Tab. 1** Während der Färbung können sich einige Gewebeproben teilweise oder vollständig von dem Objektträger lösen. Nach dem Ausschluss dieser nicht repräsentativen *Cores* wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Anzahlen von Patienten, *Cores* und Nuclei in die Evaluation der immunhistochemischen Färbung mit dem ISWI-Antikörper eingeschlossen.

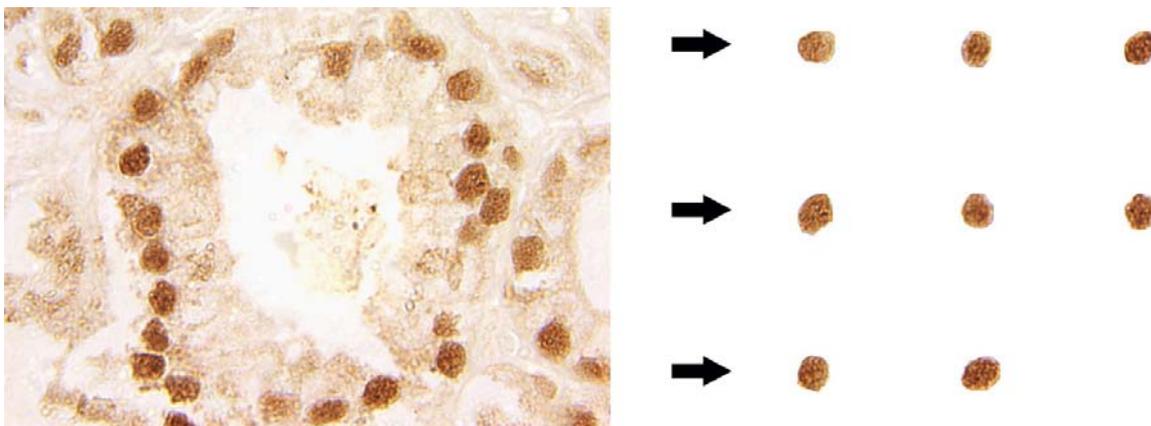
Wir haben diese Methode für die IHC mit polyklonalen Antikörpern gegen ISWI-Protein im humanen Prostatakarzinom und im gutartigen Prostatagewebe eingesetzt. Es ist bekannt, dass die Snf2H Isoform von ISWI für einen schnellen Ablauf der DNA-Replikation im Heterochromatin benötigt wird und vermehrt in proliferierendem Gewebe exprimiert wird (65;75;76;155). Es sollte deshalb getestet werden, ob das Protein in den proliferierenden Karzinomzellen angereichert ist. Der verwendete TMA enthielt Gewebe mit den folgenden histopathologischen Diagnosen: Adenokarzinom der Prostata (PCa) nach Differenzierungsgrad gruppiert, intraepitheliale Neoplasie der Prostata (Low und High Grade PIN) und benigne Prostatahyperplasie (BPH). Das histologische Bild dieser Diagnosen wird ausführlich in Abschnitt 1.3 erklärt. Tabelle 1 zeigt die Anzahl der Patienten, *Tissue Cores* und Zellkerne, welche für die Analyse der ISWI-Immunfärbung, nach Ausschluss der nicht repräsentativen *Cores*, aus der jeweiligen diagnostischen Gruppe zur Verfügung standen.



### 3.3 Quantitative Analyse der Immunfärbung

Die Reproduzierbarkeit der visuellen Evaluation der IHC ist gering. Dieses Problem kann durch digitale Bildanalyse umgangen werden. Dabei werden mit einer digitalen Kamera mikroskopische Bilder des Prostataepithels bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

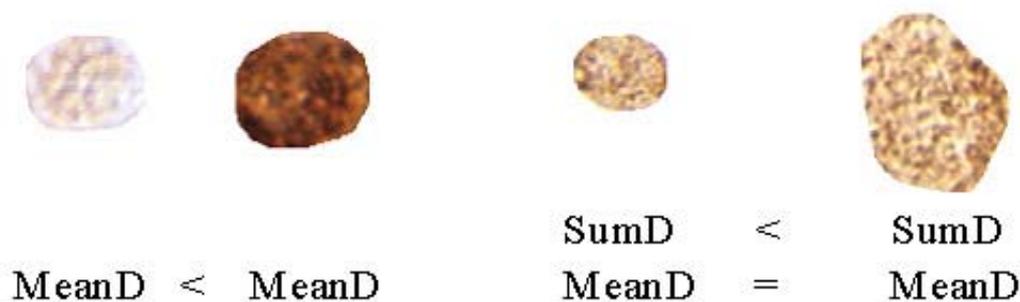
Die Zellkerne der Epithelzellen werden aus dem digitalen Bild manuell segmentiert und die Färbeintensität wird von einem Computerprogramm ausgewertet (siehe Abb. 13). Die Auswahl der Zellkerne wird folgendermaßen getroffen: Entlang einer Drüse werden diejenigen Nuclei mit der Computermaus ausgeschnitten, die im Bild richtig fokussiert, also



**Abb. 13** Links: Das digitale Bild des Drüsenepithels eines gut differenzierten Adenokarzinoms der Prostata nach IHC mit ISWI-Antikörpern bei etwa 50-facher Vergrößerung. Rechts: 8 Zellkerne, die aus den Epithelzellen im linken Bild ausgeschnitten und somit in das passende Format für die Nuclear Texture Analysis gebracht wurden.

scharf abgebildet sind. Um eine statistisch repräsentative Zellkernpopulation zu erhalten, werden pro *Tissue Core* mindestens 30 Nuclei segmentiert. Auf diese Weise kann man die Färbung verschiedener diagnostischer Gruppen quantitativ miteinander vergleichen. Die sogenannte *Nuclear Texture Analysis* wurde während der letzten beiden Jahrzehnte ursprünglich zur Untersuchung der Morphologie des gefärbten Chromatins in histologischen Schnitten entwickelt, kann aber auch, wie in unserem Beispiel, zur Analyse der IHC mit Kern-Antigenen verwendet werden (157-160). Das Computerprogramm berechnet für jeden Zellkern 65 morphologische Kriterien, die sogenannten *Texture Features*. Da jeder Zellkern digital durch eine Menge von Zahlen, welche Farbstufen der einzelnen Pixel kodieren, dargestellt wird, kann man eine Reihe von statistischen und geometrischen Formeln auf diese Zahlen anwenden. So entstehen die *Texture Features* als individuelles Maß für die Dichte und die Verteilung der Färbung des Nukleus. Gemessen werden dabei unter anderem Mittelwerte, lokale Extremwerte, Ordnung und die Wahrscheinlichkeit, dass ein Pixel mit der Intensität X einen Nachbarn mit der Intensität Y hat. Nachdem viele *Features* eng miteinander korreliert

sind, können die Datensätze sehr redundant sein. Es gilt also jene Gruppe von *Features* zu identifizieren, welche die Information über die gefärbten Zellkerne prägnant und möglichst verständlich präsentiert. Zur quantitativen Analyse der IHC sind zwei *Texture Features* von besonderem Interesse: Die mittlere optische Dichte (MeanD) und die summierte optische Dichte (SumD) (siehe Abb. 14). Die MeanD entspricht dem Mittelwert der gemessenen optischen Dichte eines Zellkerns ohne Rücksicht auf dessen Größe. Sie kann einen Wert von null bis eins, entsprechend der Extreme absolute Transparenz und vollkommene Lichtundurchlässigkeit, annehmen. In den Wert der SumD wird zusätzlich die Größe der Schnittfläche des Zellkerns integriert. Ihr Wert kann keine definierte Obergrenze.

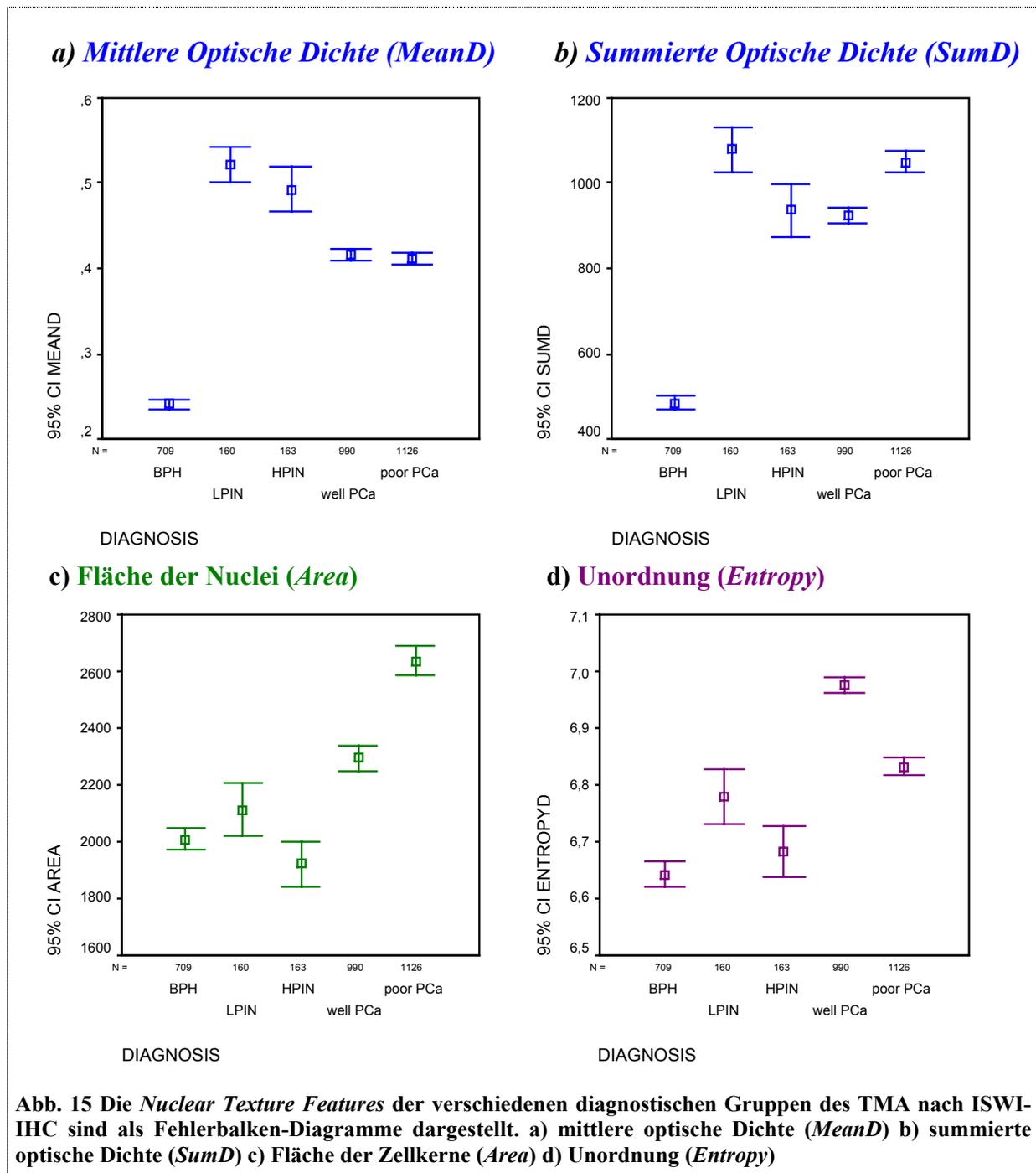


**Abb. 14** Links: Zwei IHC-gefärbte Zellkerne, die etwa gleich groß sind. Der stärker gefärbte hat eine größere mittlere optische Dichte (MeanD) als der schwach gefärbte Zellkern. Rechts: 2 unterschiedlich große IHC-gefärbte Zellkerne haben etwa die gleiche mittlere optische Dichte (MeanD). Der größere Zellkern hat eine jedoch eine größere summierte optische Dichte (SumD), weil er insgesamt mehr immunreaktives Antigen enthält. Die klassische visuelle Evaluation berücksichtigt diesen Unterschied nicht.

Vergleicht man statistisch die *Texture Features* der Nuclei aus der BPH-Gruppe mit der PCa Gruppe nach der ISWI-Färbung so sind 60 von 65 Features signifikant ( $p\text{-Wert} \leq 0.001$ ) verschieden. In Abb. 15 und Abb. 16 sind die *Texture Features* als sogenannte Fehlerbalken-Diagramme für die Zellkernpopulationen der verschiedenen diagnostischen Gruppen dargestellt. Fehlerbalken zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung einer Wertemenge an. Je größer die Standardabweichung desto länger der Fehlerbalken.

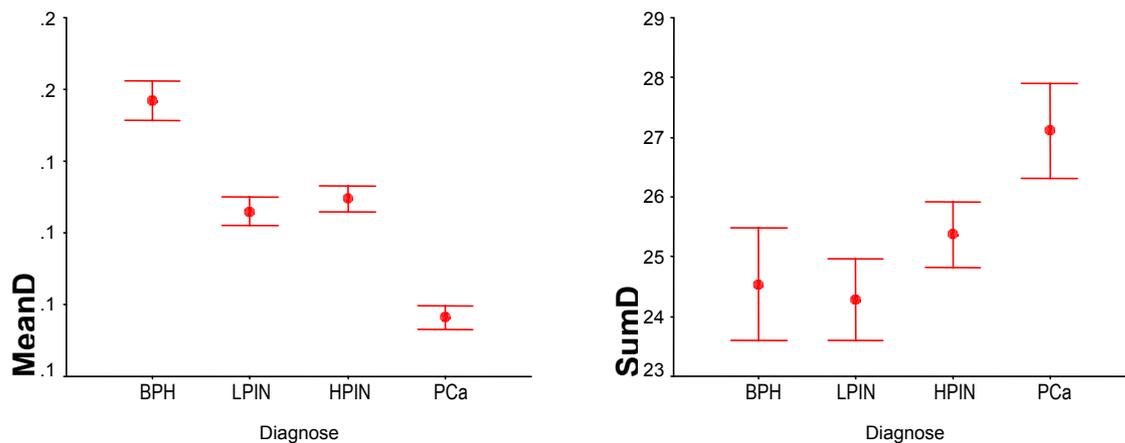
Die MeanD der Nuclei aus den PCa-Gruppen war bei einem Konfidenzintervall von 95% etwa doppelt so hoch wie die MeanD der Nuclei aus der BPH-Gruppe (siehe Abb. 15a). Beim Vergleich der SumD fand man ebenfalls signifikant erhöhte Werte für das maligne PCa-Gewebe gegenüber der gutartigen BPH (siehe Abb. 15b). Die SumD der Nuclei von niedrig differenzierten Karzinomen (poor PCa) ist allerdings noch höher als die SumD der Nuclei von gut differenzierten Karzinomen (well PCa). Dies korreliert mit der größeren Schnittfläche der Nuclei von niedrig differenzierten Karzinomen, welche durch das *Texture Feature Area* dargestellt wird (siehe Abb. 15c). Auch die Zellkerne aus den beiden PIN-Gruppen zeigten eine signifikant erhöhte MeanD und SumD gegenüber BPH. Die Entropie ist ein *Texture*

*Feature*, das den Grad der räumlichen Dysorganisation, also die Unordnung des ISWI-Signals repräsentiert. Sie ist bei malignem Prostatagewebe im Vergleich zur gutartigen Kontrolle erhöht (siehe Abb. 15d).

