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

Die Vermittlung der Transkriptionsregulation des viralen Aktivators VP16 durch Cofaktoren

von
Thomas Manfred Stühler
aus Würzburg
2007

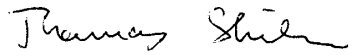
Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29.1.1998 von Herrn Prof. Dr. Michael Meisterernst betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 20.08.2007



Thomas Stühler

Dissertation eingereicht am 27.08.2007
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Meisterernst
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Patrick Cramer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom März 2000–August 2007 im Labor von Prof. Dr. Michael Meisterernst am Genzentrum der LMU bzw. dem Hämatologikum der GSF in München angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Ikeda, K., Stuehler, T., Meisterernst, M. (2002). The H1 and H2 regions of the activation domain of herpes simplex virion protein 16 stimulate transcription through distinct molecular mechanisms. *Genes Cells*, 7(1):14-58.

Mittler, G.*, Stühler, T.*, Santolin, L., Uhlmann, T., Kremmer, E., Lottspeich, F., Berti, L., Meisterernst, M (2003). A novel docking site on Mediator is critical for activation by VP16 in mammalian cells. *EMBO J.*, 22(24):6494-6504.

* G. Mittler und T. Stühler sind beide Erstautor

Danksagungen

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Michael Meisterernst für die Betreuung meiner Arbeit und die vielen fachlichen Anregungen in dieser Zeit danken.

Herrn Prof. Dr. Patrick Cramer danke ich für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten und den Vorsitz in der Prüfungskommission zu übernehmen.

Besonderer Dank gilt Dr. Gerhard Mittler für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen für diese Arbeit und die fruchtbare Zusammenarbeit.

Bei allen ehemaligen und derzeit noch aktiven Mitgliedern der AG Meisterernst bedanke ich mich für das freundliche Arbeitsklima und die kollegiale Zusammenarbeit. Ein besonderes herzliches Dankeschön geht dabei an Dr. Lucia Berti, Dr. Lisa Santolin und Gertraud Stelzer für die Unterstützung bei Experimenten.

Abkürzungen

293T	Menschliche embryonale Nierenkarzinom-Zellinie
aa	Aminosäure (“amino acid“)
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
ACID	“activator interaction domain“
AD	Aktivierungsdomäne
A-Med	MED25-assoziierter Mediator-Komplex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARC	“activator required cofactor“
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
BAF	“Brg-1/Brm-associated factor“
BES	*N, N*-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-4-Indolylphosphat
bidest.	bidestilliert
B-Med	Humaner Mediator Typ B
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BRE	“TFIIB recognition element“
BROMO	BROMO-Domäne
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
^{14}C	Kohlenstoff-14
°C	Grad in Celsius
CBP	“CREB binding protein“
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (“cyclin dependent kinase“)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
C. elegans	Fadenwurm (Caenorhabditis elegans)
CH1	Cystein- und Histidin-reiche Region 1
CH2	Cystein- und Histidin-reiche Region 2
CH3	Cystein- und Histidin-reiche Region 3
Ci	Curie (1 Ci = 3.7 x 10^{10} radioaktive Zerfälle pro Sekunde)
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (“calf intestine phosphatase“)
CRSP	“cofactor required for Sp1“

CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytosin-5´-triphosphat
CTD	Carboxyterminale Domäne der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II
CV	Säulenvolumen (“column volume“)
DEAE	Diethylaminoethyl
D. melanogaster	Taufliege (Drosophila melanogaster)
DMEM	“Dulbecco´s modified eagle medium“
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxyribonukleosid-5´-triphosphat
DPE	“downstream promotor element“
ds	“double stranded“
DRIP	“Vitamin D receptor interacting proteins“
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum (“fetal calf serum“)
FPLC	“fast protein, polypeptide and polynucleotide liquid chromatography“
g	Gramm
HAT	“Histon-Acetyl-Transferase“-Domäne
GST	Glutathion S-Transferase
GTF	“general transcription factor“
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
^{3}H	Tritium
h	Stunde
H1	H1-Region der VP16-Aktivierungsdomäne
H2	H2-Region der VP16-Aktivierungsdomäne
HeLa	Zellinie aus menschlichem Cervix-Karzinom
HEPES	*N*-(2-Hydroxyethyl)piperazin-*N´*-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

H. sapiens	Mensch (Homo sapiens)
HSV	Herpes simplex Virus
INR	Initiatorelement
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Jurkat	menschliche T-Zellinie
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KIX-Domäne	“CREB binding domain“
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Meter
M	Mol pro Liter (Molar)
mA	Milliampere
Med	Mediator
mg	Milligramm
min	Minuten
ML	major late
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (“messenger RNA“)
Mt	Mutante
MTE	“motif ten element“
NAT	“negative factor for activated transcription“
NBT	Nitroblautetrazolium
NC	Negativer Cofaktor
NCBI	“National Center for Biotechnology Information“
NE	Kernextrakt
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisationssignal (“nuclear localization signal“)
NTA	Nitrilotetraessigsäure (“nitrilo tetraaceticacid“)
NTP	Ribonukleotid-5´-triphosphat
OD	Optische Dichte
OMG	3´-O-Methylguanosin
ORF	Offener Leserahmen (“open reading frame“)

^{32}P	Phosphor-32
P11	Phosphocellulose P11
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCQAP	PC2-assoziiertes Q-reiches Protein
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (“phosphate buffered saline“)
PC	Positiver Cofaktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (“polymerase chain reaction“)
PIC	Präinitiationskomplex (“preinitiation complex“)
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pmol	Pikomol
pol	Polymerase
Rel. Luc.	Relative Luciferase-Aktivität
QD	Glutamin-prolinreich
RID	“nuclear receptor interacting-domain“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (“rotations per minute“)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.	siehe
^{35}S	Schwefel-35
S. cerevisiae	Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae)
S. pombe	Spalthefe (Schizosaccaromyzes pombe)
SDS	Natriumlaurylsulfat (“sodium dodecyl sulfate“)
SMCC	“Srb/Mediator containing complex“
snRNA	kleine kernlokalisierte RNA (“small nuclear RNA“)
s.o.	siehe oben
Srb	“Suppressor of RNA polymerase II subunit B mutation“
ss	einzelsträngig (“single stranded“)
s.u.	siehe unten
SV40	“Simian virus 40“
Tab.	Tabelle
TATA-box	Konsenus Sequenz in Eukaryonten

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAF	TBP-assoziierter Faktor
TAFII	TBP-assoziierter Faktor der Klasse II-Transkription
Taq	Thermus acquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TE	Tris-EDTA-Puffer
TFII	Transkriptionsfaktor der Klasse II-Transkription
TEMED	*N,N,N´,N´*-Tetramethylendiamin
TFTC	“TBP-free TAF-containing complex“
TGE	Tris-Glycin-EDTA-Puffer
TRAP	“Thyroid hormone associated proteins“
Tris	Trishydroxymethyl-amino-Methan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
u.a.	unter anderem
U	Enzymeinheit (“unit“)
UAS	“upstream activating sequence“
USA	“upstream factor stimulatory activity“
ÜN	Über Nacht
URS	“upstream repressing sequence“
USF	“upstream stimulatory factor“
UTP	Uridin-5´-triphosphat
V	Volt
vgl.	vergleiche
VP16	“Virion protein 16“
VP16:AD	VP16-Aktivierungsdomäne (aa 411-490)
VP16:H1	VP16 aa 411-452
VP16:H2	VP16 aa 453-490
v/v	Volumenanteil einer Flüssigkeit in einer Lösung (“volume per volume“)
VWA	Von-Willebrand-Faktor Typ-A
w/v	Gewichtsanteil eines Stoffes in einer Lösung (“weight per volume“)
XC	Xylencyanol

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 DNA-Genelemente 2

1.2 Eukaryontische RNA-Polymerasen 4

1.3 Die generellen Transkriptionsfaktoren und ihre Bedeutung für die Bildung des Präinitiationskomplexes 7

1.4 Aktivatoren 10

1.4.1 Klassifizierung von Aktivatoren 10

1.4.2 Der Aktivator VP16 11

1.5 Cofaktoren 14

1.5.1 TAFs 14

1.5.2 Cofaktoren aus der USA-Fraktion 15

1.5.3 Mediator-Komplexe 15

1.6 Aufgabenstellung 20

2 Material **21**

2.1 Geräte und Hilfsmittel 21

2.1.1 Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien . . . 23

2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien 24

2.1.3 Enzyme 27

2.1.4 Plasmide 27

2.1.5 Bakterienstämme 28

2.1.6 Eukaryontische Zellinien 28

2.1.7 Antikörper 28

2.2 Längenstandards 30

2.2.1 Protein-Längenstandards 30
2.2.2 DNA-Längenstandards 30
2.3 Lösungen, Puffer und Kulturmedien 31

3 Methoden **32**
3.1 Prokaryontische Zellkultur 32
3.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen 32
3.1.2 Anlegen von Dauerkulturen 32
3.2 Eukaryontische Zellkultur 33
3.2.1 Zellenvermehrung eukaryontischer Zellinien 33
3.2.2 Anlegen von Dauerkulturen 34
3.3 Herstellung von Zellkernextrakten 34
3.3.1 Kernextrakte aus HeLa-Zellen 34
3.3.2 Kernextrakte aus 293T-Zellen 36
3.4 Präparation von Mononukleosomen aus Zellkernsediment 37
3.5 Transiente Reporter Assays 38
3.5.1 Elektroporation 38
3.5.2 Transfektion mittels Calciumphosphat 38
3.5.3 Auswertung der Transfektion 39
3.6 DNA- und RNA-Arbeitstechniken 41
3.6.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung 41
3.6.2 Agarosegelelektrophorese 41
3.6.3 Gelelution mittels des GFX DNA- und Gel Band Purification Kit . 42
3.6.4 Reinigung über Sephadex G50-Säule 42
3.6.5 Chloropane-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren 42