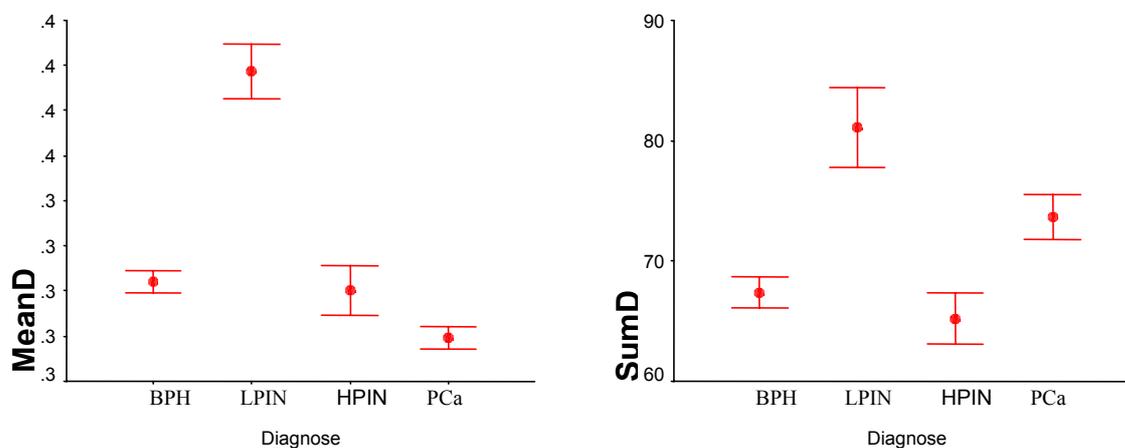


**Abb. 15** Die *Nuclear Texture Features* der verschiedenen diagnostischen Gruppen des TMA nach ISWI-IHC sind als Fehlerbalken-Diagramme dargestellt. a) mittlere optische Dichte (*MeanD*) b) summierte optische Dichte (*SumD*) c) Fläche der Zellkerne (*Area*) d) Unordnung (*Entropy*)

a) ***Histon H3 Lysin 9 Acetylierung ( $\alpha$ -AcH3K9) El Far et al. 2003***



b) ***DNA-Methylierung ( $\alpha$ -5MeC) El Far et al. 2003***



c) ***DNA (Hämatoxylin) El Far et al. 2003***

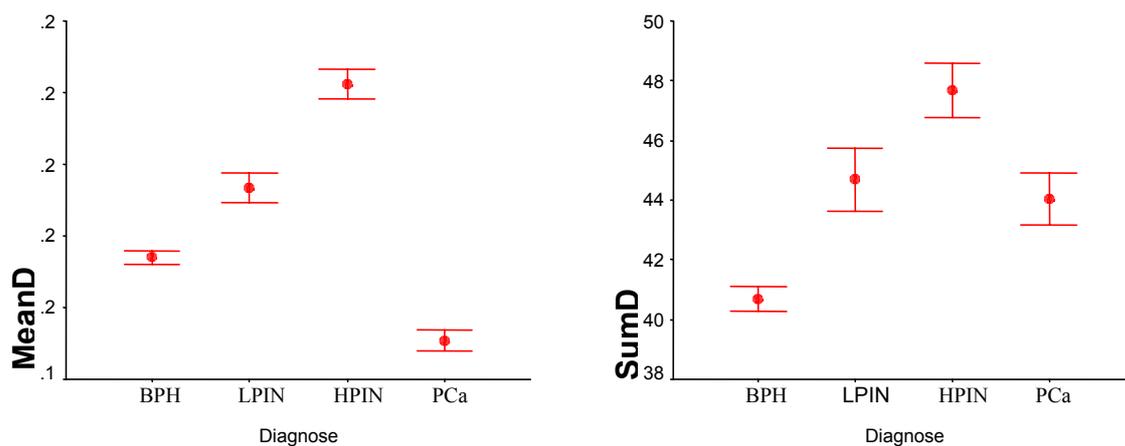


Abb. 16 Nuclear Texture Analysis der IHC des TMA mit Antikörpern gegen acetyliertes Lysin 9 am Histon H3 (a) und 5-Methyl-Cytidine (b) sowie der Hämatoxylin-Färbung (c). Dargestellt sind jeweils SumD und MeanD als Fehlerbalken (95% Konfidenzintervall). Diese Experimente wurden von Mahmoud El Far et al. im Jahr 2003 an der Queens University Belfast durchgeführt.

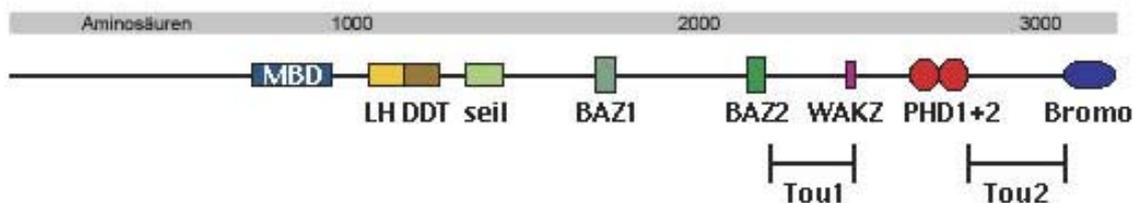
Zusammengefasst konnte das Ergebnis der klassischen visuellen Evaluation durch die quantitative Analyse bestätigt werden. Die Intensität der ISWI-Färbung ist in malignen Zellen signifikant stärker als in gutartigen Zellen. Darüber hinaus liefert uns die *Texture Analysis* Information über die Größe der gefärbten Zellkerne und die Verteilung des Signals. Die bösartigen Zellen waren im Durchschnitt größer und die Verteilung von ISWI war weniger geordnet als in gutartigen Zellen. Wir können also ausschließen, dass nur die Vergrößerung der Zellkerne den Eindruck einer stärkeren Färbung vermittelt, weil die gemessene MeanD der malignen Nuclei, die nicht von der Größe abhängt, erhöht ist.

In der Quantitative Pathology Group an der Queens University Belfast wurde von Mahmoud El Far derselbe TMA auch mit Antikörpern gegen acetyliertes Lysin 9 am Histon H3 (AcH3K9) und gegen 5-Methyl-Cytidin (5-MeC) sowie mit Hämatoxylin gefärbt. Warum gerade diese beiden epigenetischen Marker interessant sind geht aus dem Abschnitt 1.1.2 in der Einleitung hervor. Die *Nuclear Texture Analysis* dieser Färbungen ist in Abb. 16 illustriert und wird in die Diskussion der Ergebnisse miteinbezogen (Abschnitt 5.1)

## 4 Ergebnisse Teil B – Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen rekombinantes Toutatis Protein

### 4.1 Klonierung von zwei DNA-Fragmenten

Zur Herstellung eines Antikörpers, der ein bestimmtes Protein erkennen soll, wird in der Regel ein Fragment von diesem Protein exprimiert und gereinigt, um damit ein Versuchstier (z.B. Ratte oder Kaninchen) aktiv zu immunisieren. Zu diesem Zweck wurden in einem ersten Schritt zwei unterschiedliche Fragmente der für Tou kodierenden cDNA in einen Expressionsvektor kloniert. Die korrekte Ligation der Fragmente mit dem Expressionsvektor wurde durch anschließende Sequenzierung überprüft. Mit Hilfe von Elektroporation wurden die beiden DNA-Konstrukte in Bakterienzellen gebracht, wo die DNA exprimiert, also in Protein übersetzt, werden kann. Um etwaige Kreuzreaktionen zu vermeiden, wurden die Fragmente Tou1 und Tou2 aus Bereichen des Proteins gewählt, die nicht mit Homologien zu anderen BAZ/WAL Proteinen überlappen (Abb. 17). Beim verwendeten Expressionsvektor pet15b (Novagen) wird der eingefügten Sequenz sechs mal die Aminosäure Histidin angehängt. Ein sogenannter *His-Tag* erlaubt die Affinitätsreinigung des rekombinanten Proteins, da die Histidin-Reste mit Metallionen Chelatkomplexe bilden können. Diese Eigenschaft des *His-Tags* ermöglicht z.B. eine Chromatographie über eine Nickel- oder Cobalt-Chelat-Matrix.



**Abb. 17** Schematische Darstellung der vorhergesagten Proteinstruktur von Toutatis. Domänen mit Homologie zu anderen Proteinen der ACF1 – WSTF – BAZ Familie (Abschnitt 1.1.5, Abb. 6) sind als Symbole dargestellt. Die von uns klonierten Fragmente Tou1 und Tou2 sind darunter, entsprechend ihrer Position innerhalb des Proteins, abgebildet. Tou1 und Tou2 liegen weitgehend zwischen den homologen Domänen. Tou1 überschneidet sich mit dem WAKZ-Motiv, das allerdings nur schwach konserviert ist. Die Aminosäure-Sequenzen sind im Abschnitt 7.3 des Anhangs angegeben.

### 4.2 Proteinexpression in *E.coli*

In den verwendeten Expressionsvektoren befinden sich die klonierten Gensequenzen unter der Kontrolle eines sogenannten Lac-Operators. Der Lac-Operator ist Teil eines Kontrollsystems, das bei *E.coli* normalerweise die Transkription des Galaktosidase Gens steuert. Falls dem Bakterium Glucose fehlt, wird vermehrt Galaktosidase transkribiert, um alternativ Milch-

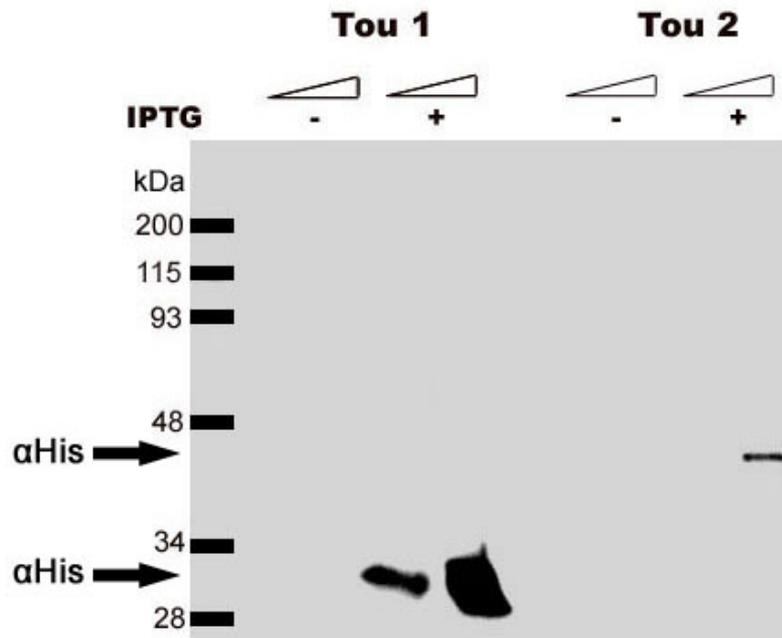


Abb. 18 Western-Blot-Analyse der Protein Expression mit einem His-Antikörper. Auf das SDS-PAGE (12%) wurden Proben der Bakterienkulturen mit den für Tou1 bzw. Tou2 kodierenden Plasmiden vor und nach Induktion mit IPTG geladen. Tou 1 wurde in wesentlich größeren Mengen als Tou 2 exprimiert.

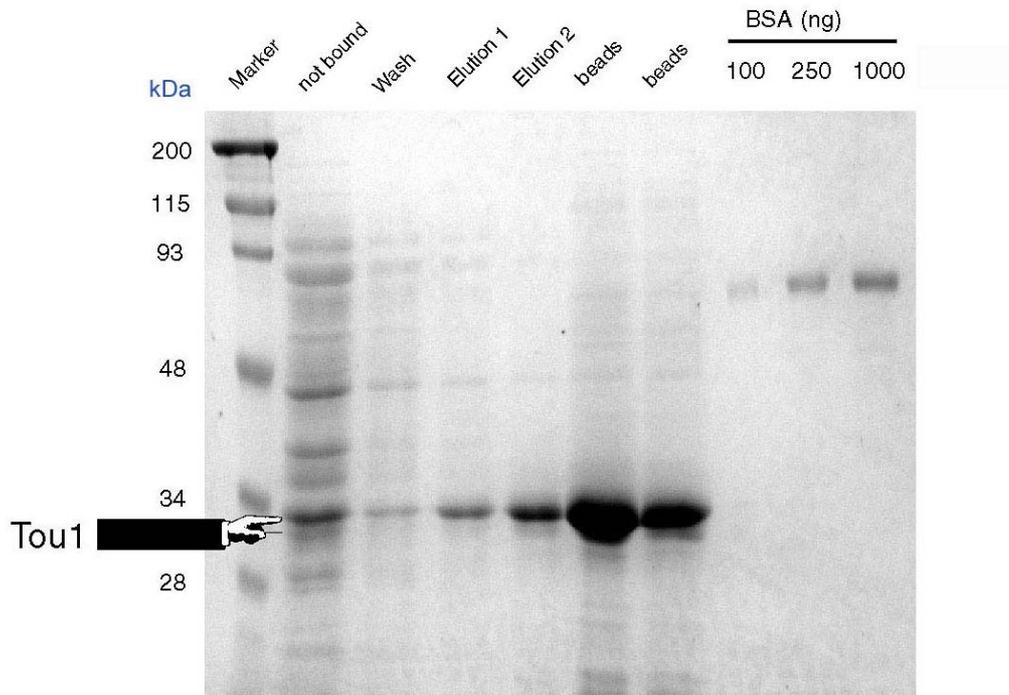


Abb. 19 Reinigung des Tou1 Proteins in 8 M Harnstoffpuffer mit *Talon Resin*. Die Abbildung zeigt eine Coomassie-Färbung eines SDS-PAGE (12%) auf dem folgende Proben geladen wurden (von links nach rechts): Proteinstandard, Ungebundener Überstand (*not bound*), Überstand nach Waschschritt (*Wash*), Elution 1 und 2 (pH 4,5), *Talon Beads*, BSA Standard. Die Elution erfolgte durch Senkung des pH-Werts von 7,6 auf 4,5.

zucker zu verdauen. In Gegenwart von Glucose ist ein Lac-Repressor an die DNA gebunden und verhindert die Transkription des Gens im Lac-Operon. Die Galaktose heftet sich an den Repressor, der dadurch seine Bindungseigenschaften ändert und von der DNA abfällt. Ein Induktor wie IPTG ähnelt der Galaktose und kann ebenfalls eine Derepression verursachen. Danach steht der Transkription des Gens nichts mehr im Weg. Dieses von der Natur geschaffene Regulationssystem verwenden wir, um die Expression von rekombinanten Proteinen zu steuern.

Die Bakterien mit den von uns konstruierten Expressionsvektoren wurden kultiviert und bei einer bestimmten Zelldichte wurde die Expression mit IPTG induziert. Die Expression der beiden Proteine verlief sehr unterschiedlich (Abb. 18): Das rekombinante Tou1 (ca. 30 kDa) wurde in großen Mengen, mit einer Konzentration von etwa 200 ng /  $\mu$ l in der Bakterienkultur, aber nicht in löslicher Form exprimiert. Oftmals bilden sich bei der Expression von rekombinantem Protein in Bakterien unlösliche Aggregate, sogenannte *inclusion bodies*. Aus solchen Einschlusskörperchen kann das Protein nur unter denaturierenden Bedingungen (mit 8M Harnstoff Puffer) gewonnen werden. Das auf diese Weise erhaltene Protein ist nicht vollständig gefaltet und somit biologisch nicht aktiv. Zur Herstellung eines Antikörpers ist es aber effektiv einsetzbar. Das Protein Tou2 (ca. 40 kDa) wurde zwar in löslicher Form exprimiert, jedoch in so geringen Mengen, dass es nur im Western Blot nachgewiesen konnte (Abb. 18). Eine Färbung von Tou2 mit Coomassie ist nicht gelungen, was auf eine Konzentration von weniger als 50 ng /  $\mu$ l schließen lässt. Trotz Versuchen mit variablen Expressionsbedingungen (Temperatur, Dauer, IPTG-Konzentration) konnte die Ausbeute nicht gesteigert werden. Eine Anreicherung von Tou2 war deshalb nicht möglich. Somit konnte nur Tou1 zur Generierung der Antikörper verwendet werden.

Die Reinigung und Anreicherung des denaturierten Tou1 erfolgte über eine *Talon* Chromatographie (Cobalt-Chelator) in 8 M Harnstoffpuffer. Die Senkung des pH-Werts auf 4,5 führte dabei zur Elution (Abb. 19). Somit konnten insgesamt etwa 10 mg gereinigtes Tou1 gewonnen und zur Immunisierung verwendet werden.

### 4.3 Herstellung und Selektion der monoklonalen Antikörper

Das rekombinante Tou1 Proteinfragment wurde im Rahmen einer Kollaboration mit Frau Dr. E. Kremmer (GSF-Institut, Großhadern) zur Herstellung der Antikörper übergeben. Dort wurde eine Ratte mit dem Protein aktiv immunisiert nach etwa acht Wochen mit Hilfe von CO<sub>2</sub> getötet. Anschließend wurden B-Zellen aus der Milz der Ratte isoliert und mit einer Myelomzelllinie fusioniert. Das Ergebnis der Fusion sind sogenannte Hybridomzellen, die Antikörper produzieren. Mit Hilfe der ELISA-Technik (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) erfolgte die Primäraustestung der Zellkultur-Überstände von den Hybridomzelllinien. Nach insgesamt drei Monaten erhielten wir 44 positive Überstände zur weiteren Selektion. Diese erfolgte durch Austesten dieser Überstände an *Drosophila* Zellkernextrakten (Trax) mit

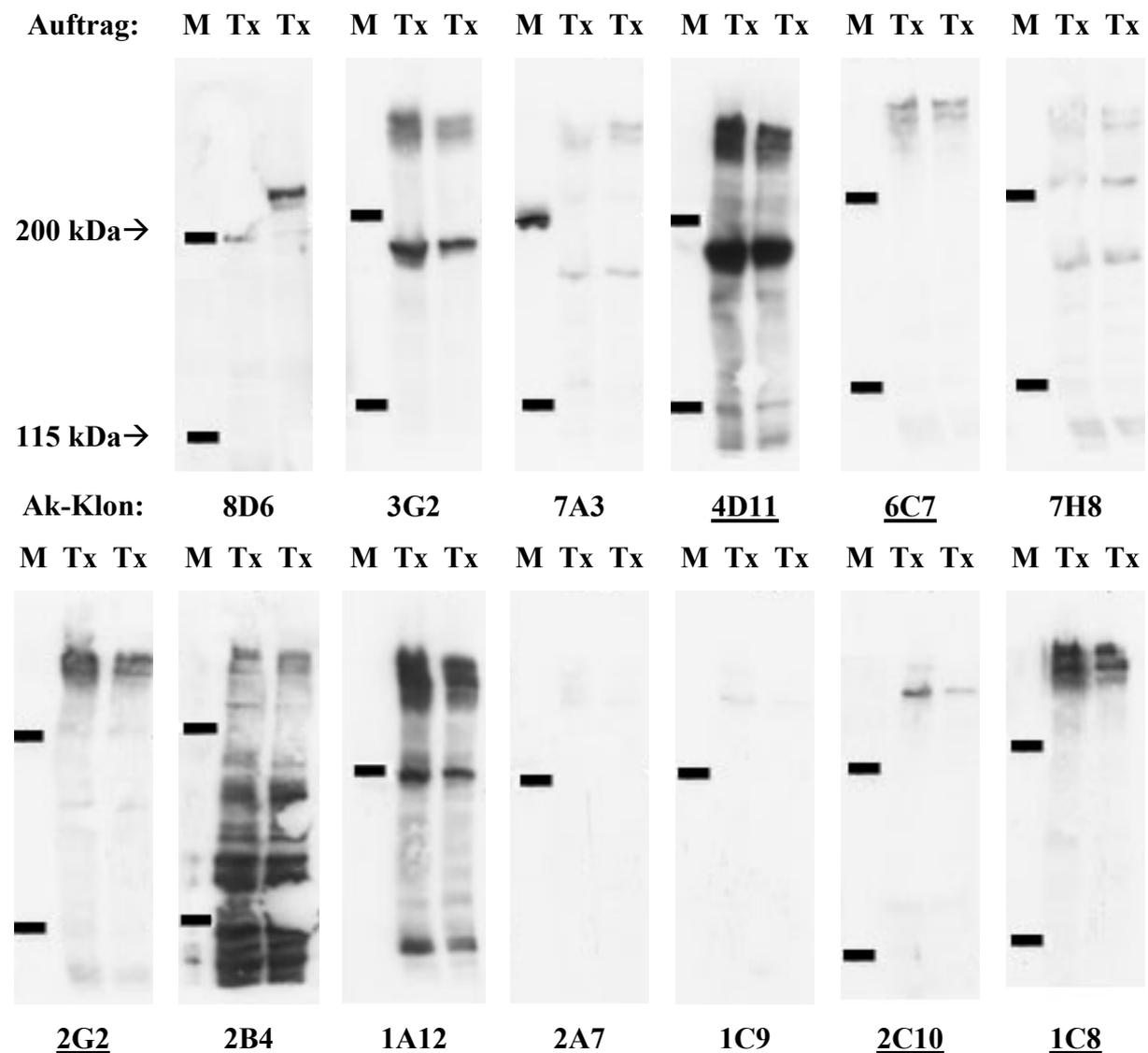
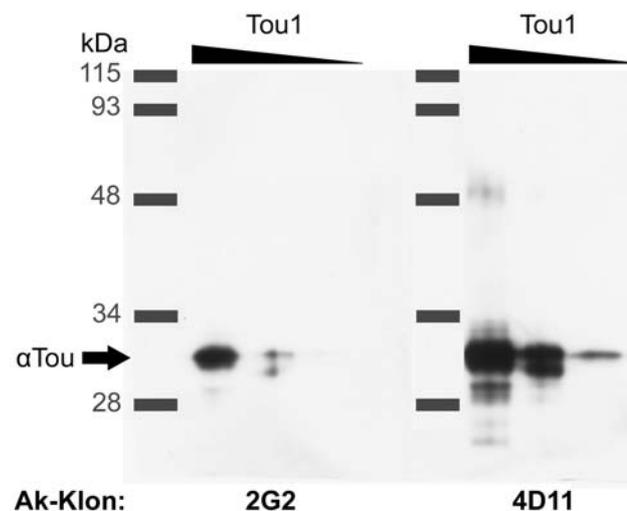


Abb. 20 Test der Überstände von Primären Hybridomzellen, die Tou-Antikörper sezernieren. Die 13 verschiedenen Klone wurden im Western Blot überprüft auf Reaktion mit *Drosophila*-Zellkernextrakt (Tx), der auf zwei Spuren des Gels in gleicher Konzentration aufgetragen wurde. Als positiv wurden Klone, die ein Signal über dem 200kDa Marker (M) zeigten, erachtet. Die Klone 4D11, 6C7, 2C10, 2G2 und 1C8 wurden zur Reklonierung ausgewählt.

Hilfe der Western-Blot Technik. Die Präparation des Extrakts ist ausführlich im Abschnitt 2.2.8 des Methodenteils beschrieben. Bei 13 primären Hybridomen zeigte sich ein Western-Blot Signal für ein hochmolekulares Protein ( $\approx 250$  kDa), das zu dem vorhergesagten Molekulargewicht des Toutatis Proteins passt. Weitere Western Blots mit den 13 im vorherigen Test positiven Klonen lassen unterschiedliche Reaktionseigenschaften erkennen (Abb. 20). Unter Berücksichtigung der Intensität des Signals und eines möglichst geringen Hintergrunds wurden die fünf Klone 4D11, 6C7, 2C10, 2G2 und 1C8 zur Reklonierung ausgewählt. 1C8, 2G2 und 6C7 produzierten jeweils eine Doppelbande über dem 200 kDa Marker mit, der Aufzählung nach, absteigender Intensität. 4D11 detektierte zusätzlich noch eine Bande unter dem 200 kDa Marker, wobei es sich womöglich um ein Abbauprodukt von Tou handelt. 2C10 zeigte nur eine einzelne Bande, die langsamer als der 200 kDa Proteinstandard migrierte. Eine Reklonierung dieser primären Hybridome war notwendig, um stabile Zelllinien zu erhalten. Erst solche Zellen produzieren Antikörper, die für den wissenschaftlichen Gebrauch freigegeben sind.



**Abb. 21** Western-Blot-Analyse des rekombinanten Tou1-Proteins, welches in absteigender Konzentration doppelt auf jeweils 3 Spuren neben Proteinstandards auf dem SDS-PAGE (12%) aufgetragen wurde. Die Membran wurde vertikal geschnitten und mit zwei verschiedenen Antikörpern inkubiert. Das rekombinante Tou1-Protein wurde von zwei verschiedenen Antikörper-Klonen erkannt (2G2 und 4D11)

Exemplarisch wurde auch bestätigt, dass die reklonierten Antikörper das rekombinante Tou1 erkennen (Abb. 21). Nun waren die Voraussetzungen für die Reinigung von neuen Tou assoziierten Protein Komplexen geschaffen.

#### 4.4 Proteinreinigung aus *Drosophila* Embryos

Das Ausgangsmaterial für die Reinigung bzw. Isolierung von Tou Protein Komplexen war ein Zellkernextrakt aus *Drosophila* Embryos (Trax). Dieser Extrakt wurde über mehrere, unterschiedliche chromatographische Schritte fraktioniert. Die so gewonnenen Fraktionen wurden elektrophoretisiert, auf PVDF-Membranen transferiert und Tou mit Hilfe des Antikörpers im Western-Blot detektiert. Wegen seiner günstigen Reaktionseigenschaften wurde der 6C7 Klon als Standardantikörper verwendet. Zu Kontrollzwecken konnten vergleichbare Ergebnisse auch mit den anderen Antikörpern erzielt werden. Auf diese Weise wurden nach jedem chromatographischen Schritt Fraktionen identifiziert, in denen Tou angereichert ist. Solche Fraktionen wurden vereinigt und auf die nächste Chromatographiesäule geladen und erneut fraktioniert. Proteine, die in einem Komplex interagieren, werden dabei häufig nicht voneinander getrennt. Nicht Tou-assoziierte Proteine werden auf Grund ihrer unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften zunehmend abgetrennt. Somit kommt es nach mehreren chromatographischen Schritten zu einer Anreicherung von Tou und seinen Interaktionspartnern.

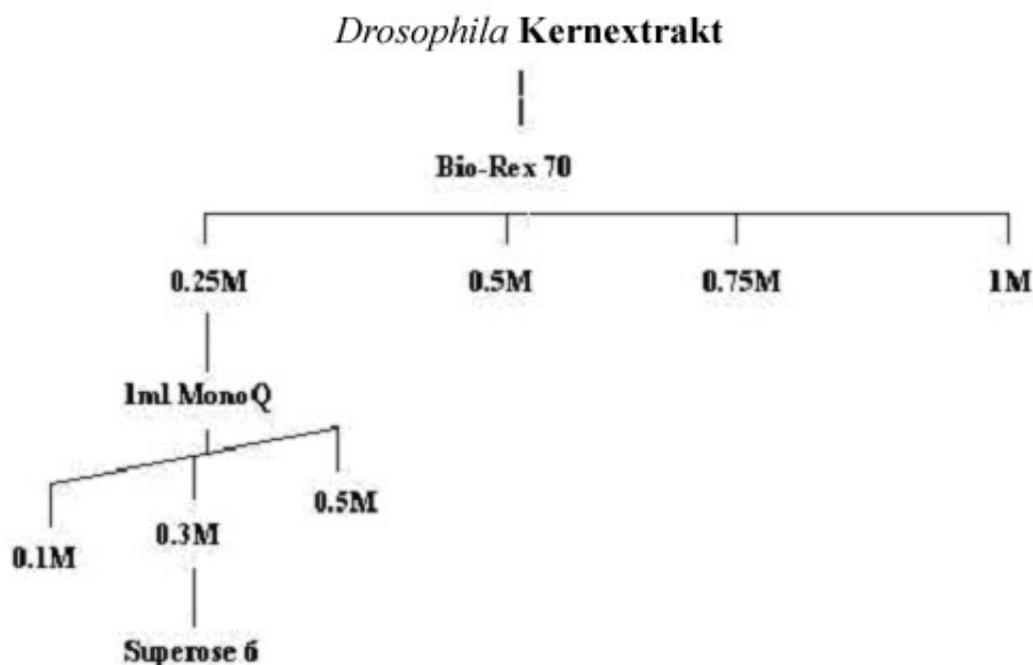
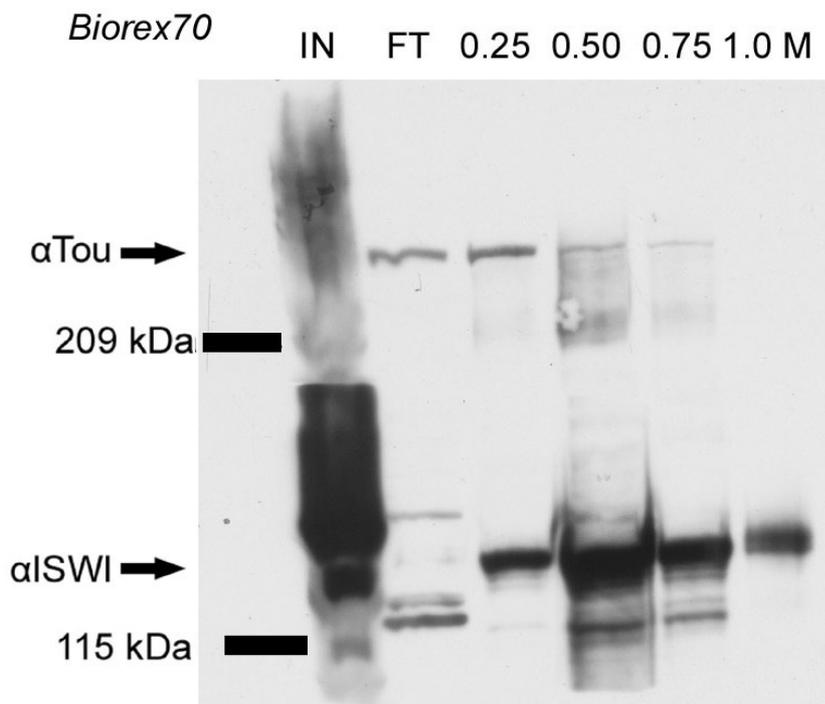


Abb. 22 Chromatographieschema: Der *Drosophila*-Zellkern-Extrakt wurde zunächst auf die Kationenaustauscher-Säule *BioRex70* gegeben. Nach Elution wurden Fraktionen mit positivem Western-Blot-Signal vereinigt und weiter über eine *MonoQ*-Anionenaustauscher-Säule gereinigt. Nach erneuter Vereinigung der positiven Fraktion erfolgte eine Gelfiltration über die *Superose6*-Säule.

Nach einigen Vorversuchen wurde das in Abb. 22 gezeigte Reinigungsschema für Tou-Komplexe etabliert. Als erster Schritt wurde Trax auf die Kationenaustauscher-Säule

*BioRex70* gegeben. Der gebundene Anteil des Tou-Proteins wurde bei einer stufenweisen Erhöhung der Salzkonzentration auf 0.25 M, zusammen mit dem potentiellen Interaktionspartner ISWI eluiert (Abb. 23). Wie in der Einleitung (Abschnitt 1.1.5) beschrieben, ist Toutatis homolog zu Proteinen, die mit der ATPase ISWI interagieren. Deshalb verfolgten wir zu Beginn der Proteinreinigung, parallel zu Tou auch ISWI.



**Abb. 23** Western-Blotanalyse der Fraktionen des *Drosophila*-Zellkern-Extrakts, die aus der Kationenaustauscher-Säule *BioRex70* eluiert wurden. Die Spuren des SDS-PAGE (6%) wurden mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Proteinstandard, Auftrag (IN), Durchlauf (FT), Eluate bei stufenweise erhöhter Salzkonzentration (0.25-1.0M) Die Blotmembran wurde nach dem Proteintransfer, unterhalb des 209 kDa-Markers geschnitten. Die obere Hälfte wurde mit dem Tou-Antikörper und die untere Hälfte mit ISWI-Antikörper inkubiert. Das stärkste Tou-Signal koeluierte mit dem ISWI-Signal der 0.25M-Elution, welche anschließend weiter gereinigt wurde.

Die 0,25 M Fraktion wurde weiter über die *MonoQ*-Anionenaustauscher-Säule gereinigt. Hierbei wurde Tou vollständig gebunden und befand sich nach der Elution mittels kontinuierlichem Salzgradienten in den Fraktionen 21 bis 31 (Abb. 24). Diese Fraktionen enthielten ebenfalls das ATP-hydrolysierende Protein ISWI. Für die anschließende Gelfiltrationssäule Superose 6 wurden die Fraktionen vereinigt auf ein Volumen von 500  $\mu$ l konzentriert.