3.6.6 Transformation kompetenter *E. coli* (nach M. Scott, unveröffentlicht) 43
3.6.7 Minipräparation von DNA aus *E. coli* (nach Del Sal. et al, 1988) . 43
3.6.8 Plasmid-DNA-Präparation mit Anionenaustauschersäulen 45
3.6.9 DNA-Restriktion 46
3.6.10 Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 46
3.6.11 Annealing von Oligodesoxyribonukleotiden 47
3.6.12 Dephosphorylierung von DNA 48
3.6.13 Phosphorylierung von Oligodesoxyribonukleotiden und radioaktive Markierung am 5´-Ende 48
3.6.14 Ligation 49
3.7 Protein-Arbeitstechniken 49
3.7.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen 49
3.7.2 SDS-Gelelektrophorese 50
3.7.3 Coomassie-Färbung von Proteinen 52
3.7.4 Silberfärbung 53
3.7.5 Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* 54
3.7.6 *In-vitro*-Translation 55
3.7.7 Nachweis der Proteine durch Western-Blot-Analyse 55
3.7.8 Ni^{2+}-NTA-Affinitätschromatographie 58
3.7.9 Heparin-Sepharose-Chromatographie 59
3.7.10 Gelfiltration 60
3.7.11 Q-Sepharose-Anionenaustauscher-Chromatographie 60
3.7.12 Affinitätschromatographie an immobilisierten GST-Fusionsproteinen 61
3.7.13 Immunoaffinitätsreinigung 63

3.8 *In-vitro*-Transkription 65

3.9 *In-vitro*-Methylierung von Histonen 68

3.10 *In-vitro*-Acetylierung von Histonen 70

4 Ergebnisse **71**

4.1 CBP ein an VP16-bindender Cofaktor 71

4.1.1 Konzeptionelle Vorgehensweise zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von Cofaktoren an die VP16-Aktivierungsdomäne 71

4.1.2 CBP interagiert mit der H2-Region der VP16-Aktivierungsdomäne *in vivo* 71

4.1.3 VP16:H2 depletiert CBP aus Kernextrakten 73

4.1.4 VP16:H2 bindet die amino- und carboxyterminale Region von CBP 75

4.2 Bindung von Chromatin-modifizierenden Faktoren an VP16 77

4.3 Humaner Mediator bindet spezifisch an VP16 78

4.4 MED25 ein neues VP16-bindendes Protein 82

4.4.1 Identifikation von ACID1/MED25 82

4.4.2 Die ACID-Domäne von MED25 bindet VP16 83

4.4.3 Die *N*-terminale Region von MED25, welche die VWA-Domäne enthält, bindet Mediator 85

4.4.4 MED25 ist kritisch für die Aktivierung von VP16 *in vivo*. 87

4.4.5 Die Funktion von MED25 *in vivo* korreliert mit dem Verlust von endogenem MED25 aus Mediator 89

4.4.6 MED25 zeigt wenig Einfluß auf die basale Transkriptionsrate der RNA-Polymerase II 90

4.4.7 NTD und damit MED25 erweist sich als spezifischer Cofaktor für VP16 90

4.4.8 MED25-Mediator-Komplex (A-Med) ist kritisch für die Aktivierung von VP16 *in vitro*, nicht jedoch generell für saure Aktivierungsdomänen 91

4.4.9 MED25 ist eine substöchiometrische Komponente des Mediators 94

4.4.10 Vergleich der MED25- und MED15-assoziierten Mediator-Komplexe mittels Immunoaffinitätsreinigung 96

4.5 Interaktion des MED25- (A-Med) bzw. MED15-assoziierten Mediator-Komplexes mit Kernfaktoren 96

5 Diskussion 109

5.1 Die H1- und H2-Region der VP16-Aktivierungsdomäne stimulieren die Transkription über unterschiedliche molekulare Mechanismen 109

5.2 CBP ist ein bedeutender Cofaktor für die Aktivierung von VP16:H2 . . . 113

5.3 CBP bzw. p300 interagieren mit Mediator 115

5.4 Charakterisierung von MED25 als Cofaktor für den Aktivator VP16 . . . 116

5.5 Der A-Med-Komplex 119

5.6 Hinweise auf eine Beteiligung des humanen Mediators an Signalprozessen bei der Chromatin-Umwandlung und RNA-Prozessierung 122

6 Zusammenfassung 124

7 Literaturverzeichnis 127

8 Anhang 150

1 Einleitung

Das in den Kernen menschlicher Zellen befindliche Genom besteht aus 3,0 x 10^9 Basenpaaren. Es enthält das komplette Informationsprogramm für die Entwicklung des vielzelligen menschlichen Organismus sowie die Aufrechterhaltung aller seiner Lebensfunktionen. Darin sind, wie im Rahmen des humanen Genomprojekts gefunden, etwa 30000 Protein-Gene (Bentley et al., 2001; Olivier et al., 2001) und eine noch nicht genau bestimmte Anzahl von RNA-Genen codiert (Cheng et al., 2005). Die einzelnen Gene werden auf der molekularen Ebene gezielt abgelesen. Dies wird durch verschiedene intra- bzw. extrazelluläre Signale gesteuert.

Die Genexpression in Eukaryonten läßt sich in Transkription, RNA-Prozessierung, RNA-Transport und Translation unterteilen. Auf der Stufe der Transkription wird die DNA-Sequenz eines Gens in die entsprechende RNA-Sequenz umgeschrieben. Bei der daran folgenden Prozessierung des RNA-Transkripts zu einer reifen “messenger“-RNA (mRNA) werden durch das Spleißen nicht-codierende Sequenzabschnitte, sogenannte Introne, herausgeschnitten. Desweiteren wird die mRNA zur finalen Reifung an ihrem 3’-Ende polyadenyliert und an ihrem 5’-Ende mit einem 7-Methylguanosin-“cap“ versehen. Die fertige mRNA wird dann aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert. Dort erfolgt im letzten Schritt die Translation; Dabei wird die mRNA-Sequenz vom Ribosom in die Aminosäuresequenz eines entsprechenden Proteins übersetzt. In jedem der vier beschriebenen Schritte wird in der Zelle die Genexpression über eine Folge von Regulationsmechanismen gesteuert.

Allein schon die Stufe der Transkription, die für diese Arbeit von Bedeutung ist, stellt einen hochkomplexen Prozeß dar. Eine zentrale Rolle spielen dabei RNA-synthetisierende Enzyme. In den Untersuchungsbereich der vorliegenden Arbeit fällt die RNA-Polymerase II; Sie ist für die Synthese der mRNA aller proteincodierenden Gene in Eukaryonten verantwortlich. Die RNA-Polymerase II bildet zusammen mit weiteren Proteinen, den generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs), einen molekularen RNA-Syntheseapparat. Dieser wird auch als basale Maschine bezeichnet. Der spezifische Verlauf der Transkription kommt durch eine Vielzahl regulatorischer Proteine zustande. Darin binden Aktivatoren sequenzspezifisch in der Nähe der Gene an die DNA und rekrutieren zusätzliche Cofaktoren und Transkriptionsfaktoren. Die regulatorischen Proteine beeinflussen zum einen Ereignisse beim Aufbau oder bei der Funktion

des Transkriptionsapparats. Darüberhinaus fördern diese Faktoren auch die Transkriptionrate, indem sie eine Veränderung der globalen DNA-Struktur über eine Alternierung des Chromatinzustands bewirken.
Die Transkription selbst läßt sich ebenfalls in Teilschritte unterteilen. Diese werden als Initiation, Elongation und Termination bezeichnet.
Im Zusammenhang mit der Regulierung der Transkription war es Ziel der vorliegenden Arbeit, zu einem besseren Verständnis der Aktivierungsmechanismen am Modell des Aktivators VP16 des Herpes simplex Virus beizutragen. Die nachfolgenden Unterpunkte geben einen Überblick über den aktuellen Stand zu den relevanten Teilbereichen der Transkriptionsforschung.