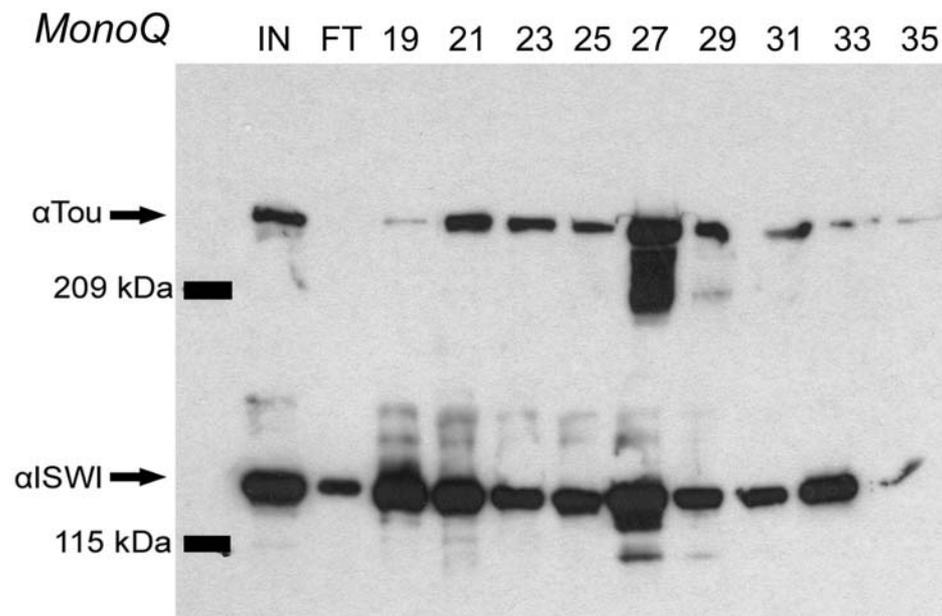


Abb. 24 Western-Blotanalyse der Fraktionen von Biorex 0.25 M nach der *MonoQ*-Anionenaustauscher-Säule: Die Spuren des SDS-PAGE (6%) wurden mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Proteinstandard, Auftrag (IN), Durchlauf (FT), Eluate der Fraktionen (19-35) bei kontinuierlicher Erhöhung der Salzkonzentration (0-1.0 M) Die Blotmembran wurde nach dem Proteintransfer, unterhalb des 209 kDa-Markers geschnitten. Die obere Hälfte wurde mit Tou-Antikörper und die untere Hälfte mit ISWI-Antikörper inkubiert. Das stärkste Tou-Signal koeluierte mit dem ISWI-Signal in den Fraktionen 21 bis 31, welche anschließend weiter gereinigt wurden.

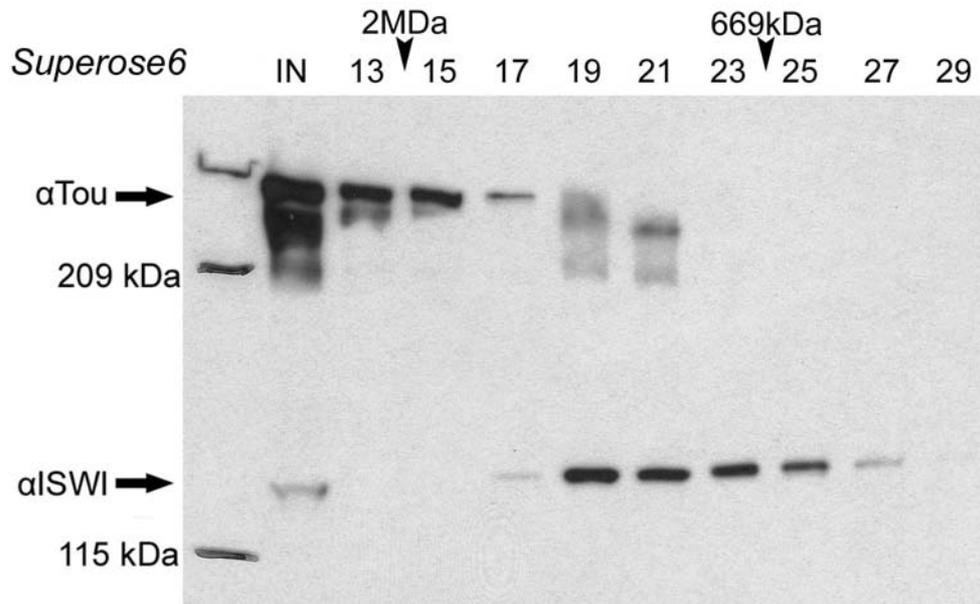


Abb. 25 Western-Blotanalyse der Fraktionen des *Drosophila*-Zellkern-Extrakts, die aus der Superose 6-Gelfiltrationssäule eluiert wurden. Die Spuren des SDS-PAGE (6%) wurden mit folgenden Proben (von links nach rechts) beladen: Proteinstandard, Auftrag (IN), Eluate der Fraktionen (13-29) entsprechend einem abnehmenden Molekulargewicht (2.0 MDa-66 kDa). Die Blotmembran wurde nach dem Proteintransfer, unterhalb des 209 kDa-Markers geschnitten. Die obere Hälfte wurde mit Tou-Antikörper und die untere Hälfte mit ISWI-Antikörper inkubiert. Hierbei wurde das Tou- vom ISWI-Signal getrennt.

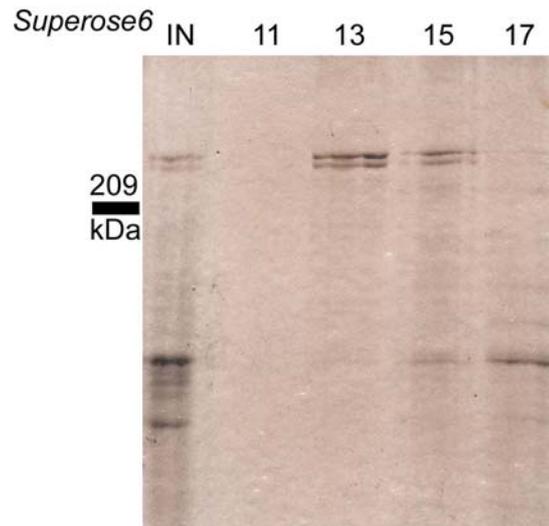
Die Anwendung der Gelfiltrationssäule Superose 6 führt nicht nur zu einer weiteren Reinigung des Materials, sondern erlaubt auch eine Bestimmung der Größe des gesamten Proteinkomplexes: Hochmolekulare Komplexe durchlaufen die Säule schneller als niedermolekulare Proteine. Komplexe mit einem Gewicht über 2 MDa finden sich im Ausschlussvolumen der Säule. Nach dieser Chromatographie fand man Tou hauptsächlich in den Fraktionen 13 bis 15, entsprechend einem Gewicht von etwa 2 MDa. Die ATPase ISWI hingegen war in den Fraktionen 19 bis 25 angereichert (Abb. 25). Somit wurde mit diesem chromatographischen Schritt Tou von ISWI getrennt. Dieses Ergebnis widerspricht der Hypothese, dass die beiden Proteine einen Komplex bilden. Deshalb kamen weitere Chromatin assoziierte ATPasen als Kandidaten für die Interaktion mit Tou in Frage.



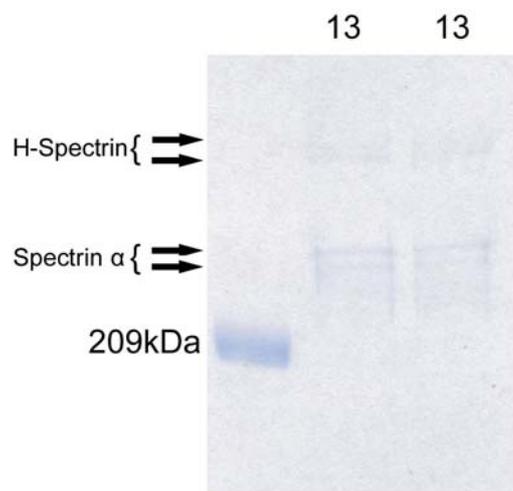
**Abb. 26** Westernblotanalyse der in Abb. 25 beschriebenen Fraktionen mit einem Brahma-Antikörper. In den Fraktionen 13-15 zeigte sich eine Koelution von Brahma und Tou.

Auf der Suche nach anderen möglichen Interaktionspartnern von Tou wurden die Western Blot Membranen mit Antikörpern gegen verschiedene ATPasen beprobt. Wie aus Abb. 26 gut ersichtlich koeluierte die ATPase Brahma in den Fraktionen 13 bis 15 mit Tou. Da die Fraktion 13 dem Ausschlussvolumen entspricht ist die Auflösung in diesem Bereich eher gering. Dagegen zeigte die ATPase Mi-2 in den Fraktionen 19 bis 23 (Daten nicht gezeigt) keine Koelution mit Toutatis.

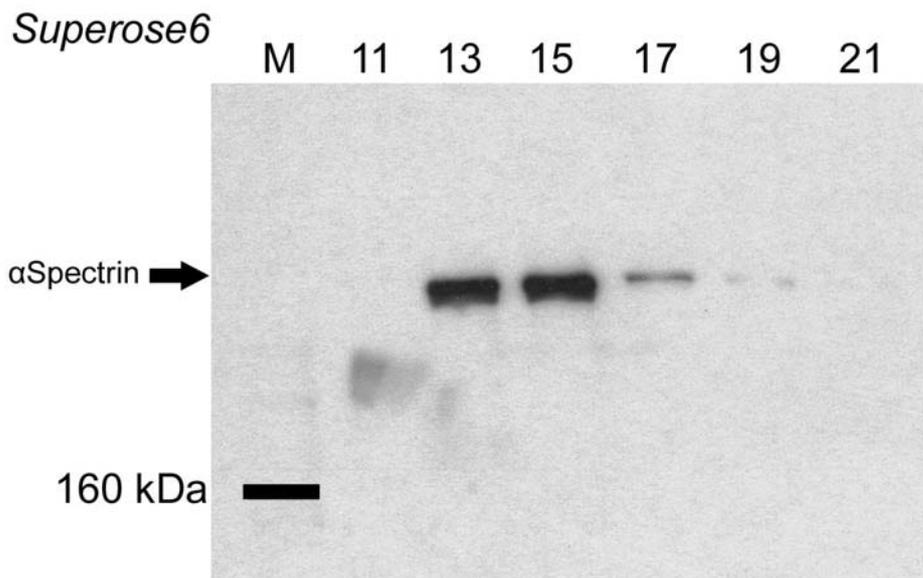
Zur Bestimmung der Reinheit und Menge des Proteins in den Tou Fraktionen nach Superose 6 wurden Aliquots dieser Fraktionen in einem 6% Gel elektrophoretisiert und anschließend mit Silber gefärbt (Abb. 28). Hierbei war eine Doppelbande, die langsamer als das 209 kDa-Markerprotein migrierte, mit geringem Hintergrund zu erkennen. Im niedermolekularen Bereich eines 15 % SDS-PAGE waren nach Silberfärbung keine weiteren Banden in den Fraktionen 13 und 15 zu erkennen. Für eine exaktere Analyse dieser Doppelbande mittels Massenspektrometrie wurde ein 6% Gel nach der Elektrophorese mit Kolloid-Coomassie gefärbt (Abb. 27). Dabei ließ sich eine zusätzliche hochmolekulare Doppelbande erkennen. Alle vier Banden wurden nach Färbung einzeln ausgeschnitten und mit MALDI-Massenspektrometrie im Zentrallabor für Proteinanalytik am Adolf Butenandt Institut analysiert. Die Peptide der unteren Banden stimmten am meisten mit Sequenzen von Spectrin alpha und die der oberen Banden mit H-Spectrin-Sequenzen überein.



**Abb. 28** Silberfärbung eines SDS-PAGE Gels (6%) der Fraktionen nach Superose 6. In den mit Tou angereicherten Fraktionen 13 und 15 befand sich jeweils eine Doppelbande mit einem Molekulargewicht von über 209 kDa.



**Abb. 27** Kolloid-Coomassie-Färbung eines SDS-PAGE der Fraktion 13 aus dem Eluat der Superose 6. Es zeigte sich eine Doppelbande, vergleichbar mit der Silberfärbung in Abb.15 und zusätzlich eine weitere Doppelbande mit höherem Molekulargewicht.



**Abb. 29** Westernblotanalyse der in Abb. 25 beschriebenen Fraktionen der Superose6-Gelfiltration mit einem Spectrin-alpha-Antikörper. In den Fraktionen 13-15 zeigte sich eine Koelution von Spectrin-alpha und Tou.

Zur Kontrolle des Ergebnisses der Massenspektrometrie wurde auch ein Western-Blot mit einem Antikörper gegen Spectrin alpha durchgeführt. Das Strukturprotein konnte dabei in den relevanten Fraktionen der Superose 6 Elution detektiert werden (Abb. 29).

Betrachtet man die Gesamtheit der Ergebnisse unserer Proteinreinigung so erhielten wir nach drei chromatographischen Schritten Fraktionen, in denen die Proteine Toutatis, Brahma und Spectrin alpha mit Antikörpern nachgewiesen werden konnten. Spectrin alpha konnte zusätzlich durch Massenspektrometrie nachgewiesen. Ein Nachweis von Toutatis und Brahma ist mit dieser Methode bisher noch nicht gelungen.

#### 4.5 Immunfluoreszenz

Neben der Anwendung im Western-Blot kann mit den von uns entwickelten Antikörpern gegen Toutatis das Protein auch in fixierten *Drosophila* Zellen detektiert werden. Wenn der sekundäre Antikörper an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, um die Lokalisation des Proteins sichtbar zu machen, spricht man von einer Immunfluoreszenz (IF). Wir haben verschiedene Klone der Toutatis Antikörper (4D11, 6C7, 2G2, 2C10, 1C8) in der IF getestet und anschließend das Protokoll der Färbung optimiert. Alle getesteten Antikörper erzeugten ein ringförmiges Signal im Bereich des Zellkerns. Durch eine Überlagerung des Toutatis-Signals mit der DNA-Färbung wird deutlich, dass die Toutatis-Antikörper die Peripherie des Nukleus färben. Das gefärbte Areal entspricht somit einer Lokalisation des Proteins im Bereich der Kernmembran. Die verschiedenen Klone des Antikörpers unterschieden sich lediglich in der Intensität der Hintergrundfärbung des Zytoplasmas (Daten nicht gezeigt). IF-Experimente mit dem Klon 6C7 erzeugten das Signal mit der geringsten Hintergrundfärbung. Das Ergebnis ist in Abb. 30 dargestellt.

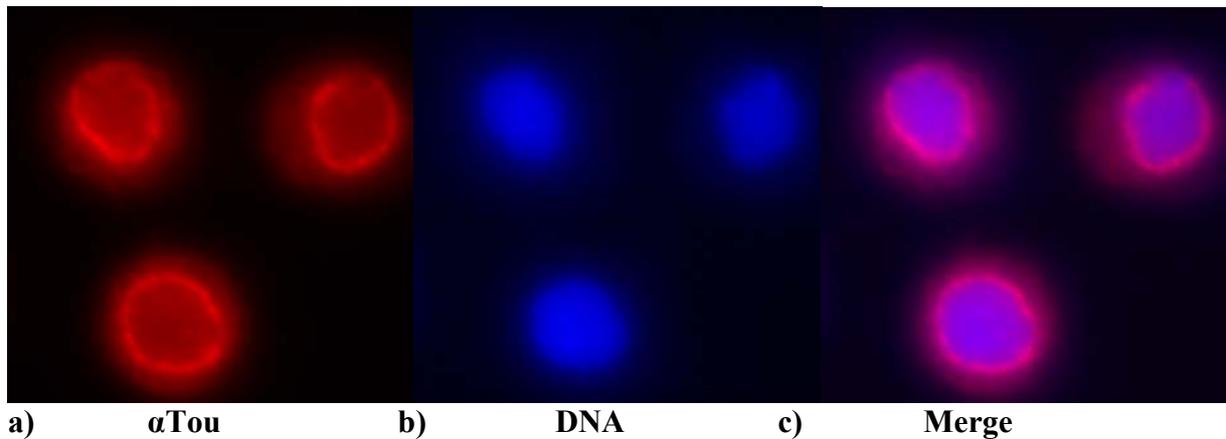


Abb. 30 Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Toutatis (a) im Vergleich zur DNA-Färbung (b) in *Drosophila* Schneiderzellen. Bei der Überlagerung der beiden Färbungen (c) erkennt man, dass das Toutatis-Signal ringförmig im Bereich der Kernmembran lokalisiert ist.

## 5 Diskussion

### 5.1 Welche Rolle spielt ISWI in den Zellen des Prostatakarzinoms?

Mit der quantitativen Analyse der Immunfärbung konnten wir zeigen, dass in den bösartigen Epithelzellen des PCa sowie der PIN signifikant mehr ISWI-Protein vorhanden ist, als in den gutartigen Epithelzellen der BPH. Ob es sich bei der Ursache dieser Beobachtung um eine vermehrte Expression des Proteins handelt, oder lediglich um eine Akkumulierung des Proteins wegen des verkürzten Zellzyklus der neoplastischen Zellen, bleibt jedoch unklar. Um diese Frage zu beantworten, müsste die Transkription der ISWI kodierenden Gene mit Hilfe von RNA-Analysen in normalen und malignen Zellen untersucht werden. Der von uns verwendete Antikörper unterscheidet nicht zwischen Snf2H und Snf2L, den beiden Isoformen von ISWI. Da Snf2H vermehrt in proliferierenden Zellen exprimiert wird und Snf2L hingegen in Nervenzellen angereichert ist, kann man annehmen, dass wir bei unseren Experimenten im Prostatagewebe vor allem Snf2H detektiert haben (65-67;76). Um diese Hypothese zu bestätigen, sollte man die Experimente allerdings mit Antikörpern, die jeweils nur eine der beiden Isoformen erkennen, wiederholen. Nachdem die wachsende Familie der ISWI Chromatin *Remodelling* Komplexe eine Vielzahl von verschiedenen Faktoren enthält (siehe Abb. 5), wäre es interessant, die Interaktionspartner der ATPase ISWI ebenfalls im Prostata-Modell auf der Protein- sowie auf der RNA-Ebene zu untersuchen. Vor allem hAcf1 sollte untersucht werden, weil es zusammen mit Snf2H die Replikation der DNA beschleunigt (75). Auch WSTF, das Snf2H bei der Replikation rekrutiert, wäre von Interesse (155). So könnte man wertvolle Einblicke in die Vorgänge der Chromatinregulation während der Krebsentstehung, gewinnen.

Betrachtet man unser Ergebnis im Kontext der DNA-Methylierung, so sieht man einen simultanen Anstieg des ISWI-Signals und des 5-Methyl-Cytidin-Signals beim Vergleich von BPH und LPIN (siehe Abb. 15a,b bzw. Abb. 16b). Die Methylierung von CpG-Islands in der Promotorregion von Genen, die Tumorsuppressor- oder *Caretaker*-Proteine kodieren, wurde bereits als Mechanismus des neoplastischen Wachstums identifiziert (110) (Abschnitt 1.1.2.). Es sind noch nicht alle Details der Inaktivierung von Genen durch DNA-Methylierung erforscht, aber es gibt Hinweise, dass Chromatin *Remodelling* Faktoren sowie Histon modifizierende Enzyme daran beteiligt sind. Eine vorgeschlagene Funktion von ISWI als Repressor der Transkription unterstützt dieses Modell (69;74) (Abschnitt 1.1.4.).

Neben der DNA-Methylierung ist die Histon-Acetylierung ein wichtiger epigenetischer Marker, der in unserem TMA von El Far et al. mit einem Antikörper gegen AcH3K9 untersucht wurde. Interessanter Weise korrelierte die höchste SumD des AcH3K9-Signals mit einer hohen SumD des ISWI-Signals im PCa, verglichen mit der BPH-Kontrolle (siehe Abb. 15a,b bzw. Abb. 16a). Eine lange Liste von Experimenten, *in vitro* und *in vivo*, zeigten bereits einen direkten Zusammenhang zwischen bestimmten Acetylierungsmustern und vermehrter Transkription von Genen (22;32). Wichtig für die Erkennung solcher Acetylierungsmuster ist die sogenannte Bromodomäne. Die regulatorischen Untereinheiten der ISWI-Faktoren, wie ACF1, Tip5, WSTF und NURF301, enthalten eine Bromodomäne (siehe Abb. 6). Für andere Chromatin assoziierte Proteine konnte schon bestätigt werden, dass die Bromodomäne spezifisch an acetylierte Lysin-Reste bindet (29;30;50) (Abschnitt 1.1.3). Deshalb ist H3K9-Acetylierung ein möglicher Mechanismus der ISWI-Rekrutierung in Krebszellen. Allerdings ist zu beachten, dass die malignen Nuclei, im Vergleich zu normalen Nuclei, oft größere Mengen aneuploide DNA in Form von Chromatin enthalten. Dies zeigte sich in der Hämatoxylin-Färbung des TMA, welche die DNA jedoch nur annähernd stöchiometrisch färbt (siehe Abb. 16c). Bei der Messung der H3K9-Acetylierung darf man nicht vergessen, dass aneuploides Chromatin auch mehr Histone enthält. Um diesen Unterschied zu berücksichtigen, müsste man ebenfalls die Menge an Histon H3 in den Krebszellen messen. Nur so könnte man feststellen, ob H3K9 in den Krebszellen hyperacetyliert ist, oder ob lediglich mehr Histon H3 und somit auch mehr AcH3K9 vorhanden ist.

Die malignen Nuclei enthalten nicht nur mehr DNA, sondern auch die Morphologie der Zellkerne ist auf Grund von unterschiedlicher Verteilung des Chromatins verändert (144). Es ist interessant sich vorzustellen, dass ISWI-Aktivität benötigt wird, um große Mengen an Chromatin in Krebszellen zu packen und die strukturelle Verdichtung der DNA zu erhalten. Eine derartige Regulation von Chromatinstrukturen höherer Ordnung durch ISWI wurde bereits vorgeschlagen (65) (Abschnitt 1.1.4). *Nuclear Texture Features*, welche die Verteilung der ISWI-Immunfärbung im Zellkern darstellen, waren signifikant verschieden in BPH und PCa. Das *Entropy Feature* beispielsweise erhöhte sich von BPH zu PCa (siehe Abb. 15d). Dies ist ein Hinweis, dass die Verteilung des Proteins in Krebszellen weniger organisiert ist als in gesunden Zellen. Um einen tieferen Einblick in das Verhältnis von ISWI-Verteilung und Chromatin-Organisation zu gewinnen, wären Immunfluoreszenz Experimente, die verschiedene Färbungen in demselben Zellkern erlauben, ein sinnvoller Ansatz.

Die durch unsere Experimente gezeigte Korrelation zwischen Malignität der PCa Zellen und vermehrtem Vorhandensein von ISWI, verleiht dem Protein das Potential als Marker für

Proliferation bzw. Malignität eingesetzt zu werden. Ein Vergleich mit Standardmarkern, wie z.B. Ki-67, sollte deshalb durchgeführt werden. Ob sich dieses Phänomen auf das PCa beschränkt oder auch in anderen Krebserkrankungen beobachtet werden kann, lässt sich ohne Versuche mit anderen Gewebeproben kaum abschätzen. Ebenso ist es momentan schwer zu erkennen, ob die Anreicherung von ISWI in den PCa Zellen ursächlich mit der Erkrankung zusammenhängt oder ob es sich eher um einen sekundäres Ereignis handelt. Nachdem die klinischen Daten von unseren Gewebeproben nicht zur Verfügung standen, sind weitere Studien nötig, um herauszufinden, ob die ISWI-Färbung auch prognostischen Wert für neoplastische Veränderungen in der Prostata besitzt.

## **5.2 Ist Toutatis Teil eines DNA Reparatur Komplexes?**

Das Ergebnis der ISWI-Studie im PCa zeigte, dass Antikörper gegen Chromatin *Remodelling* Faktoren sowohl für die Krebsdiagnostik als auch für die molekulare Erforschung der Krebsentstehung ein nützliches Werkzeug sein können. Die meisten ISWI-enthaltenden Komplexe wurden zuerst in *Drosophila* entdeckt und charakterisiert (siehe Abb. 5). Deshalb haben wir im Modell der Fruchtfliege Antikörper gegen das neue Protein Toutatis, das eine ähnliche Domänenarchitektur wie bekannte Interaktionspartner von ISWI hat (siehe Abb. 6, Abschnitt 1.1.5), entwickelt. Mit Hilfe dieser Antikörper wollten wir herausfinden, ob Toutatis, ähnlich wie andere Proteine der BAZ/WAL-Familie, einen Komplex mit ISWI bildet.

Das Western-Blot Signal der Toutatis Antikörper entspricht einem Molekulargewicht von etwa 250 kDa, passend zu der aus der Sequenz berechneten Größe des Proteins. Bei der Proteinreinigung aus *Drosophila* Embryonen wurde das Tou-Signal nach dem zweiten chromatographischen Schritt von dem mutmaßlichen Interaktionspartner ISWI getrennt (siehe Abb. 25, Abschnitt 2.2.9). Die Trennung von ISWI macht eine Komplexbildung von Toutatis und dieser ATPase sehr unwahrscheinlich. Deshalb suchten wir mit spezifischen Antikörpern in den relevanten Fraktionen nach anderen bekannten Chromatin *Remodelling* ATPasen, die möglicherweise mit Tou interagieren. Nach der anschließenden Gelfiltration fanden wir die ATPase Brahma in den Fraktionen mit Tou-Signal (siehe Abb. 26, Abschnitt 2.2.9). *Drosophila* Brahma ist homolog zu BRG1 (Brahma related Gene 1) beim Menschen und gehört, ebenso wie Toutatis zur Gruppe der Trithorax-Proteine (52) (Abschnitt 1.1.3). Auf Grund der geringen Auflösung der Gelfiltration im hochmolekularen Bereich ist es allerdings zu früh, um von dieser Koelution auf einen Tou-Brahma Komplex zu schließen. Durch die

anschließend durchgeführte Massenspektrometrie der Coomassie-färbbaren Banden in den Fraktionen, in denen Tou und Brahma koeluierten, konnte Spectrin-alpha nachgewiesen werden. Spectrin-alpha hat ein ähnliches Molekulargewicht wie Tou und ist ein Strukturprotein der Zell- sowie der Kernmembran. Verschiedene Spectrine bilden zusammen ein Netzwerk in dem Membranproteine verankert werden können (161). Kürzlich wurde im Maus-Modell gezeigt, dass Spectrin-alpha benötigt wird, um die DNA Reparatur Proteine XPF und FANCA, zu rekrutieren (162). Durch die experimentelle Behandlung von Säugetierzellen mit Psoralen und UVA-Licht entstehen Querverbindungen, sogenannte *Cross-Links*, zwischen den komplementären DNA-Strängen. Verfolgt man Spectrin-alpha mittels Immunfluoreszenz während der Induktion von DNA-*Cross Links*, so kann man beobachten, wie das Protein aus der Kernmembran zu nukleären Foci wandert, wo XPF und FANCA im Zusammenspiel die geschädigte DNA reparieren. Das FANCA Protein ist, neben anderen Proteinen, bei der Fanconi Anämie mutiert. Diese seltene Erbkrankheit ist durch aplastische Anämie, Entwicklungsstörungen und erhöhtes Krebsrisiko gekennzeichnet (163). Das vermehrte Auftreten von Krebserkrankungen lässt sich durch ein Versagen von DNA Reparaturmechanismen, bei denen FANCA eine wichtige Rolle spielt, erklären. XPF ist eine Endonuklease, mit der Funktion die DNA *Cross-Links* herauszuschneiden (164). Die Tatsache, dass in FANCA mutierten Zellen die *Cross-Links* nicht herausgeschnitten werden können und dass solche Zellen weniger Spectrin-alpha enthalten, unterstreicht das Zusammenspiel dieser drei Faktoren bei der DNA Reparatur (165). Es ist wahrscheinlich, dass dieser DNA Reparatur Komplex die Aktivität von Chromatin *Remodelling* Komplexen benötigt, um Zugang zu den geschädigten DNA-Abschnitten zu erhalten. Eine Interaktion zwischen FANCA und BRG1, der Chromatin *Remodelling* ATPase des SWI/SNF Komplexes sowie die gemeinsame Lokalisation der beiden Proteine im Zellkern konnte bereits bestätigt werden (166). Betrachtet man unsere Proteinreinigung im Kontext dieser Daten, so kann man sich bei einer Koelution von Spectrin alpha, Brahma und Toutatis einen neuen DNA Reparatur Komplex in *Drosophila* gut vorstellen. Es sind jedoch weitere chromatographische Schritte nötig, um diese Hypothese zu bestätigen. Interessanterweise ergab die Immunfluoreszenz mit den Toutatis Antikörpern in *Drosophila* Schneiderzellen ein ringförmiges Signal, entsprechend einer Lokalisation des Proteins in der nukleären Lamina, die ebenfalls Spectrin alpha enthält (siehe Abb. 30). Die Koelution von Toutatis und Brahma passt allerdings nicht zu unserer ursprünglichen Annahme, dass Tou mit der Chromatin *Remodelling* ATPase ISWI regulatorisch interagiert. Nachdem die mit Toutatis eng verwandten Proteine Acf1, WSTF, NURF301 und Tip5 alle mit ISWI interagieren, wäre es

eher ungewöhnlich, dass ein Mitglied dieser Familie mit einer anderen ATPase assoziiert ist (siehe Kapitel 1.1.5). Lediglich für WSTF gibt es Hinweise, dass es bei verschiedenen Proteinreinigungen nicht nur mit ISWI sondern auch mit BRG1 assoziiert sein kann, was allerdings umstritten ist (68;81). Um eine Interaktion von Toutatis, Brahma und Spectrin alpha zu bestätigen, reichen unsere bisherigen Experimente nicht aus. Deshalb sollten mit den relevanten Fraktionen weitere Reinigungsschritte und außerdem Immunpräzipitationen durchgeführt werden. Da ein Nachweis von Brahma und Toutatis mit Hilfe von Massenspektrometrie bisher nicht gelungen ist, wäre es sinnvoll, die Proteinreinigung mit größeren Mengen an Protein zu wiederholen und erneut eine massenspektrometrische Analyse durchzuführen. Mit dieser Methode ließe sich die Spezifität unserer Antikörper für Toutatis beweisen und eine Kreuzreaktivität mit Spectrin alpha, welches ein ähnliches Molekulargewicht wie Tou hat, könnte mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Auf Grund der oben erwähnten Daten aus dem Säugetier, haben wir in den relevanten Fraktionen nach weiteren Proteinen mit Ähnlichkeit zu den Komponenten des im Säugetier bekannten DNA Reparatur Komplexes, bestehend aus Spectrin alpha, XFP und FANCA, gesucht. Das *Drosophila* Homolog zur Endonuklease XPF ist das meiotische Rekombinationsprotein Mei-9 (167). Bei Versuchen mit spezifischen Antikörpern gegen Mei-9 haben wir in den Fraktionen von Interesse jedoch kein Western Blot Signal erhalten. Ein entsprechend homologes Protein zu FANCA ist in *Drosophila* nicht bekannt. Auch funktionelle Studien könnten einen Hinweis geben, ob der mutmaßliche Komplex mit den Untereinheiten Toutatis, Brahma und Spectrin tatsächlich existiert. Einerseits sollte mit Immunfluoreszenz untersucht werden, ob die Proteine durch die Induktion von DNA *Cross-Links* in *Drosophila* Zellen zu den geschädigten DNA-Abschnitten rekrutiert werden. Für den Fall, dass mit Hilfe weiterer Chromatographien eine effektive Anreicherung der Proteine aus *Drosophila* Embryonen gelingen sollte, schlagen wir vor, die enzymatische Aktivität der ATPase Brahma in den gereinigten Fraktionen zu bestimmen und die Toutatis-Brahma Chromatin *Remodelling* Aktivität mit Hilfe eines sogenannten *Nucleosome Sliding Assays* zu testen. Beim *Nucleosome Sliding Assay* können einzelne Nucleosomen *in vitro* auf einem kurzen DNA-Abschnitt mobilisiert werden (168). Diese Schlibberbewegung ist ein Indikator für die Gegenwart von aktiven Chromatin *Remodelling* Faktoren. Nachdem die Anreicherung der nativen Proteine aus *Drosophila* Embryonen nicht nur sehr aufwändig ist, sondern auch die enzymatische Aktivität der Proteine schnell verloren gehen kann, wäre es sinnvoll, für die funktionellen Studien rekombinante Proteine herzustellen.