1.1 DNA-Genelemente

Die Transkriptionsstartstelle eines bestimmten Gens ist genau festgelegt. Weiterhin ist gewährleistet, daß nur der Sinnstrang abgelesen wird. Die Kontrolle der Initiation wird im wesentlichen durch sequenzspezifische DNA-Genelemente gesteuert. Die Regulation der Transkription erfolgt durch Transkriptionsfaktoren, die an diese Sequenzen binden. Bei den DNA-Genelementen unterscheidet man zwischen genspezifischen Schaltern und den globalen Genschaltern. Erstere regulieren nur die Aktivität eines einzelnen Gens. Letztere beeinflussen die Funktion einer ganzen Gruppe von Genen.
Die genspezifischen Schalter werden als Promotor bezeichnet und beinhalten proximale und distale Promotorelemente (Übersichtsartikel: Butler und Kadonaga, 2002). In Abb. 1 sind die DNA-Genelemente eines hypothetischen Klasse-II-Promotors dargestellt. Ausreichend für die exakte Initiation ist der Kernpromotor. Den Kernpromotor konstituieren regulatorische DNA-Sequenzen. Diese liegen “vor“ (5´) der codierenden Region des jeweiligen Gens. Der Kernpromotor besteht aus verschiedenen Kernpromotorelementen und umfaßt jeweils etwa 35 Basenpaare stromaufwärts und stromabwärts der Transkriptionsstartstelle. Bisher bekannte Kernpromotorelemente sind das INR (Initiatorelement), die TATA-Box, das BRE (“TFIIB recognition element“), das DPE (“downstream core promotor element“) und das MTE (“motif ten element“). Jedes dieser Kernpromotor-Elemente wird in einigen, aber nicht in allen Kernpromotoren gefunden. Die Kernpromotor-Elemente sind gut charakterisiert. Das INR umgibt die Transkriptionsstartstelle (Smale et al., 1990). Die TATA-Box befindet sich etwa

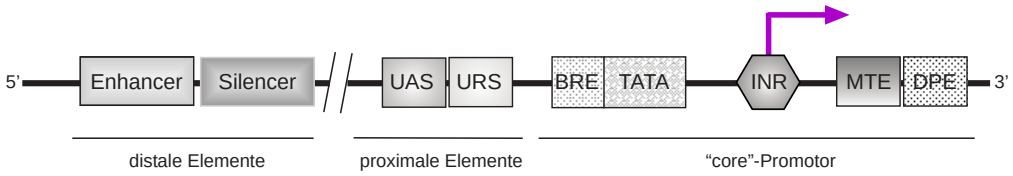


Abbildung 1: Schematische Darstellung der sequenzspezifischen DNA-Genelemente eines hypothetischen Klasse II-Promotors. Der Transkriptionsstart der RNA-Polymerase II ist durch einen Pfeil markiert. UAS ("upstream activating sequence"), BRE ("TFIIB recognition element"), TATA (TATA-box), INR (Initiatorelement), MTE ("motif ten element"), DPE ("downstream promotor element"), URS ("upstream repressing sequence")

31–26 Nukleotide stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle. Sie bindet das Protein TBP ("TATA-box binding protein") und zu TBP verwandten Proteine aus der TRF-Familie ("TBP related factors"; Übersichtsartikel: Butler und Kadonaga, 2002; Juven-Gershon et al., 2006). Das BRE-Element befindet sich variabel stromaufwärts (Lagrange et al., 1998) oder/und stromabwärts (Deng und Roberts, 2005) der TATA-Box und bindet den Transkriptionsfaktor TFIIB. Das DPE-Element liegt etwa 28 Nukleotide stromabwärts der Transkriptionsstartstelle. Es wirkt über die Protein-Kinase CK2 und den Coaktivator PC4 (Lewis et al., 2005). Weiterhin bindet DPE kooperativ mit INR den Transkriptionsfaktor TFIID (Burke et al., 1998). Das MTE-Element befindet sich etwa 18 Nukleotide stromabwärts der Transkriptionsstartstelle. Es erhöht die Transkriptionsrate der RNA-Polymerase II und benötigt dafür das INR, nicht aber die TATA-Box und das DPE. Sind neben dem MTE allerdings zusätzlich die TATA-Box und das DPE vorhanden, dann wirken diese Elemente synergistisch (Lim et al., 2004). Kürzlich wurde als neues Kernpromotor-Element das XCPE1 ("the X gene core promoter element 1") vorgeschlagen. Es befindet sich in Position -8 bis +2 relativ zur Transkriptionsstartstelle (Tokusumi et al, 2007). Dieses soll die Transkription der RNA-Polymerase II auf TATA-losen Promotoren in Abhängigkeit von Aktivator, Mediator und TBP, aber unabhängig von TFIID vermitteln.

Die proximalen Promotorelemente liegen nahe der Transkriptionsstartstelle (ca. -250 – +250 Nukleotide) und werden als UAS ("upstream activating sequence") bzw. als URS ("upstream repressing sequence") bezeichnet. Die distalen Promotorelemente sind bis zu mehreren Kilobasen vom Promotor entfernt. Sie können unabhängig von ihrer Position und Orientierung die Transkriptionsrate als "enhancer" erhöhen bzw. als "silencer" senken.

Gegenüber den genspezifischen Genschaltern sind die globalen Genschalter wie beispielsweise die Insulatoren, “matrix attachement regions“ (MARs) bzw. “scaffold-associated regions“ (SARs), in ihrer Funktion und Wirkung noch nicht umfassend aufgeklärt. Man nimmt an, daß diese sowohl die globale Chromatinstruktur als auch die Lokalisation größerer DNA-Bereiche (mehrere Megabasen) im Zellkern entscheidend beeinflussen (Übersichtsartikel: West und Fraser, 2005).

1.2 Eukaryontische RNA-Polymerasen

Eukaryonten besitzen drei kernlokalisierte RNA-Polymerasen. Diese werden (entsprechend ihrem erstmals im Labor gefundenen Eluationsprofil) als RNA-Polymerase I, II und III bezeichnet (Roeder und Rutter, 1969). Sie synthetisieren als molekulare Maschinen unterschiedliche RNA-Spezies. Demgemäß unterscheidet man auch unterschiedliche Klassen von Genen, nämlich Klasse I, II und III (Übersichtsartikel: Roeder et al., 1976; Young, 1991). Die RNA-Polymerasen I und III synthetisieren ribosomale RNAs (rRNAs), Transfer-RNAs (tRNAs) und einige “small nuclear“ RNAs (snRNAs). Allein die RNA-Polymerase II synthetisiert, wie bereits erwähnt, die “messenger“ RNAs (mRNAs) der Protein-codierenden Gene. Daneben stellt diese aber auch noch die snRNAs für einige Gene her. In ihrer Funktion weist die RNA-Polymerase II das in seiner Komplexizität am weitesten entwickelte Regulationsnetzwerk auf. Tabelle 1 faßt die RNA-Transkripte der drei RNA-Polymerasen zusammen. Die jeweiligen Untereinheiten der drei eukaryontischen RNA-Polymerasen sind in Tabelle 2 zusammengestellt.
Für diese Arbeit ist die RNA-Polymerase II in Hinblick auf die Transkriptionsaktivierung von VP16 von Bedeutung; Sie ist von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert und besteht aus 12 Untereinheiten (Rpb1–Rpb12). Die Untereinheiten Rpb1, Rpb2, Rpb3 und Rpb11 sind homolog zu den Untereinheiten der RNA-Polymerase I und III. Weitere fünf Untereinheiten (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 und Rpb12) sind bei allen drei eukaryontischen RNA-Polymerasen identisch. Die Untereinheiten Rpb4, Rpb7 und Rpb9 zeigen in einigen Sequenzabschnitten schwache Konservierung im Vergleich zu den Untereinheiten der anderen beiden RNA-Polymerasen (Übersichtsartikel: Cramer, 2004).

Typ	Lokalisation	zelluläre Transkripte
RNA-Polymerase I	Nukleoli	43 S-rRNA-Vorläufer
RNA-Polymerase II	Nukleoplasma	mRNA-Vorläufer, snRNA
RNA-Polymerase III	Nukleoplasma	tRNA, 5S-rRNA, snRNA

Tabelle 1: RNA-Polymerasen im eukaryontischen Zellkern. rRNA: ribosomale RNA; mRNA: “messenger“-RNA; snRNA: “small nuclear“ RNA; tRNA: “transfer“-RNA (tRNA)

RNA-Polymerase I	RNA-Polymerase II	RNA-Polymerase III
A190	Rpb1	C160
A135	Rpb2	C128
AC40	Rpb3	AC40
A14	Rpb4	C17
Rpb5	Rpb5	Rpb5
Rpb6	Rpb6	Rpb6
A43	Rpb7	C25
Rpb8	Rpb8	Rpb8
A12.2	Rpb9	C11
Rpb10	Rpb10	Rpb10
AC19	Rpb11	AC19
Rpb12	Rpb12	Rpb12
A49		C82/34/31
A34		C53/37/11

Tabelle 2: Die Untereinheiten der eukaryontischen RNA-Polymerasen (Gadal et al., 1997; Liljelund et al., 1992; Werner et al., 1992; Cramer, 2002).

Die RNA-Polymerase II kann in ein 10 Untereinheiten großes Kern-Enzym und ein Heterodimer aus den Untereinheiten Rpb4 und Rpb7 (Rpb4/7–Komplex) dissoziieren. Das Kern-Enzym alleine ist katalytisch aktiv. Für die Initiation auf dem Promotor bedarf es allerdings zusätzlich des Rpb4/7–Komplexes und der GTFs (Edwards et al., 1991).

Die Polymerase II ist mittels hochauflösender dreidimensionaler Röntgenstrukturanalyse intensiv erforscht. Aufgeklärt sind Strukturen der vollständigen RNA-Polymerase II und darüberhinaus Strukturen des 10 Untereinheiten großen katalytischen Kern-Bereichs jeweils in verschiedenen Bindungsverhältnissen. Geklärt sind die Bindungsverhältnisse an den Elongationsfaktor TFIIS, den generellen Transkriptionsfaktor TFIIB, an α-Amatinin und an Nukleotide (Cramer et al., 2000; Cramer et al., 2001; Gnatt et al., 2001; Bushnell et al., 2002; Armache et al., 2003; Bushnell und Kornberg, 2003; Kettenberger et al., 2003; Bushnell et al., 2004; Kettenberger et al., 2004; Westover et al., 2004a; Westover et al., 2004b; Armache et al., 2005; Kettenberger et al., 2006).
Die carboxyterminale Domäne (CTD) der größten Untereinheit Rpb1 der RNA-Polymerase II weist eine Besonderheit auf. Sie enthält eine in mehrfacher Wiederholung vorkommende YSPTSPS-Consensus-Sequenz. Die Zahl der Sequenz-Wiederholungen ist jeweils charakteristisch für eine Spezies. In Hefe sind es beispielsweise 26 und beim Menschen sind es 52 Wiederholungen (Übersichtsartikel: Corden, 1990). Das CTD-Consensus-Motiv interagiert mit Faktoren, welche sowohl bei der Initiation, Elongation und Termination der Transkription als auch bei der mRNA-Prozessierung beteiligt sind (Übersichtsartikel: Hirose und Manley, 2000; Proudfoot et al., 2002; Woychik und Hampsey, 2002; Hahn, 2004; Meinhart et al., 2005). In der Hefe konnte gezeigt werden, daß die Deletion von CTD letal ist (Nonet und Young, 1989). Im Hinblick auf die Regulation der Aktivität der RNA-Polymerase II ist zu erwähnen, daß CTD durch Proteinkinasen phosphoryliert und durch Proteinphosphatasen dephosphoryliert wird. Die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an CTD hängt von dessen Phosphorylierungsmuster ab. Während des Zellzyklus wechselt das Phosphorylierungsmuster und reguliert damit die Biogenese der mRNA (Dahmus, 1995).
Bei der Initiation der Transkription wird der Ser5-Rest von CTD phosporyliert. Dies erfolgt maßgeblich durch die Kinase/Cyklin-Paare CDK7/Cyklin H und CDK8/Cyklin C. CDK7/Cyklin H finden sich auch noch als Untereinheiten von TFIIH und CDK8/Cyklin C von Mediator-Komplexen. Während der Elongation phosphoryliert der Elongationsfaktor pTEFb über sein assoziiertes Kinase/Cyklin-Paar CDK9/Cyclin T den Ser2-Rest von CTD (Pinhero et al., 2004). Für die Reinitiation der Transkription muß CTD durch Phosphatasen wiederum dephosphoryliert werden. Bekannte Phosphatasen für CTD sind Fcp1, Scp1 und Ssu72 (Übersichtsartikel: Meinhard et al., 2005).

1.3 Die generellen Transkriptionsfaktoren und ihre Bedeutung für die Bildung des Präinitiationskomplexes

Die eukaryontischen RNA-Polymerasen benötigen zur Promotorerkennung akzessorische Faktoren. Im Fall der RNA-Polymerase II sind dies die generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH. Diese sogenannten GTFs stellen einen minimalen Satz an Proteinen dar, der für die basale Transkription der Polymerase II auf bestimmten Modellpromotoren *in vitro* benötigt wird. Abbildung 2 zeigt vereinfacht den Präinitiationskomplex (PIC) am Beispiel eines hypothetischen Promotors.

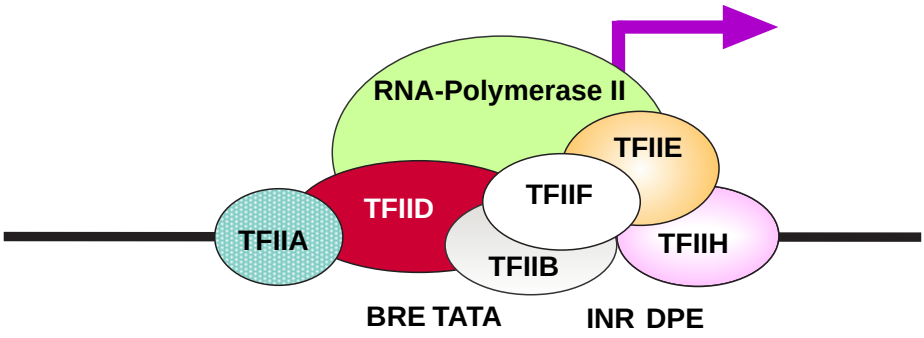


Abbildung 2: Modell der basalen Transkription. Die generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) binden an den Promotor und bilden den Präinitationskomplex (PIC). Der Transkriptionsfaktor TFIID erkennt und bindet die TATA-Box.

Die Bildung des PIC aus den GTFs und RNA-Polymerase II wurde in *in-vitro*-Transkriptionsexperimenten ausführlich studiert. Demnach läuft der Zusammenbau in einer klar definierten Reihenfolge ab (Übersichtsartikel: Roeder, 1996; Hampsey, 1998; Reinberg et al., 1998; Lee und Young, 2000; Woychik und Hampsey, 2002; Thomas und Chiang, 2006).
Im ersten Schritt erfolgt die sequenzspezifische Bindung von TFIID an die DNA. Diese Bindung wird durch Anlagerung von TFIIA stabilisiert. TFIID ist ein Komplex, bestehend aus dem TATA-Box-bindenden Protein TBP und den TBP-assoziierten Faktoren, den TAFs. TBP alleine ist zwar für die basale Transkription von Klasse II-Genen

ausreichend, die TAFs werden aber bei der Erkennung vieler TATA-Box-loser Promotoren und darüberhinaus für die aktivierte Transkription benötigt (Übersichtsartikel: Hernandez, 1993; Zawel und Reinberg, 1995; Verrijzer und Tjian, 1996). Die Bildung dieses Komplexes auf der DNA liefert dann eine Andockstelle für TFIIB. Daran anschließend erfolgt die Bindung des aus RNA-Polymerase II und TFIIF vorgefertigten Komplexes. Anschließend bindet TFIIE an die RNA-Polymerase II und rekrutiert dann TFIIH. Damit ist die Bildung des PIC vollständig.
Der PIC wird durch Aufwinden der DNA-Helix (unter Hydrolyse von ATP) von einer stabilen “geschlossenen“ in eine instabile “offene“ Konformation überführt. Diesen Vorgang ermöglicht die mit TFIIH-assozierte Helikase XPB. Die Phosphorylierung von CTD durch den TFIIH-assoziierten Proteinkinasekomplex CDK7/Cyclin H verringert die Bindungsstärke. Dadurch wird der Elongationsprozeß eingeleitet.
Diese *in vitro* erzielten Befunde legen nahe, daß die Bildung des PIC auch für die RNA-Polymerase II-Transkription *in vivo* bedeutend ist. Tabelle 3 verdeutlicht zusammenfassend die Funktionen der einzelnen GTFs und die Beteiligung ihrer Untereinheiten.
Erwähnenswert ist die besondere Rolle von TBP. Neben seiner Bedeutung für TFIID bei der Transkription der RNA-Polymerase II ist TBP auch an der Transkription der RNA-Polymerase I und RNA-Polymerase III beteiligt. Dabei ist TBP bei RNA-Polymerase I in SL1 und bei RNA-Polymerase III in TFIIIB enthalten. Zusätzlich findet sich TBP auch als Untereinheit des Proteinkomplexes $SNAP_C$, der die Transkription von snRNA durch RNA-Polymerase II und III steuert (Übersichtsartikel: Burley und Roeder, 1996; Verrijzer und Tjian, 1996). Daneben ist TBP auch noch in den beiden Klasse II-Transkriptionsfaktoren TAC (Mitsiou und Stunnenberg, 2000) und B-TFIID (Pereira et al., 2001) enthalten. Beide können TFIID *in vitro* ersetzen.
Bis vor wenigen Jahren wurde davon ausgegangen, daß TBP einen universellen Faktor für die Transkription der RNA-Polymerase II darstellt. Inzwischen kennt man jedoch zu TBP paraloge Proteine, die dieses bei der Aktivierung bestimmter Gene ersetzen können. Dazu zählt der Faktor TRF1 (“TBP related factor“); Er ist stark homolog zu TBP und wurde bisher nur in Drosophila gefunden (Crowley et al., 1993). TRF1 aktiviert die Transkription einiger RNA-Polymerase II-Promotoren, die auch durch TBP aktiviert werden können (Holmes und Tjian, 2000; Hansen et al., 1997). Ersatz für TBP kann auch TRF2 sein. Dabei handelt es sich um einen zu TBP wenig verwandten

Faktor (auch unter TLF, TLP, TRF, TRP und STUD beschrieben) (Ohbayashi et al., 1999; Rabenstein et al., 1999; Teichmann et al., 1999; Berk, 2000; Dantonel et al., 2000; Kaltenbach et al., 2000; Veenstra et al., 2000; Muller et al., 2001). TRF2 bindet auch an DNA-Sequenzen, die nicht der klassischen TATA-Box entsprechen (Dantonel et al., 1999; Rabenstein et al., 1999). Außerdem kann TRF2 die Transkription auf bestimmten Genen ohne TATA-Box unterstützen (Ohbayashi et al., 2003). Neuerdings wurde auch wiederum ein zu TBP eng verwandtes Protein, genannt TRF3/TBP2, identifiziert (Bartfai et al., 2004; Persengiev et al., 2003). Über dessen Funktion bei der Transkriptionsregulation ist allerdings bisher noch wenig bekannt.