Die Erforschung des komplexen Zusammenhangs von Chromatin *Remodelling* und DNA Reparatur in dem diskutierten Zusammenhang wird das grundlegende Verständnis der Regulation des Erbguts in Form von Chromatin fördern und ferner ermöglichen, dieses Wissen langfristig in medizinischen Fortschritt zu verwandeln.

## 6 Zusammenfassung

Die Organisation der DNA in Nukleosomen hat einen großen Einfluss auf die Regulation von grundlegenden Prozessen wie Transkription, Replikation oder Reparatur der DNA im Zellkern. Um die hinderliche Natur des Chromatins bei diesen fundamentalen Prozessen zu überwinden, existieren mehrere verschiedene Chromatin modifizierende Proteinkomplexe im Zellkern. Chromatin *Remodelling* Komplexe nützen die Energie der ATP-Hydrolyse um die Position der Nukleosomen so zu verändern, dass verschiedene Abschnitte der DNA für die Interaktion mit regulierenden Faktoren zugänglich werden. Ein Klasse solcher Remodelling Faktoren beinhalten die ATPase ISWI als katalytische Untereinheit. Das Protein wurde zuerst in *Drosophila* entdeckt und die drei verschiedenen ISWI enthaltenden Komplexe, nämlich NURF, ACF und CHRAC, wurden ausführlich in diesem Modellorganismus untersucht. Homolog zur Fruchtfliege existieren sehr ähnliche Protein Komplexe beim Menschen. Wir haben das humane ISWI mit den Isoformen Snf2h und Snf2L im Prostatakarzinom untersucht. In einem *Tissue Microarray* wurden Gewebeprobe mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern gegen ISWI gefärbt. Es folgte ein quantitativer Vergleich der Färbungsintensitäten im Karzinomgewebe sowie in gutartigem Gewebe der Prostata durch Anwendung von digitaler Bildanalyse. Das Ergebnis war eine signifikant stärkere Färbung im neoplastischen Gewebe. Eine Anreicherung von ISWI in Krebszellen ist besonders interessant im Kontext der bekannten Funktionen des Proteins für DNA-Replikation, Zellproliferation und Regulation der Chromatinstruktur.

In einem zweiten Projekt sind wir zum Modell der Fruchtfliege zurückgekehrt und entwickelten monoklonale Antikörper gegen Toutatis, das zu einer Proteinfamilie gehört, die auch einige bekannte Interaktionspartner von ISWI umfasst. Die Proteine dieser Familie haben vermutlich eine regulatorische Funktion in den *Remodelling* Komplexen, denn am Beispiel von Acf1 wurde gezeigt, dass sie die nukleosomale Bindung sowie die Effizienz und Richtung der Mobilisierung von Nukleosomen modifizieren. Unsere Antikörper wurden etabliert, um Toutatis enthaltende Komplexe durch Western Blot Analyse von gereinigten *Drosophila*-Extrakten und Immunfluoreszenz zu charakterisieren. Mit diesen Methoden fanden wir eine Koelution von Toutatis mit der ATPase Brahma und dem Strukturprotein Spectrin alpha sowie eine Lokalisation in der Lamina des Zellkerns. Ein mögliches Zusammenspiel dieser Proteine in einem neuen Chromatin *Remodelling* Komplex mit einer Beteiligung an der DNA-Reparatur wird diskutiert.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

$\alpha$	Anti-
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosyltriphosphat
Bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	Bovine Serum Albumine
BPH	Benigne Prostata Hyperplasie
C-Terminus	Carboxy-Terminus Proteins
d(Proteinname)	Drosophila melanogaster
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal calf serum
h(Proteinname)	human
H3K9	Lysin 9 im Histon H3
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
IF	Immunfluoreszenz
ICH	Immunhistochemie
MRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIN	Intraepitheliale Neoplasie der Prostata
Pca	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVDF	Polyvinylidenedifluoride
RNA	Ribonucleicacid
Rpm	Revolutions per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMA	Tissue Microarray
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## 7.2 Materialien

### 7.2.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Produkt	Bezogen von
▪ 1,5 ml-Reaktionsgefäße	Greiner
▪ 1,5-, 3,5- und 5 ml-Reagenzröhrchen	Sarstedt
▪ 15- und 50 ml-Gefäße	Sarstedt
▪ 250 ml-Zentrifugationsgefäße (steril)	Corning
▪ BioRex 70-Material	BioRad
▪ Dialyseschläuche	Spectrum
▪ Elektroporationsküvetten	Molecular Bio Products
▪ Entwicklerlösung für Western Blots (ECL)	Amersham Biosciences
▪ Entwicklerlösung für Immunhistochemie mit Peroxidase-System (Envision)	Dako Corporation
▪ Feinchemikalien, Lösungsmittel und Medienzusätze	Sigma, Roth, Merck, Difco, BD
▪ Filter (0,45 und 0,22 µm)	Roth
▪ Filterpapier Whatman 3 MM	Whatman
▪ HA-Agarose-beads	Roche
▪ Hybond N+ (PVDF)-Membran	Amersham Biosciences
▪ Medium für Drosophilazellen (Schneiders Drosophila Medium)	Gibco Invitrogen
▪ Pasteurpipetten	Roth
▪ PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml und 0,5 ml	Biozym und GeneAmp
▪ Photometerküvetten	Sarstedt
▪ Pipettenspitzen	Sörensen
▪ Proteinkonzentrationsröhrchen	Pall Filtron
▪ Röntgenfilme	Fuji
▪ SDS-Einmalgkassetten	Invitrogen
▪ Silikonisierte 1,5 ml-Reaktionsgefäße	Biozym
▪ Spritzen und Zubehör	Becton Dickinson
▪ Talonbeads	BD Biosciences

▪ Vorgefertigte Säulen für Chromatographie-System	Pharmacia
▪ Zellkulturschalen und -flaschen	Greiner
▪ Kolloidales Coomassie	Novex, Invitrogen
▪ Desoxyribonukleotide	Roche
▪ Proteaseinhibitoren (Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, PMSF)	Roche
▪ QuickSpin Säulchen	Boehringer Mannheim
▪ ProteinG/A-Sepharose (Protein G/A-beads)	Pharmacia Biotech

### 7.2.2 Vektoren und Konstrukte

Name	Tag	Bezogen von
pET15b	6x his	Novagen

### 7.2.3 Primer

Alle Primer wurden von MWG bezogen.

Name	Sequenz
Tou1-forw.	(5'-GGG GGG GCA TAT GGA ACT CAC CTT GGA CTC GCA G-3')
Tou1-rev.	(5'-GGG GAT CCC ATA ATG CTC TTG TCC CAA GC-3')
Tou2-forw.	(5'-GGG GGG GCA TAT GAT CTC CCG GGC GCC TCC G-3')
Tou2-rev.	(5'-GGG GAT CCC TTG CAG ACA GCC AGC TCC T-3')

### 7.2.4 Bakterienstämme

Für Klonierungen, Plasmidamplifikationen und Proteinexpressionen wurde *E. coli* BL21 (DE3) pLysS von Stratagene verwendet.

**Genotyp:**

- **BL21 (DE3) pLysS:** *E. coli* B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal λ* (DE3), Referenz Studier et al. 1990 (169)

### 7.2.5 Zelllinien

Es wurden *Drosophila* Schneider Zellen (S12) für Immunfluoreszenz verwendet.

### 7.2.6 Antikörper

Antikörper	Bezogen von	Verdünnung	Zweitantikörper
▪ $\alpha$ -Dm Brahma	Peter Verijzer	1 : 1000	$\alpha$ -Rabbit
▪ $\alpha$ -Dm ISWI	John Tamcun	1 : 1000	$\alpha$ -Rabbit
▪ $\alpha$ -Dm Tou	Eigene Produktion	1 : 10	$\alpha$ -Rat
▪ $\alpha$ -Dm Spectrin	Ron Dubreuille	1 : 1000	$\alpha$ -Rabbit
▪ $\alpha$ -His	Qiagen	1 : 1000	$\alpha$ -Rabbit
▪ $\alpha$ -hISWI	Patrick Varga-Weisz	1 : 500	$\alpha$ -Rabbit

### 7.2.7 Enzyme und Kits

Produkt	Bezogen von
▪ Expand High Fidelity Kit	Roche
▪ Klenow-Enzym	NEB
▪ Plasmidisolations-Kit	Qiagen
▪ Quik Change Mutagenesis Kit	Stratagene
▪ Restriktionsendonukleasen	Roche, NEB, Fermentas
▪ Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega
▪ T4 DNA-Ligase	NEB
▪ Taq Polymerase	Promega
▪ Trypsin (modifiziert, zum Sequenzieren)	Promega

### 7.2.8 Geräte

Gerät	Bezogen von
▪ -80°-Schränke	GFL
▪ Agarosegelkammern	EMBL Heidelberg und Eigenbau der Werkstatt des Butenandt-Institutes
▪ Autoklav	H+P
▪ Bakterieninkubator/Schüttler	New Brunswick Scientific
▪ Chromatographiesystem „Äkta“	Amersham Pharmacia Biotech
▪ Drehrad	neoLab
▪ Elektroporationsgerät	BioRad

▪ Entwickler für Röntgenfilme	Agfa
▪ Filmkassetten	Appligene
▪ French Press	Thermo Spectronic
▪ Geigerzähler	Genitron
▪ Geldokumentationssystem	Pharmacia Biotech
▪ Geltrockner	BioRad
▪ Homogenisierer	Yamato
▪ Inkubator für <i>Drosophila</i> -Käfige	Bavaria
▪ Kameras	Chip CCD IRIS model DXC-930P (Sony), DC300 (Leica), <i>Regita Exi</i> (Q imaging)
▪ Laborschüttler	Roth
▪ Labor-Tischzentrifuge	Eppendorf (Modell 5415 C) Heraeus (Biofuge pico)
▪ Labor-Zentrifugen	Sorvall (Modell RC5C), Heraeus/Kendro (Cryofuge 6000i)
▪ Leitfähigkeitsmesser	Hanna Instruments
▪ Lichtmikroskop Zellkultur	Zeiss
▪ Luminometer	Berthold
▪ Manual Arrayer	Beecher Instruments Inc,
▪ Mikroliterpipetten	Gilson
▪ Mikroskope	DMLB (Leica), Orthoplan (Leitz), Axiophot (Zeiss)
▪ Mikrowelle	LG
▪ PCR-Maschine	MWG, HP
▪ pH-Meter	Mettler Toledo
▪ Power Supplies	Pharmacia, Consort, BioRad
▪ Reinstwasseranlage	Elga Labwater
▪ Rotoren	SS34, Super-LiteGSA (Sorvall DuPont), Ti50, TLA55 (Beckman)
▪ Rührer	Heidolph
▪ SDS-Gelkammern und Western Blot-System	Novex, BioRad
▪ Sterilwerkbänke	PMV
▪ Szintillationszähler mit Drucker	Beckman

▪ Thermomixer	Eppendorf
▪ Ultraschallgerät	Branson
▪ Ultrazentrifugen	Beckman Coulter (Optima Max-E und Optima LE-80K)
▪ UV-Meter	Pharmacia Biotech
▪ UV-Transilluminatoren	Bachofer
▪ Vortexer	Bachofer
▪ Wärmeschrank 26°C <i>Drosophila</i> -Zellen	LMS
▪ Wärmeschrank 37°C Bakterien	Memmert
▪ Wasserbad	Braun

### 7.2.9 Software

Programm	Hersteller
▪ DNA Strider 1.2	
▪ Excel	Microsoft
▪ KS400	Imaging Associates Ltd. UK
▪ Photoshop 6.0	Adobe
▪ Reference Manager 10.0	ISI Research Soft
▪ SPSS for Windows 11.0	SPSS Inc.
▪ Word	Microsoft