GTF	beteiligte Untereinheit	Funktion der GTFs
TFIID	TBP	Promotor-Erkennung; Bindung an die TATA-Box; Rekrutierung von TFIIB
	TAFs	Promotor-Erkennung; Bindung an INR und DPE; positive und negative regulatorische Funktionen
TFIIA		Stabilisierung der TBP-DNA-Bindung; Stabilisierung von TAF-DNA-Wechselwirkungen; Anti-Repression bestimmter Transkriptionsinhibitoren
TFIIB		Rekrutierung von RNA-Polymerase II und TFIIF; Festlegung der Transkriptionsinitiations-Startstelle; Bindung an BRE
TFIIF		Rekrutierung von RNA-Polymerase II an den Promotor; Destabilisierung unspezifischer RNA-Polymerase II-DNA-Wechselwirkungen
TFIIE		Rekrutierung von TFIIH; Modulation der Kinase-, Helikase-, und ATPase-Aktivität von TFIIH; Erleichterung der Strangtrennung
TFIIH	XPB	3'-5' Helikase-Aktivität; ATPase-Aktivität; essentiell für Promotoröffnung
	CDK7	Phosphorylierung von CTD
	Cyclin H	essentiell für die Kinaseaktivität von CDK7

Tabelle 3: Die generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) und ihre Funktionen bei der Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC). TBP ("TATA binding protein"); TAFIIs (TBP-assoziierte Faktoren der Klasse II

Transkription); DPE (“downstream core promotor element“) ; INR (Initiatorelement); BRE (“TFIIB recognition element“); CTD (Carboxyterminale Domäne der RNA-Polymerase II).

1.4 Aktivatoren

1.4.1 Klassifizierung von Aktivatoren

Die meisten Gene in Eukaryonten sind inaktiv, solange sie nicht spezifisch angeschaltet werden. Das Anschalten erfolgt durch bestimmte regulatorische Proteine, die Aktivatoren. Diese besitzen in der Regel eine DNA-Bindungsdomäne und binden damit an sequenzspezifische Erkennungssequenzen in der Nähe der Promotorregion des Gens. Desweiteren enthalten sie eine oder mehrere Aktivierungsdomänen. Über diese werden zusätzliche Proteine oder Proteinkomplexe an den Promotor rekrutiert. Durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgt die Vermittlung verschiedenster Signale an die Transkriptionsmaschine und die Steuerung des Aktivierungsprozesses. Interaktionspartner der Aktivierungsdomänen sind die GTFs, die Elongationsfaktoren und die Cofaktoren. Auf die im Zusammenhang mit dieser Arbeit bedeutenden Cofaktoren wird im nächsten Abschnitt eingegangen.
Die Aktivatoren können entweder in Bezug auf ihre DNA-Bindungsdomäne oder in Bezug auf ihre Aktivierungsdomäne(n) in Gruppen eingeteilt werden. Die DNA-Bindungsdomänen zeigen charakteristische Sekundärstrukturen und werden deshalb entsprechend ihrer Strukturmotive klassifiziert. Beispiele für gut charakterisierte Strukturmotive von DNA-Bindungsdomänen sind das “helix turn helix“- (z.B. in Oct-1), das “Zinkfinger“- (z.B. SP1, GAL4), das “Leucin Zipper“- (z.B. in c-Jun, c-Fos, CREB)- und das “helix loop helix“-Motiv (z.B. in c-Myc, Max, Mad, USF) (Übersichtsartikel: Harrison, 1991; Pabo und Sauer, 1992). Aktivierungsdomänen zeichnen sich hingegen dadurch aus, daß sie üblicherweise aus 30 bis 100 Aminosäuren bestehen. Diese sind meist, was ihre Sekundärstruktur anbelangt, strukturell äußerst flexibel. Eine Klassifizierung nach Strukturelementen ist deshalb nicht sinnvoll. Charakteristisch ist aber das gehäufte Auftreten von Aminosäureresten mit gleichen chemischen Eigenschaften. Man unterscheidet insbesondere glutaminreiche (z.B. in Sp1, Oct1), prolinreiche (z.B. in CTF, AP-2), serinreiche (z.B. in Sox-4) und saure (z.B. in VP16, NFκB, E1A, GAL4, p53) Aktivatordomänen (Mitchell und Tjian, 1989; Titz et al., 2006).

1.4.2 Der Aktivator VP16

Der in dieser Arbeit maßgeblich untersuchte Aktivator VP16 (auch bekannt als Vmw65/aTIF/VF65) läßt sich, was die DNA-Bindungsdomäne anbelangt, nicht den bekannten Strukturmotiven zuordnen. Dazu fehlt ihm die “klassische“ DNA-Bindungsdomäne. Das insgesamt 480 Aminosäuren große Protein wird nach der lytischen Infektion des Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) in der Wirtszelle gebildet. Als Aktivator ist VP16 dabei mitentscheidend für die Initiation des lytischen Programms der Virusreplikation (Übersichtsartikel: Wysocka und Herr, 2003). Um die DNA-Bindung zu ermöglichen, bildet VP16 einen Komplex mit den zellulären Proteinen HCF-1 und Oct-1. Dieser bindet dann an Zielsequenzen (TAATGARAT) auf Promotoren von “frühen“ (“immediate early“) HSV-Genen (Babb et al., 2001). Die Kristallstruktur der Kern-Domäne von VP16 (aa 49-385) im Komplex mit Oct-1 und HCF zeigt einerseits ein neuartiges Sessel-ähnliches Faltungsmotiv und andererseits auch das Bindungsverhalten zur DNA (Liu et al., 1999). Die Kern-Region ist innerhalb der α-Herpesviren (z.B. *Varicella-Zoster* Virus (VZV), *Marek's Disease Virus* (MDV), Pferde- (EHV-1) und Rinder- (BHV-1) Herpesvirus) (Übersichtsartikel: Wysocka und Herr, 2003) hoch konserviert.

VP16 besitzt weiterhin eine *C*-terminale saure Aktivierungsdomäne (aa 411–490), nachfolgend auch als VP16:AD bezeichnet. Diese kann ihrerseits in zwei Subregionen unterteilt werden; Diese werden im Folgenden auch als VP16:H1 (aa 411–452) und VP16:H2 (aa 453–490) bezeichnet (Abb. 3). VP16:H2, nicht aber VP16:H1, erweist sich als hoch konserviert zwischen einzelnen α-Herpesviren (Grapes und O'Hare, 2000). Die beiden Subdomänen sind in transienten Reporterassays unabhängig voneinander funktionell aktiv, aktivieren die Transkription aber generell synergistisch (Abb. 3) (Walker et al., 1993) (Abb. 3). VP16:AD liegt im physiologischen Milieu unstrukturiert vor. *In vitro* bilden sich unter sauren oder hydrophoben Bedingungen α-helikale Strukturen aus (O'Hare und Williams, 1992). Andererseits kann auch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an VP16:AD α-helikale Strukturen induzieren, wie bisher für TAF9, TFIIB und PC4 nachgewiesen werden konnte (Uesugi et al., 1997; Jonker et al., 2005). Daneben sind auch mechanistische Aspekte in Hinblick auf die Transkriptionsaktivierung von VP16:AD ausführlich untersucht. VP16:AD fördert die Bildung des Präinitiationskomplexes (Ranish et al., 1999) und stimuliert dessen Öffnung (Jiang et al.,

Abbildung 3: Die Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) Virion-Proteins VP16:AD. Oben: Schematischer Aufbau der VP16:AD und Kennzeichnung der beiden Subdomänen VP16:H1 (H1) und VP16:H2 (H2). Unten: Aminosäuresequenzen der beiden Subdomänen VP16:H1 und VP16:H2.

1994). Zusätzlich erhöht VP16:AD die Transkriptionsrate (Ghosh et al., 1996) und steigert die Prozessivität der RNA-Polymerase II (Yankulov et al., 1994). VP16:AD fördert auch die Bildung des Präinitiationskomplexes durch Interaktion mit den generellen Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIIB (Stringer et al., 1990; Ingles et al., 1991; Lin und Green, 1991; Choy und Green, 1993; Chi et al., 1995). Weitere direkte Kontakte von VP16:AD mit generellen Transkriptionsfaktoren wurden gefunden für TFIIA (Kobayashi et al., 1995), die p62-Untereinheit von TFIIH (Xiao et al., 1994), die RAP74-Untereinheit von TFIIF (Zhu et al., 1994), PC4 (Kretzschmar et al., 1994a), TBP (Nedialkov und Triezenberg, 2004) und TAF9 (Goodrich et al., 1993; Klemm et al., 1995; Uesugi et al., 1997). VP16:AD bindet darüberhinaus auch den Elongationsfaktor p-TEFb (Kurosu und Peterlin, 2004), den STAGA- (Martinez et al., 2001) und den TFTC-Komplex (Hardy et al., 2002). Darüberhinaus ist auch Interaktion des Säugerzellen-Mediators mit VP16:AD beobachtet worden (Naar et al., 1999). Wie generell für saure Aktivatordomänen gezeigt wurde, kann desweiteren VP16:AD eine umfangreiche Dekondensation des Chromatins in Heterochromatin-Regionen der Zelle bewirken (Tumbar et al., 1999; Carpenter et al., 2005). In diesem Zusammenhang ist bekannt, daß VP16:AD im Kontext der Chromatin-verpackten DNA über eine Reihe von Chromatin-modifizierenden-Faktoren wirkt. Darin führt die Rekrutierung der

Histon-Acetyltransferasekomplexe SAGA und NuA4 durch VP16:AD in Hefe zur Acetylierung der an VP16 bindenden Nukleosome und zu einer Transkriptionsaktivierung im Kontext des Chromatin-Systems (Utley et al., 1998; Ikeda et al., 1999). Für Säugerzellen konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß die Histon-Acetyltransferase p300 an VP16:AD bindet und kritisch für die Aktivierung von in Chromatin verpackten DNA-Templaten ist (Kraus et al., 1999). Bekannt ist auch die Interaktion des Chromatin-modifizierenden Swi/Snf-Komplexes mit VP16:AD in Hefe (Neely et al., 1999). Darüberhinaus liegen auch Informationen über die Interaktion einer unbekannten Chromatin-modifizierenden Aktivität mit VP16:AD in Hefe vor (Robinson und Schultz, 2005).
In der Abbildung 4 sind die hier beschriebenen verschiedenen Interaktoren der VP16-Aktivierungsdomäne veranschaulicht. In der Darstellung sind auch, soweit bisher bekannt, die direkten Bindungspartner an die VP16:H1- und VP16:H2-Subdomänen angezeigt.

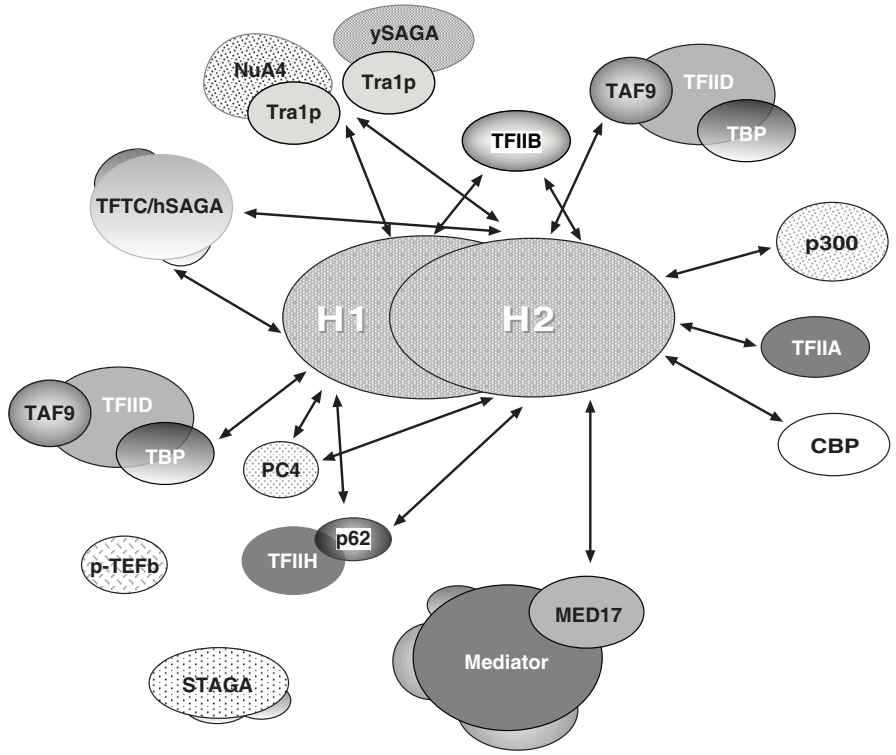


Abbildung 4: Schematisch vereinfachte Darstellung der literaturbekannten Interaktoren der VP16-Aktivierungsdomäne bzw. der Subdomänen VP16:H1 (H1) und VP16:H2 (H2). Die direkten

Wechselwirkungen der Interaktoren mit den beiden Subdomänen sind durch Doppelpfeile gekennzeichnet. Diese schematisch dargestellten Interaktionen beruhen auf Daten, die im Säugersystem und in der Bäckerhefe erstellt wurden. TFIIA (Kobayashi et al., 1995); TFIIB (Jonker et al., 2005); p62/TFIIH (Xiao et al., 1994); TFIID (Uesugi et al., 1997; Klemm et al., 1995); TAF9 (Uesugi et al., 1997); TBP (Nedialkov und Triezenberg, 2004); PC4 (Kretzschmar et al., 1994a); p300 (Kraus et al., 1999); TFTC-Komplex (Hardy et al., 2002); SAGA (Utley et al., 1998); Tra-1 (Brown et al., 2001); MED17 (Ito et al., 1999); Für STAGA (Martinez et al., 2001) und p-TEFb (Kurosu und Peterlin, 2004) ist die Interaktion mit VP16:AD nachgewiesen, indessen jedoch ihre Bindung an die beiden Subdomänen nicht weiter präzisiert.

1.5 Cofaktoren

Aktivatoren können nicht direkt Signale von regulatorischen Oberflächen auf die basale Transkriptionsmaschine übertragen. Sie benötigen dafür weitere spezielle Proteine, die Cofaktoren. Diese dienen als Vermittler zwischen der regulatorischen Oberfläche des Aktivators und der basalen Transkriptionsmaschine. Weiterhin binden sie Transkriptionsfaktoren, die an der Chromatinumwandlung beteiligt sind. Wichtige Klassen von Cofaktoren, die ohne Kontext eines Chromatinsystems die Transkription der RNA-Polymerase II vermitteln, werden nachfolgend vorgestellt:

1.5.1 TAFs

Die TAFs als Klasse von Cofaktoren werden im Komplex zusammen mit TBP als genereller Transkriptionsfaktor TFIID bezeichnet. Darin vermitteln die TAFs die Transkriptionsaktivierung des jeweiligen Aktivators (Dynlacht et al., 1991). Einzelne TAFs wechselwirken mit unterschiedlichen Aktivierungsdomänen und ermöglichen dadurch zusätzliche regulatorische Signale (Übersichtsartikel: Verrijzer und Tjian, 1996; Albright und Tjian, 2000). Wie bereits in Abschnitt 1.4.2 näher aufgeführt, ist TFIID auch für die Aktivierung von VP16 von wesentlicher Bedeutung.

1.5.2 Cofaktoren aus der USA-Fraktion

Eine weitere Klasse von Cofaktoren stellen die aus USA (“upstream factor stimulatory activity“) gewonnenen Proteine dar. Bei USA handelt es sich um eine grobe chromatographische Fraktion aus menschlichen Zellen (Meisterernst und Roeder, 1991). Darin konnten Cofaktoren nachgewiesen werden, die entweder die Transkription stimulieren oder aber reprimieren. Demnach werden sie als positive (PC) und negative (NC) Cofaktoren bezeichnet (Übersichtsartikel: Kaiser und Meisterernst, 1996). Bis zu Beginn dieser Arbeit waren folgende Cofaktoren der USA-Fraktion bekannt: PC1/PARP (Meisterernst et al., 1997), PC2 (Kretzschmar et al., 1994b; Malik et al., 2000), PC3/Dr2/Topoisomerase I (Kretzschmar et al., 1993; Merino et al., 1993), PC4 (Ge und Roeder, 1994a; Kretzschmar et al., 1994a), PC5 (Halle et al., 1995), p52/p75 (Ge et al., 1998), NC1/HMG2 (Stelzer et al., 1994), Topoisomerase II (Brou et al., 1993), NC2 (Goppelt und Meisterernst, 1996) und HMG1 (Ge und Roeder, 1994b). Befunde im eigenen Arbeitskreis verwiesen auf eine weitere Aktivität, die PC6 genannt wurde. Auch wurde angenommen, daß PC6 spezifisch die Aktivierung von VP16 vermittelt. Die Weiterentwicklung dieser Annahme ist u.a. Gegenstand dieser Arbeit.