### 7.3 Proteinsequenzen

>DmTOU							
1	MNKNAGDGSD	GKNSNKNSNA	GGGGGAGGPH	DPTGLLDAAS	LFAYWGRDPT	GAAAAAASNP	
61	LFNSQFNAAA	AAGLGLLPQA	GGASANDRYS	MAAAAAAAG	AHHHQNTMAV	AASQAASLAG	
121	LHPASWWMA	QLAAQDYFSR	LQASGLSPFP	HPDLAAAFGP	AGMGMGGGAG	GAGAGGGGAG	
181	VLGQGGGGNG	GSNGGGGSS	SGSSGSKSNK	SRKEKRAAQ	QQQQQQNLAN	SLNAAAAAAA	
241	AAAANNPAAA	LASMHGFGVG	VPGTSIPSVS	TGSGSISTNS	GGHGSYKSTA	SAYGKPSTMT	
301	SSSMANNPGS	AYDPVTLHKE	LLAMQAVAAA	ASGSGSSGSS	GKKSGGGGSS	SSSMHSLGMG	
361	IGGSGGMMSS	GKASTSVSAS	NSSLGGMHPS	LTSSNPLMSP	HAGMGSSSSS	SSKDRDKNNP	
421	SLNALNLSLQ	FGALGMTPQQ	SMQAAMNAFA	ASTGVSPSAT	VTSSPHHSSQ	QQQQMGGNSS	
481	TSGSGKSSSK	DYMMGTGSEH	PSLLGVRLPP	DTEIIKYTSS	IVGPKIPGTT	SRGRKKTISE	
541	TEQQTTQQQQ	KQQHQAEQHL	LQQQQQAQKE	LDSTKNAISS	LLAFPGLSPA	KRARLEMEYA	
601	MAAAAQQQH	QQAQQQHQAQ	QQLHGMLGAA	GIPGMAGLVA	LPGMMSGNPLD	QLSVSKASSS	
661	TAPTTSTSSS	SAGSNLLNQS	NSDRVEVIKL	PPTITSNLAY	NLSSKGKEVH	DLTTDMATNS	
721	GGVNLSLKSN	AGSSALTPSG	AVGSASNPIT	IDDFDAPLNL	SMKPSDKSNS	SSSNAAAGGS	
781	SSSAALANL	ASDYQAASSG	QSGNSLQSL	SITAALGGTG	GMPGGSISGS	GGTSPAPAGA	
841	GSGATGGGSG	SGGSGGGSSS	YKEGRPRNLG	RGVSKPKKNT	VASLLAQSRA	VGLKPMPLATQ	
901	QLLQQGADIE	KIRLALSEAN	AHMETSTDS	SVAAESGLSE	SESEDANILN	VAELRVPLEL	
961	GWKRETVIRG	LTKQQQIRGE	VTYYAPGSTT	PLKSNQGVFA	ILEQQPSNLS	RENFSVFLRA	MBD
1021	IVGSFLQPAP	PPYANDGEYI	RMTDEDVAKR	LEDLKVFTRO	TLNVEQRIEI	AKQQQAMRDA	
1081	KKLQKEELAR	NKEKARQEK	SKLEQQRKDK	ELKNQQAVER	RERRRQHMSL	IRMLELRRKF	
1141	EDREKKKHQL	VLDRLLLRER	RMAERKRDAE	ILQLIRRPNE	DSEMPQELVI	PELDRIAGNR	LH
1201	LPGQAMADLL	MVFEFLHNF	ETLGFDMESL	PSLQNLHDAL	MSDSNADAE	ELLSVMTHLL	DDT
1261	VCAIEDPGVP	NPGRHTTLLG	QSLRNADITN	SNVSEILRIY	LYATATGEVR	QMHGITVDRE	seil
1321	RERRVPDHHQ	LDSDTTTHSH	SVKNQEYIKL	LHENDTWKLS	QSLKDRPFVA	LNPTRKAQML	
1381	AHLCDNLLMN	KAVLRQIDGS	LETCAQMRKE	KYMTDMKVRK	YKALHMRKAR	IEAYERAQAE	
1441	REAAQALMA	QQKLDARLK	AEEEEAAAA	EEAAAAAGTD	GEATKGGSPN	GEKPEDGDQN	
1501	EEGAKEPQQ	QQQPMEVDG	VVDEASLVSP	AKTIIQTDNS	LTPSKQDMPT	PTYQINGSST	
1561	PTTSGVTGGD	MNVLLQAKKS	GARNSINDEH	HHDVSIIDDD	LSDLLDSEITN	VEEDEDNRLS	
1621	ADELQKKLKD	IVRASLNCKE	ALEKSTNQLR	AACFQGDRFW	RRYWKLPKAG	GIFIEALES	BAZ1
1681	QNDICDYHEA	LEAMDDKDA	NDEKENSENE	KDVAAESSE	PMEVDESITK	LEDGVPASDV	
1741	GMPESNQQNA	HQDEEDDDDD	VTEINKVEPE	IVDLGDDDDD	AAPPLPKIEP	PRPEIKVKSE	
1801	MELMGPPPTT	MISTKTDFEA	EIKIPSMPGI	LMPPTLNNNN	TNNNNNNNGS	DNCCKLETGL	
1861	GLGQQQNF	QSVIKTEDVK	KEDDCIIVST	SSVDDTPKWF	SIVRREVPLI	SELPAEEGGV	
1921	VGQELQISYA	NQNCSAQLQL	QGHPWDLINN	MQYYSIPMDE	CKVDTSKLGN	ECIFSLSGLD	
1981	EKQMLAKVE	YKAHKVESKN	GLGSPHRHHE	TKDDEEQAKL	KLDKEIDTEM	ETDADDLAGK	
2041	EKFRLRSDV	PPDTGGGVSE	GTDVKPKIEL	RLDEALSQAY	YHNIANMSLS	YVQTYIPIDI	
2101	PLPLSMTPE	HRLLEQVKLA	GFPERVHGVY	VPRRQRYGWW	QLDDEQKLRQ	LLKTLNPSGL	BAZ2
2161	RERELQENLQ	RFLGLEQPLG	VNYKLSKSID	FPEEFMLPDK	KGDWNPVKVAK	RVELALIEQL	
2221	ESLEDKVASA	SMQLKNWQLP	NRVESELTLD	SQEDVTEEDF	VSIIPMIRER	IIDLEANIER	
2281	RYLKPPPLGSQ	TGDAHLAVIA	QNQHTTTQTQ	NSASAAAYLL	QMQQQQQQQQ	LAQQQQQQQQ	TOU1
2341	GSGAGNSLNP	SSFNERTMAL	AAAAASGPG	NATGVANSVA	VAGATPCESG	SSEPNSGNAS	
2401	PASNCDSRD	EKVEQIPKGL	VQWRDAVRS	HTTAQLAMAL	YVLESCVAWD	KSIMKAYATK	WAKZ
2461	NKSSKKKSSA	KKQATPSKKQ	QQKKNKKEQQ	LTPNGKESKS	KSAINKPENQ	APLSIKINLK	
2521	ALAQNGQCLL	KTKTPPILTK	SPTASPSHP	NTSDSDSDFG	KRTKKKSGGK	RRRSANNTNS	
2581	SKYSNSLQNC	QFCTSGENED	KLLLCDGCDK	GYHTYCFKPK	MDNIPDGDWY	CYECVNKATN	PHD_1
2641	ERKCIVCGGH	RPSVPGKMIY	CDLCPRAYHA	DCYIPPLLKV	PRGKWYCHGC	ISRAPPKKR	PHD_2
2701	SAGGTSGSSS	KSRDRDRDES	GGSAKRRSDN	SKTPAMEHM	QQQMPLAGGD	SHHHHHQPPP	
2761	SLNSSHDESM	NSLPAGSSEV	SVGACGRNG	RRSTRSGFQL	NNASALCSPA	HSVVSATNYD	TOU2
2821	DQHHANNSVD	GSSRFHAHLI	PPSNNGTAA	LEDVPGGANV	MPGVYPVYTP	VAAGNFSAGL	
2881	INQAPVQPAM	PFANVVAMSP	RAVTPTRTRT	PTPTPAPTTP	PPPPTPLLMQ	ASPTATALHV	
2941	NACQSPQQQ	HAQLMTMPSP	PAIGVGTATN	QMSPPPINI	AIQEAKEKLL	QEKKEKHATK	
3001	KLMKELAVCK	TLLGEMELHE	DSWPFLPVN	TKQFPYTKI	IKTPMDLSTI	KKKLQDLSYK	BROMO
	TREDFCVDVR	QIFDNCEMFN	EDDSPVGKAG	HGMRKFFESR	WGELTDKHS		

Tab. 2 Die vorhergesagte Proteinsequenz von *Toutatis* modifiziert nach Rein Aasland 2001. Proteinabschnitte mit Homologien zu Proteinen der ACF1 – WSTF – BAZ Familie (Abschnitt 1.1.5, Abb. 6) sind mit farbigen Buchstaben dargestellt und am rechten Rand beschriftet. Die von uns klonierten Fragmente Tou1 und Tou2 sind gelb unterlegt.

## 7.4 Literatur

- (1) Kornberg RD. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* 1977; 46:931-954.
- (2) Felsenfeld G. Chromatin. *Nature* 1978; 271(5641):115-122.
- (3) Igo-Kemenes T, Horz W, Zachau HG. Chromatin. *Annu Rev Biochem* 1982; 51:89-121.
- (4) Eickbush TH, Moudrianakis EN. The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry* 1978; 17(23):4955-4964.
- (5) Hayes JJ, Clark DJ, Wolffe AP. Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(15):6829-6833.
- (6) Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997; 389(6648):251-260.
- (7) Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13(2):170-178.
- (8) Grasser KD. Chromatin-associated HMGA and HMGB proteins: versatile co-regulators of DNA-dependent processes. *Plant Mol Biol* 2003; 53(3):281-295.
- (9) Ramsperger U, Stahl H. Unwinding of chromatin by the SV40 large T antigen DNA helicase. *EMBO J* 1995; 14(13):3215-3225.
- (10) Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature* 2003; 421(6921):448-453.
- (11) Thoma F, Koller T, Klug A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol* 1979; 83(2 Pt 1):403-427.
- (12) Rydberg B, Holley WR, Mian IS, Chatterjee A. Chromatin conformation in living cells: support for a zig-zag model of the 30 nm chromatin fiber. *J Mol Biol* 1998; 284(1):71-84.
- (13) Elgin SC, Grewal SI. Heterochromatin: silence is golden. *Curr Biol* 2003; 13(23):R895-R898.
- (14) Muyrers-Chen I, Paro R. Epigenetics: unforeseen regulators in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1552(1):15-26.
- (15) Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 2003; 4(6):351-358.
- (16) Okano M, Xie S, Li E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(11):2536-2540.
- (17) Hsieh CL. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 1999; 19(12):8211-8218.
- (18) Bestor TH. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J* 1992; 11(7):2611-2617.
- (19) Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 1999; 274(46):33002-33010.
- (20) Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 2000; 405(6785):482-485.
- (21) Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16(1):6-21.

- 
- (22) Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 2002; 3(3):224-229.
- (23) Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* 1993; 268(1):305-314.
- (24) Nelson DA, Perry M, Sealy L, Chalkley R. DNase I preferentially digests chromatin containing hyperacetylated histones. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 82(4):1346-1353.
- (25) Krajewski WA, Becker PB. Reconstitution of hyperacetylated, DNase I-sensitive chromatin characterized by high conformational flexibility of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(4):1540-1545.
- (26) Brown CE, Lechner T, Howe L, Workman JL. The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci* 2000; 25(1):15-19.
- (27) Wolffe AP. Transcriptional control. Sinful repression. *Nature* 1997; 387(6628):16-17.
- (28) Bowen NJ, Fujita N, Kajita M, Wade PA. Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1677(1-3):52-57.
- (29) Owen DJ, Ornaghi P, Yang JC, Lowe N, Evans PR, Ballario P et al. The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J* 2000; 19(22):6141-6149.
- (30) Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C resonance assignments for the bromodomain of the histone acetyltransferase P/CAF. *J Biomol NMR* 1999; 14(3):291-292.
- (31) Hake SB, Xiao A, Allis CD. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* 2004; 90(4):761-769.
- (32) Loyola A, LeRoy G, Wang YH, Reinberg D. Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev* 2001; 15(21):2837-2851.
- (33) Nicolas E, Roumillac C, Trouche D. Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol* 2003; 23(5):1614-1622.
- (34) Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V. *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 2002; 111(2):185-196.
- (35) Wang Y, Fischle W, Cheung W, Jacobs S, Khorasanizadeh S, Allis CD. Beyond the double helix: writing and reading the histone code. *Novartis Found Symp* 2004; 259:3-17.
- (36) Nielsen PR, Nietlispach D, Mott HR, Callaghan J, Bannister A, Kouzarides T et al. Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* 2002; 416(6876):103-107.
- (37) Brehm A, Tuffeland KR, Aasland R, Becker PB. The many colours of chromodomains. *Bioessays* 2004; 26(2):133-140.
- (38) Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293(5532):1074-1080.
- (39) Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004; 14(14):R546-R551.

- 
- (40) Langst G, Becker PB. Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim Biophys Acta* 2004; 1677(1-3):58-63.
- (41) Havas K, Whitehouse I, Owen-Hughes T. ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(5-6):673-682.
- (42) Flaus A, Owen-Hughes T. Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11(2):148-154.
- (43) Tsukiyama T. The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(6):422-429.
- (44) Reinke H, Horz W. Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol Cell* 2003; 11(6):1599-1607.
- (45) Boeger H, Griesenbeck J, Strattan JS, Kornberg RD. Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol Cell* 2003; 11(6):1587-1598.
- (46) Boeger H, Griesenbeck J, Strattan JS, Kornberg RD. Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Mol Cell* 2004; 14(5):667-673.
- (47) Fan HY, He X, Kingston RE, Narlikar GJ. Distinct strategies to make nucleosomal DNA accessible. *Mol Cell* 2003; 11(5):1311-1322.
- (48) Vignali M, Hassan AH, Neely KE, Workman JL. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 2000; 20(6):1899-1910.
- (49) Haynes SR, Dollard C, Winston F, Beck S, Trowsdale J, Dawid IB. The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 1992; 20(10):2603.
- (50) Zeng L, Zhou MM. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 2002; 513(1):124-128.
- (51) Sudarsanam P, Winston F. The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet* 2000; 16(8):345-351.
- (52) Kennison JA, Tamkun JW. Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(21):8136-8140.
- (53) Simon JA, Tamkun JW. Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12(2):210-218.
- (54) Jacobs JJ, Van Lohuizen M. Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602(2):151-161.
- (55) Bultman S, Gebuhr T, Yee D, La Mantia C, Nicholson J, Gilliam A et al. A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell* 2000; 6(6):1287-1295.
- (56) Grune T, Brzeski J, Eberharter A, Clapier CR, Corona DF, Becker PB et al. Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol Cell* 2003; 12(2):449-460.
- (57) Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP, Lane WS, Reinberg D. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 1998; 95(2):279-289.
- (58) Krogan NJ, Keogh MC, Datta N, Sawa C, Ryan OW, Ding H et al. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* 2003; 12(6):1565-1576.

- 
- (59) Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, Wu C. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 2000; 406(6795):541-544.
- (60) Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 2004; 303(5656):343-348.
- (61) Eberharter A, Becker PB. ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 17):3707-3711.
- (62) Ito T, Bulger M, Pazin MJ, Kobayashi R, Kadonaga JT. ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* 1997; 90(1):145-155.
- (63) Tsukiyama T, Wu C. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* 1995; 83(6):1011-1020.
- (64) Varga-Weisz PD, Wilm M, Bonte E, Dumas K, Mann M, Becker PB. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* 1997; 388(6642):598-602.
- (65) Lazzaro MA, Picketts DJ. Cloning and characterization of the murine Imitation Switch (ISWI) genes: differential expression patterns suggest distinct developmental roles for Snf2h and Snf2l. *J Neurochem* 2001; 77(4):1145-1156.
- (66) Stopka T, Skoultchi AI. The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003.
- (67) Barak O, Lazzaro MA, Lane WS, Speicher DW, Picketts DJ, Shiekhhattar R. Isolation of human NURF: a regulator of Engrailed gene expression. *EMBO J* 2003; 22(22):6089-6100.
- (68) Bozhenok L, Wade PA, Varga-Weisz P. WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci. *EMBO J* 2002; 21(9):2231-2241.
- (69) Deuring R, Fanti L, Armstrong JA, Sarte M, Papoulas O, Prestel M et al. The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol Cell* 2000; 5(2):355-365.
- (70) Santoro R, Li J, Grummt I. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet* 2002; 32(3):393-396.
- (71) Strohner R, Nemeth A, Nightingale KP, Grummt I, Becker PB, Langst G. Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin. *Mol Cell Biol* 2004; 24(4):1791-1798.
- (72) Xiao H, Sandaltzopoulos R, Wang HM, Hamiche A, Ranallo R, Lee KM et al. Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions. *Mol Cell* 2001; 8(3):531-543.
- (73) Badenhorst P, Voas M, Rebay I, Wu C. Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev* 2002; 16(24):3186-3198.
- (74) Morillon A, Karabetsou N, O'Sullivan J, Kent N, Proudfoot N, Mellor J. Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II. *Cell* 2003; 115(4):425-435.
- (75) Collins N, Poot RA, Kukimoto I, Garcia-Jimenez C, Dellaire G, Varga-Weisz PD. An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet* 2002; 32(4):627-632.

- 
- (76) Stopka T, Zakova D, Fuchs O, Kubrova O, Blafkova J, Jelinek J et al. Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia. *Leukemia* 2000; 14(7):1247-1252.
- (77) Simon JA, Tamkun JW. Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12(2):210-218.
- (78) Fauvarque MO, Laurenti P, Boivin A, Bloyer S, Griffin-Shea R, Bourbon HM et al. Dominant modifiers of the polyhomeotic extra-sex-combs phenotype induced by marked P element insertional mutagenesis in *Drosophila*. *Genet Res* 2001; 78(2):137-148.
- (79) Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 1995; 20(2):56-59.
- (80) Strohner R, Nemeth A, Jansa P, Hofmann-Rohrer U, Santoro R, Langst G et al. NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *EMBO J* 2001; 20(17):4892-4900.
- (81) Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D et al. The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell* 2003; 113(7):905-917.
- (82) Eberharter A, Ferrari S, Langst G, Straub T, Imhof A, Varga-Weisz P et al. Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI-induced nucleosome remodelling. *EMBO J* 2001; 20(14):3781-3788.
- (83) Eberharter A, Vetter I, Ferreira R, Becker PB. ACF1 improves the effectiveness of nucleosome mobilization by ISWI through PHD-histone contacts. *EMBO J* 2004; 23(20):4029-4039.
- (84) Duggan BJ, McKnight JJ, Williamson KE, Loughrey M, O'Rourke D, Hamilton PW et al. The need to embrace molecular profiling of tumor cells in prostate and bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(4):1240-1247.
- (85) Reisman DN, Sciarrotta J, Wang W, Funkhouser WK, Weissman BE. Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 2003; 63(3):560-566.
- (86) Davis PK, Brackmann RK. Chromatin remodeling and cancer. *Cancer Biol Ther* 2003; 2(1):22-29.
- (87) Hendrich B, Bickmore W. Human diseases with underlying defects in chromatin structure and modification. *Hum Mol Genet* 2001; 10(20):2233-2242.
- (88) Gibbons RJ, Higgs DR. Molecular-clinical spectrum of the ATR-X syndrome. *Am J Med Genet* 2000; 97(3):204-212.
- (89) Brzeski J, Jerzmanowski A. Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J Biol Chem* 2003; 278(2):823-828.
- (90) Kerr AM, Stephenson JB. Rett's syndrome in the west of Scotland. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 291(6495):579-582.
- (91) Amir RE, Van dV, I, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999; 23(2):185-188.
- (92) Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19(2):187-191.