1.5.3 Mediator-Komplexe

Mediator-Komplexe stellen eine weitere Klasse von Cofaktoren dar. Historisch gesehen führte die Suche nach Cofaktoren in *S. cerevisiae* 1990 zur Entdeckung von noch unbekannten Faktoren, die fest an Aktivatoren binden (Berger et al., 1990; Kelleher et al., 1990). Die Charakterisierung dieser Faktoren in einem gereinigten *in-vitro*-Transkriptionssystem präzisierte die vorgenannten Befunde und ergab erste Hinweise auf die Existenz eines Mediator-Komplexes (Flanagan et al., 1991). Unabhängig davon erwies sich damals eine Gruppe von Proteinen, die das Produkt von SRB-Genen waren, als Suppressoren von RNA-Polymerase II-CTD-Mutanten (Nonet und Young, 1989). In der Folge konnte gezeigt werden, daß diese SRB-Proteine mit CTD assoziiert vorliegen (Thompson et al., 1993). Ausgehend von den vorgenannten Studien gelang anschließend die Reinigung und Analyse eines ersten Mediators. Dieser erwies sich als komplexe Einheit von auffälliger molekularer Größe. Der Komplex bestand aus den vorgenannten SRB-Proteinen und weiteren damals noch unbekannten Mediator-Untereinheiten (Kim et al., 1994).

Daran anschließend gelang auch verschiedenen anderen Laboratorien die Reinigung von Mediator-Komplexen aus *H. sapiens*. Es waren dies ARC/CRSP, DRIP, PC2, SMCC und TRAP (Naar et al., 1998a; Rachez et al., 1999; Ito et al., 1999; Malik et al., 2000; Taatjes et al., 2002). Man ging zunächst davon aus, daß es sich um jeweils völlig verschiedene Mediator-Komplexe handelt. In der Folge konnten jedoch große Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Komplexen festgestellt werden. Die zuerst angenommenen großen Unterschiede ließen sich durch die eingesetzten unterschiedlichen Reinigungsmethoden und funktionellen Studien erklären. Weitere Untersuchungen zeigten schließlich, daß alle diese Komplexe humanen Mediator repräsentieren (Sato et al., 2004). Ob die einzelnen Komplexe jeweils eigenständige funktionelle Mediator-Zustandsformen darstellen, ist allerdings noch offen.
Neben Mediatoren aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens* wurden inzwischen auch solche aus *S. pombe*, *C. elegans* und *D. melanogaster* isoliert und charakterisiert (Übersichtsartikel: Blazek und Meisterernst, 2005). Gezeigt werden konnte auch, daß in allen Mediator-Komplexen der verschiedenen Spezies bestimmte Untereinheiten konserviert vorliegen (Sato et al., 2004). In den verschiedensten Organismen sind bisher insgesamt 37 Mediator-Untereinheiten gefunden worden. Davon sind nach derzeitigem Wissensstand 22 in allen Eukaryonten hoch konserviert. Dies war in jüngster Zeit auch der Anlaß, die Mediator-Untereinheiten aus allen Organismen (außer *C. elegans*) in einer einheitlichen Nomenklatur als MED1 bis MED31 zu definieren. Die Mediator-Untereinheiten CDK8 und Cyclin C behielten allerdings ihre Namen bei (Bourbon et al., 2004).

Struktur des Mediator-Komplexes: Genetische, biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen insgesamt ermöglichten modellhafte Aussagen zum strukturellen Aufbau des Hefe-Mediators (Asturias und Kornberg, 1999; Dotson et al., 2000; Davis et al., 2002; Sato et al., 2003a; Sato et al., 2003b; Guglielmi et al., 2004). Dieser besitzt eine modulare Struktur, die man in “head“-, “middle“- und “tail“-Modul einteilt. Der elektronenmikroskopische Befund des Säuger-Mediators im Vergleich zum Hefe-Mediator zeigt weitgehend Übereinstimmung (Naar et al. 2002; Taatjes und Tjian; 2002 Taatjes et al., 2004). Dieser Befund legt einen entsprechenden modularen Strukturaufbau auch für den Säuger-Mediator nahe.
Das “head“-Modul des Mediators ist sowohl an die RNA-Polymerase II als auch an

die jeweilige Promotor-Region (Takagi et al., 2006) und an TBP gebunden (Lariviere et al, 2006). Das “middle“-Modul bildet eine zusätzliche Kontaktstelle zur RNA-Polymerase II. Eine hochauflösende Kristallstruktur des Hefe-Mediators macht deutlich, daß das Heterodimer MED7/MED21 zum “middle“-Modul des Mediators gehört. Diesem Heterodimer kommt eine wichtige Rolle bei der Konformationsänderung des Mediators während der Bindung an die Polymerase II zu (Baumli et al., 2005). Weiterhin ist das “middle“-Modul, wie eine neuere Studie in Hefe zeigt, auch wichtig für die Regulation der Interaktionen zwischen den Modulen (Baidoobonso und Myers, 2007). Funktionelle Studien zeigen, daß das “tail“-Modul sowohl an der Repression wie auch an der Aktivierung der Transkription beteiligt ist (Übersichtsartikel: Blazek et al., 2005). Die biochemische Charakterisierung der humanen Mediator-Komplexe B-Med, PC2 und CRSP ließ erkennen, daß diese jeweils einen Satz von 18 bis 20 Mediator-Untereinheiten gemeinsam beinhalten (Sato et al., 2004, Malik und Roeder, 2005a). Diese Proteine sind fest miteinander assoziiert und konstituieren möglicherweise einen strukturellen und funktionellen Kern-Mediator. Demgegenüber sind andere Mediator-Untereinheiten anscheinend weniger fest gebunden. Dies sind MED1, MED12, MED13 MED16, MED23, MED24, MED26, CDK8 und Cyclin C.

Nach derzeitigem Wissenstand bilden CDK8, Cyclin C, MED12 und MED13 ein Submodul, das CDK8-Submodul. Es können nämlich Mediator-Komplexe mit bzw. ohne dieses Submodul isoliert werden (Liu et al., 2001b; Samuelsen et al., 2003). Mediator-Komplexe, die dieses Submodul enthalten, werden inzwischen als “große Mediator-Komplexe“ bezeichnet. Komplexe ohne dieses Submodul nennt man hingegen “kleine Mediator-Komplexe“. Bekannt als “große Mediatoren“ sind NAT, ARC-L und als “kleine Mediatoren“ CRSP, CRSP2, PC2 und B-Med (Sun et al., 1998; Malik et al., 2000; Naar et al., 2002; Mittler et al., 2001; Taatjes et al., 2004b). Strukturuntersuchungen zeigten, daß das CDK8-Submodul sowohl das “middle“ als auch das “head“-Modul im Mediator-Komplex bindet. Weiterhin zeigten diese Untersuchungen, daß das CDK-Submodul, unabhängig von der CDK8-Kinase-Aktivität, die Interaktion des Mediators mit der RNA-Polymerase II sterisch blockiert (Elmlund et al., 2006).

Vermutet wird, daß auch die Untereinheiten MED16, MED23 und MED24 ebenfalls ein eigenständiges Submodul bilden. Hinweis darauf ist, daß in “knock-out“-Mauszellen, denen MED23 (Stevens et al., 2002) bzw. MED24 fehlt (Ito et al., 2002), auch die jeweiligen anderen Untereinheiten aus diesem hypothetischen Submodul abgehen.

Es ist auch wichtig zu erwähnen, daß die Mediator-Komplexe TRAP (Malik et al., 2005) und ARC (Taatjes et al., 2002) nur substöchiometrische Mengen an MED26 enthalten. Darüberhinaus wurde der Mediator-Komplex CRSP/Med2 identifiziert; Diesem fehlen MED1 und MED26 (Taatjes und Tjian, 2004). Letzter Befund verweist auf die lose Bindung der beiden Mediator-Untereinheiten an den Kern-Mediator.