- 
- (93) Wan M, Zhao K, Lee SS, Francke U. MECP2 truncating mutations cause histone H4 hyperacetylation in Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2001; 10(10):1085-1092.
- (94) Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 1997; 88(4):471-481.
- (95) Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M et al. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 1995; 376(6538):348-351.
- (96) Borrow J, Stanton VP, Jr., Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS et al. The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* 1996; 14(1):33-41.
- (97) Sobulo OM, Borrow J, Tomek R, Reshmi S, Harden A, Schlegelberger B et al. MLL is fused to CBP, a histone acetyltransferase, in therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;16)(q23;p13.3). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(16):8732-8737.
- (98) Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(18):10860-10865.
- (99) Dhordain P, Lin RJ, Quief S, Lantoine D, Kerckaert JP, Evans RM et al. The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(20):4645-4651.
- (100) Kelly WK, O'Connor OA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11(12):1695-1713.
- (101) Wong AK, Shanahan F, Chen Y, Lian L, Ha P, Hendricks K et al. BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res* 2000; 60(21):6171-6177.
- (102) Klochendler-Yeivin A, Muchardt C, Yaniv M. SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12(1):73-79.
- (103) Reyes JC, Barra J, Muchardt C, Camus A, Babinet C, Yaniv M. Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha). *EMBO J* 1998; 17(23):6979-6991.
- (104) Muchardt C, Bourachot B, Reyes JC, Yaniv M. ras transformation is associated with decreased expression of the brm/SNF2alpha ATPase from the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J* 1998; 17(1):223-231.
- (105) Marshall TW, Link KA, Petre-Draviam CE, Knudsen KE. Differential requirement of SWI/SNF for androgen receptor activity. *J Biol Chem* 2003; 278(33):30605-30613.
- (106) Reisman DN, Sciarrotta J, Wang W, Funkhouser WK, Weissman BE. Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 2003; 63(3):560-566.
- (107) Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R et al. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 1998; 394(6689):203-206.
- (108) Grand F, Kulkarni S, Chase A, Goldman JM, Gordon M, Cross NC. Frequent deletion of hSNF5/INI1, a component of the SWI/SNF complex, in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 1999; 59(16):3870-3874.

- 
- (109) Sevenet N, Sheridan E, Amram D, Schneider P, Handgretinger R, Delattre O. Constitutional mutations of the hSNF5/INI1 gene predispose to a variety of cancers. *Am J Hum Genet* 1999; 65(5):1342-1348.
- (110) Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(4):366-381.
- (111) Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; 419(6907):624-629.
- (112) Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(20):11606-11611.
- (113) Sellers WR, Loda M. The EZH2 polycomb transcriptional repressor--a marker or mover of metastatic prostate cancer? *Cancer Cell* 2002; 2(5):349-350.
- (114) Kravets FG, Lee J, Singh B, Trocchia A, Pentylala SN, Khan SA. Prostatomes: current concepts. *Prostate* 2000; 43(3):169-174.
- (115) Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002; 52(1):23-47.
- (116) Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 2000; 85(1):60-67.
- (117) Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 1991; 63(6):963-966.
- (118) Leitzmann MF, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC, Giovannucci E. Ejaculation frequency and subsequent risk of prostate cancer. *JAMA* 2004; 291(13):1578-1586.
- (119) Lee WH, Isaacs WB, Bova GS, Nelson WG. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6(6):443-450.
- (120) Lin X, Tascilar M, Lee WH, Vles WJ, Lee BH, Veeraswamy R et al. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol* 2001; 159(5):1815-1826.
- (121) Bartsch G, Horninger W, Klocker H, Reissigl A, Oberaigner W, Schonitzer D et al. Prostate cancer mortality after introduction of prostate-specific antigen mass screening in the Federal State of Tyrol, Austria. *Urology* 2001; 58(3):417-424.
- (122) Albertsen PC. Prostate cancer mortality after introduction of prostate-specific antigen mass screening in the Federal State of Tyrol, Austria. *J Urol* 2002; 168(2):880-881.
- (123) Hayes RB, Pottern LM, Strickler H, Rabkin C, Pope V, Swanson GM et al. Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer. *Br J Cancer* 2000; 82(3):718-725.
- (124) Dennis LK, Dawson DV. Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology* 2002; 13(1):72-79.
- (125) Montironi R, Scarpelli M, Lopez BA. Carcinoma of the prostate: inherited susceptibility, somatic gene defects and androgen receptors. *Virchows Arch* 2004.
- (126) Karayi MK, Markham AF. Molecular biology of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2004; 7(1):6-20.

- (127) Santos AF, Huang H, Tindall DJ. The androgen receptor: a potential target for therapy of prostate cancer. *Steroids* 2004; 69(2):79-85.
- (128) Nupponen NN, Wallen MJ, Ponciano D, Robbins CM, Tammela TL, Vessella RL et al. Mutational analysis of susceptibility genes RNASEL/HPC1, ELAC2/HPC2, and MSR1 in sporadic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39(2):119-125.
- (129) Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE et al. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res* 1992; 52(18):5104-5109.
- (130) Otto T, Rembrink K, Goepel M, Meyer-Schwickerath M, Rubben H. E-cadherin: a marker for differentiation and invasiveness in prostatic carcinoma. *Urol Res* 1993; 21(5):359-362.
- (131) Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275(5308):1943-1947.
- (132) Guo Y, Sklar GN, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) protein in human prostate cancer correlates with tumor grade. *Clin Cancer Res* 1997; 3(12 Pt 1):2269-2274.
- (133) Li J, Simpson L, Takahashi M, Miliareisis C, Myers MP, Tonks N et al. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene. *Cancer Res* 1998; 58(24):5667-5672.
- (134) Zha S, Ferdinandusse S, Denis S, Wanders RJ, Ewing CM, Luo J et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase as an androgen-independent growth modifier in prostate cancer. *Cancer Res* 2003; 63(21):7365-7376.
- (135) Luo J, Zha S, Gage WR, Dunn TA, Hicks JL, Bennett CJ et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62(8):2220-2226.
- (136) McNeal JE. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog Clin Biol Res* 1984; 145:27-53.
- (137) Bostwick DG. Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): current concepts. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16H:10-19.
- (138) Brawer MK. Prostatic intraepithelial neoplasia: a premalignant lesion. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16G:171-174.
- (139) Montironi R, Santinelli A, Mazzucchelli R. Prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Panminerva Med* 2002; 44(3):213-220.
- (140) Steiner MS. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer risk reduction. *World J Urol* 2003; 21(1):15-20.
- (141) Che M, Sakr W, Grignon D. Pathologic features the urologist should expect on a prostate biopsy. *Urol Oncol* 2003; 21(2):153-161.
- (142) Gallee MP, Ten Kate FJ, Mulder PG, Blom JH, van der Heul RO. Histological grading of prostatic carcinoma in prostatectomy specimens. Comparison of prognostic accuracy of five grading systems. *Br J Urol* 1990; 65(4):368-375.
- (143) Verhagen PC, Tilanus MG, de Weger RA, van Moorselaar RJ, van den Tweel JG, Boon TA. Prognostic factors in localised prostate cancer with emphasis on the application of molecular techniques. *Eur Urol* 2002; 41(4):363-371.

- 
- (144) Montironi R, Hamilton PW, Scarpelli M, Thompson D, Bartels PH. Subtle morphological and molecular changes in normal-looking epithelium in prostates with prostatic intraepithelial neoplasia or cancer. *Eur Urol* 1999; 35(5-6):468-473.
- (145) Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974; 111(1):58-64.
- (146) Poot RA, Dellaire G, Hulsmann BB, Grimaldi MA, Corona DF, Becker PB et al. HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *EMBO J* 2000; 19(13):3377-3387.
- (147) Nightingale KP, Wellinger RE, Sogo JM, Becker PB. Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila* hsp26 gene in chromatin. *EMBO J* 1998; 17(10):2865-2876.
- (148) Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. *Exp Mol Pathol* 2001; 70(3):255-264.
- (149) Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10(7):657-662.
- (150) Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J* 2001; 7(1):24-31.
- (151) Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4(7):844-847.
- (152) Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001; 344(8):539-548.
- (153) Simon R, Nocito A, Hubscher T, Bucher C, Torhorst J, Schraml P et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(15):1141-1146.
- (154) Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 1999; 59(4):803-806.
- (155) Poot RA, Bozhenok L, van den Berg DL, Steffensen S, Ferreira F, Grimaldi M et al. The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nat Cell Biol* 2004; 6(12):1236-1244.
- (156) Sallinen P, Haapasalo H, Kerttula T, Rantala I, Kalimo H, Collan Y et al. Sources of variation in the assessment of cell proliferation using proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry. *Anal Quant Cytol Histol* 1994; 16(4):261-268.
- (157) Palcic B. Nuclear texture: can it be used as a surrogate endpoint biomarker? *J Cell Biochem Suppl* 1994; 19:40-46.
- (158) Doudkine A, Macaulay C, Poulin N, Palcic B. Nuclear texture measurements in image cytometry. *Pathologica* 1995; 87(3):286-299.
- (159) Millot C, Dufer J. Clinical applications of image cytometry to human tumour analysis. *Histol Histopathol* 2000; 15(4):1185-1200.
- (160) Gil J, Wu HS. Applications of image analysis to anatomic pathology: realities and promises. *Cancer Invest* 2003; 21(6):950-959.
- (161) Holaska JM, Wilson KL, Mansharamani M. The nuclear envelope, lamins and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14(3):357-364.

- 
- (162) Sridharan D, Brown M, Lambert WC, McMahon LW, Lambert MW. Nonerythroid alphaII spectrin is required for recruitment of FANCA and XPF to nuclear foci induced by DNA interstrand cross-links. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 5):823-835.
- (163) Grompe M, D'Andrea A. Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Mol Genet* 2001; 10(20):2253-2259.
- (164) Kumaresan KR, Hwang M, Thelen MP, Lambert MW. Contribution of XPF functional domains to the 5' and 3' incisions produced at the site of a psoralen interstrand cross-link. *Biochemistry* 2002; 41(3):890-896.
- (165) Kumaresan KR, Lambert MW. Fanconi anemia, complementation group A, cells are defective in ability to produce incisions at sites of psoralen interstrand cross-links. *Carcinogenesis* 2000; 21(4):741-751.
- (166) Otsuki T, Furukawa Y, Ikeda K, Endo H, Yamashita T, Shinohara A et al. Fanconi anemia protein, FANCA, associates with BRG1, a component of the human SWI/SNF complex. *Hum Mol Genet* 2001; 10(23):2651-2660.
- (167) Sekelsky JJ, Hollis KJ, Eimerl AI, Burtis KC, Hawley RS. Nucleotide excision repair endonuclease genes in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 2000; 459(3):219-228.
- (168) Eberharter A, Langst G, Becker PB. A nucleosome sliding assay for chromatin remodeling factors. *Methods Enzymol* 2004; 377:344-353.
- (169) Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 1990; 185:60-89.

## 7.5 Veröffentlichungen

### Poster-Präsentation auf der *IMP Spring Conference 2002* (Epigenetic Programming of the Genome) in Wien

#### Toutatis, a novel member of chromatin remodelling factors?

Philipp Greif, Anton Eberharter, Elisabeth Kremmer\* and Peter B. Becker

*Adolf-Butenandt-Institut, Molekularbiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, Schillerstrasse 44, D-80336 München, Germany, \*GSF-Forschungszentrum, Institut für Molekulare Immunologie Marchioninistr 25 D-81377 München*

The nucleosomal organisation of DNA exerts a huge impact on the regulation of nuclear processes like transcription or replication of DNA. To overcome the repressive nature of chromatin on these fundamental processes, several different chromatin modifying protein complexes exist in the nucleus. Chromatin remodelling complexes use the energy of ATP-hydrolysis to change nucleosomal positions in a way that distinct regions of DNA are rendered accessible for interaction by regulating factors. One class of such remodelling factors contain the ATPase ISWI as catalytic subunit. To date, in *Drosophila* three distinct complexes, namely NURF, ACF and CHRAC have been described containing ISWI. Additional subunits in these complexes modify nucleosomal binding as well the efficiency and direction of the mobilisation of nucleosomes. One example for such a protein is Acf1, a common subunit of both, ACF and CHRAC. Acf1 is a member of a growing family of ISWI-associated proteins, characterised by the presence of a bromodomain, PHD-type of Zn-fingers and other yet not specified domains. Human-WSTF, a transcription factor which is related to dAcf1, is deleted in the William-Beuren-Syndrome, a severe developmental disorder. Searches of the fly data base reveal additional members of the family. Among these Acf1-related proteins in *Drosophila* we find Toutatis, a novel and uncharacterised protein. To investigate whether Toutatis associates with ISWI to form a novel chromatin remodelling complex, we generated monoclonal antibodies against the C-terminus of Tou. These antibodies are used to characterise Toutatis-containing complexes by co-immunoprecipitation, Western blot analyses of purified *Drosophila* extracts and immunofluorescence studies.

## 7.6 Danksagung

Ohne die Unterstützung meiner Eltern wären mein Medizinstudium sowie diese Arbeit kaum möglich gewesen. Ebenfalls sehr förderlich war die Aufmerksamkeit von meinem Betreuer Anton Eberharter. Mit seiner grenzenlosen Geduld ließen sich einige Alpentäler füllen. Meinem Doktorvater Peter Becker danke ich für seine Unterstützung auf allen Ebenen und für seine heitere Gelassenheit mit der er seine Mitarbeiter in seinem Büro, bei stets offener Tür, zu empfangen pflegt. Seine Aussage „Dass alle Menschen verschieden sind, macht das Leben interessant.“ ist mehr als bezeichnend für die kulturelle Vielfalt an seinem Lehrstuhl. Es ist schwer zu sagen, ob man die Harmonie im Labor darauf zurückführen kann, dass die Leute dort leben, wo sie arbeiten oder eher dass sie dort arbeiten, wo sie leben. In dieser Atmosphäre, genauso dynamisch wie entspannt, habe ich meine Zeit sehr gern verbracht und nicht nur viel über Molekularbiologie sondern auch über Fremdsprachen, Teamwork und internationale Kochkünste gelernt. Besonders hilfsbereit waren Ralf Strohner, Catherine Regnard, Felix Hartlepp, Matthias Prestel, Karim Bouazoune, Tobias Straub, Birgit Czermin und Irene Vetter, aber auch viele andere.

Peter Hamilton hat sich sehr bemüht, um mir, trotz der bürokratischen Hindernisse, die Möglichkeit zu bieten als *Elective Student* nach Belfast zu kommen und Experimente in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. An der Queens University hat nur die Vorarbeit von Mahmoud El Far den Abschluss der Experimente in einem sehr engen zeitlichen Rahmen ermöglicht.

## 7.7 Lebenslauf

Name: Philipp Greif  
 Adresse: Ohlmüllerstr.11, 81541 München  
 Telefon: +49 89 65114606  
 Email: [pgreif@med.uni-muenchen.de](mailto:pgreif@med.uni-muenchen.de)

Geburtsdatum/-ort: 15.04.1977 in München  
 Familienstand: Ledig  
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Ausbildung:

1987-96 Max Born Gymnasium Germering  
 1997- Medizinstudium an der Universität München  
 1998-99 Anatomiekurs an der Universität Miguel Hernández in Alicante / Spanien als Stipendiat des Erasmus-Programms  
 2000-01 Klinische Praktika an den Universitätskliniken von Elche, San Juan und Alicante in Spanien  
 2001-05 Doktorarbeit am Lehrstuhl für Molekularbiologie (Prof. P. Becker)  
 2003-04 PJ: 1.Tertial: Medizinische Poliklinik München  
 2.Tertial: Pathologie, Queens University Belfast  
 3.Tertial: Chirurgische Klinik, Nußbaumstr. München  
 2004 Staatsexamen am 21.04.

### Fremdsprachen:

Englisch: Fließend (Sprachkurse in Weymouth / UK und Boston / USA)  
 Spanisch: Fließend ("Diploma Superior" von der Universität Salamanca)  
 Französisch: Fortgeschritten

### Weitere Tätigkeiten:

1996-97 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Fürstfeldbruck  
 1999-2000 Studentische Hilfskraft am Institut für Chronobiologie / München  
 2004 Junior Research Expert im EU-Projekt "Support to Health Sector Reform in the Republic of Yemen" in Sana'a / Jemen (Jul-Aug)  
 2004-05 Volontär im "Human Genetics Programme" der WHO in Genf als Stipendiat des Carlo-Schmid-Programms des DAAD

### Freizeitinteressen:

Ausdauersport, Triathlon