Organisation des Mediator-Komplexes: Zur Organisation zwischen Submodulen und einzelnen Untereinheiten konnte in den letzten Jahren auch eine Reihe von Kenntnissen gewonnen werden. Bekannt ist, daß bestimmte Untereinheiten des Mediators jeweils als Integrationsoberfläche für Signale von Aktivatoren und Repressoren dienen können. Diese werden dann innerhalb des Mediator-Komplexes weitergeleitet. Speziell durch die Untersuchung von Expressionsprofilen in Hefe ließ sich zeigen, daß die Mediator-Untereinheiten MED2 und MED18 die Aktivität von CDK8 negativ regulieren (van de Peppel et al., 2005). Zudem finden antagonistische Effekte zwischen dem CDK8-Submodul und einzelnen Komponenten des “tail“- (MED2, MED3, MED15), “head“-(MED20, Med18) und “middle“-Moduls (MED31) statt (van de Peppel et al., 2005). Bei der negativen Regulation der Untereinheiten innerhalb des Mediator-Komplexes spielt vermutlich die Phosphorylierung von MED2 durch CDK8 eine wesentliche Rolle. MED2 kann nämlich sowohl *in vitro* (Hallberg et al., 2004) als auch *in vivo* (van de Peppel et al., 2005) durch CDK8 phosphoryliert werden. Ebenfalls in Hefe gelang durch 2-Hybrid-Experimente der Nachweis, daß MED21 Signale von Aktivatoren innerhalb des “middle“-Moduls integriert (Hallberg et al., 2006).
Weiterhin zeigten verschiedene Studien in Hefe, daß das CDK8-Submodul die Transkription inhibiert (Übersichtsartikel: Carlson, 1997). Andere Studien in Hefe wiesen hingegen nach, daß CDK8 in der codierenden Region sowohl von inaktiven Genen, als auch von aktiven Genen gefunden werden kann (Andrau et al., 2006; Zhu et al., 2006). Für Mediator aus Säugerzellen wurde beobachtet, daß Mediator-Komplexe, die das CDK8-Modul enthalten, die Transkription *in vitro* reprimieren (Gu et al., 1999; Sun et al., 1998; Akoulitchev et al., 2000). Darüberhinaus ergaben Untersuchungen bei bestimmten Genen, daß sich inaktive “große Mediator-Komplexe“ unter Abspaltung des CDK8-Moduls in aktive “kleine Mediator-Komplexe“ umwandeln (Taatjes et al., 2002; Mo et al., 2004; Uhlmann et al., 2007). Demgegenüber erwiesen andere Studien die Anwesenheit von CDK8 sowohl in aktiven als auch inaktiven Mediator-Komplexen

(Übersichtsartikel: Malik et al., 2005 und Wang et al., 2005a). Bei letzteren Untersuchungen konnte kein Einfluß von CDK8 auf die Transkriptionsaktivierung festgestellt werden. Eine aktuelle Studie ergab allerdings auch Hinweise auf eine positive Rolle von CDK8 bei der Transkriptionsaktivierung (Furumoto et al., 2007).

Die Transkriptionsregulation durch Mediator: Der Mediator wird inzwischen auf Grund seiner funktionellen Bedeutung für die basale und aktivierte Transkription auch als ein genereller Transkriptionsfaktor angesehen (Takagi und Kornberg, 2006). Es ist bekannt, daß funktionelle Mediator-Kontakte mit der RNA-Polymerase II, den GTFs, Aktivatoren, genspezifischen Transkriptionsfaktoren und anderen Cofaktoren stattfinden.

So ist anzunehmen, daß der Mediator eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den Promotor spielt. Man findet in eukaryontischen Zellkernextrakten Mediator gebunden an die RNA-Polymerase II (Thompson et al., 1993; Kim et al., 1994; Myers und Kornberg, 2000; Taatjes et al., 2004a). Funktionelle Studien zeigten weiterhin, daß der Mediator bei bestimmten Genen gleichzeitig mit Polymerase II an den Promotor bindet (Hatzis und Talianidis, 2002; Metivier et al., 2003). Studien an anderen Genen erbrachten den Nachweis, daß Mediator und RNA-Polymerase II auch einander nachfolgend zu Promotoren rekrutiert werden (Cosma et al., 2001; Park et al., 2001).

Weiterhin vermag der Mediator, wie bereits erwähnt, die Aktivität der RNA-Polymerase II zu regulieren. Darin kann die Mediator-Untereinheit CDK8 die *C*-terminale Domäne CTD der größten RNA-Polymerase II-Untereinheit phosphorylieren und dadurch die Bildung des Transkriptions-Initiations-Komplexes verhindern (Hengartner et al., 1998). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß CDK8 die TFIIH-vermittelte Phosphorylierung des CTD inhibiert und dadurch die Transkription reprimiert (Akoulitchev et al., 2000). Beobachtet wurde auch, daß nur eine ganz bestimmte RNA-Polymerase-Subpopulation funktionell vom Mediator-Komplex abhängig ist (Hu et al., 2006).

Nachgewiesen werden konnte, daß der Hefe-Mediator (Kim et al., 1994; Takagi und Kornberg, 2006) und auch der humane Mediator die basale Transkription stimuliert (Mittler et al., 2001; Baek et al., 2002, Wu et al., 2003). Dabei sollte laut Baeck der Mediator die basale Transkription durch Rekrutierung von TFIIB zum Promotor fördern

(Baek et al., 2006).
Der Mediator wirkt nachweislich wesentlich auf die Bildung des PIC. Dazu konnte gezeigt werden, daß die Rekrutierung einiger GTFs zu aktiven Promotoren in Abhängigkeit von Mediator erfolgt (Kuras und Struhl, 1999; Li et al., 1999). Gefunden wurde auch, daß die Aktivator-abhängige Zusammensetzung des PIC in Kernextrakten kooperativ zwischen Mediator und TFIID verläuft (Johnson et al., 2002). Darüberhinaus zeigten Studien, daß der Mediator direkt mit TFIIH über seine Untereinheiten MED4 und MED14 interagiert (Sakurai und Fukasawa, 2000; Formstecher et al., 2005).
Wie weitere Studien verdeutlichen, ist der Mediator auch nach dem Zusammenbau des PIC noch funktionell wirksam. Dieser stimuliert auch die Initiation von bereits an den Promotor gebundener RNA-Polymerase II (Wang et al., 2005a). In Hefe konnte gezeigt werden, daß CDK8 eine überlappende Rolle zusammen mit CDK7 spielt. Dabei vermitteln diese Beiden die ATP-abhängige Dissoziation des Präinitiationskomplexes in das Gerüst für die Elongationsphase (Liu et al., 2004). Weiterhin sind funktionelle Kontakte von Mediator mit Elongationsfaktoren beschrieben worden (Malik et al., 2007). Hinweise gibt es zudem darauf, daß der Mediator auch grundsätzlich eine wichtige Rolle bei der Reinitiation spielt (Yudkovsky et al., 2000; Rani et al., 2004).

1.6 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es neue Erkenntnisse zur Regulation der Transkription des Modell-Aktivators VP16 zu gewinnen. Dabei sollte die Domänenspezifität von Cofaktoren an die H1- und H2-Region der VP16-Aktivierungsdomäne *in vitro* bzw. *in vivo* untersucht werden. Es galt herauszuarbeiten, ob die Histon-Acetyltransferase CBP an VP16:H1 und VP16:H2 bindet und für die Aktivierung der beiden Subdomänen benötigt wird. Weiterhin sollte die Interaktion von humanen Mediator-Komplexen mit VP16:H1 und VP16:H2 untersucht werden. Ein anderer Schwerpunkt dieser Arbeit zielte auf die Charakterisierung eines neuen Proteins mit einem Molekulargewicht von 103 kDA (p103). p103 war zuvor in diesem Arbeitskreis über Affinitätschromatographie an VP16:H1 gereinigt und kloniert worden. Es galt zu klären, ob p103 ein Cofaktor für VP16 ist. Weiterhin sollte auch untersucht werden, ob p103 eine Komponente des humanen Mediators darstellt. Eine weitere Zielsetzung war die Suche nach unbekannten Interaktoren von humanen Mediator-Komplexen.

2 Material

2.1 Geräte und Hilfsmittel

ÄKTA	Amersham Pharmacia Biotech (APC)
Agarosegelelektrophoreseapparaturen	BioRad
Analysenwaagen	SPB55, SPB63, Scaltec
Autoradiographiekassetten	Appligene, APB
Chromatographiesäulen (vorgepackt)	Superose 6 PC3.2/30, APC
	Q-Sepharose HL 16/10, APC
Direct Imager	Instant Imager, Packard
ELISA-Reader	Lambda F, MWG-Biotech
Entwicklermaschine	Hyperprocessor, APB
Elektroblot-Apparatur (semi-dry)	BioRad
Elektroporationsapparatur (Gene Pulser)	Typ 1652077, BioRad
FPLC	APB
Gefrierschränke	HFU686, HFU 630, Heraeus
Geigerzähler	LB122, Berthold
Geldokumentationssystem	Eagle Eye II, Stratagene
Geltrockner	Slab Gel Dryer, Modell GD2000, Hoefer
Heizblöcke	Eppendorf-Thermostat 5320
Heizrührgeräte	RCT basic, IKA Labortechnik
Homogenisator	Douncer, Wheaton
Hybridisierungsofen	Uniequipe 6/12
Inkubatoren (Brutschränke)	Forma Scientifique Heraeus B6200
Konduktometer	Typ 703, Knick
Kühlschränke	Liebherr
Leersäulen	Econo, BioRad
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss
Lumat	Typ LB 9501, Berthold
Magnetic Beads	MagneSphere, Promega
Magnetrührer	REO, IKAMAG
Naßblotapparatur	BioRad
PCR-Thermocycler	Robocycler, Stratagene
	GeneAmp 2400, Applied Biosystems

	GeneAmp 5700, Applied Biosystems
	T Gradient, Biometra
pH-Meter	Calimatic 760, Knick
Pipetten	Gilson Pipetman P2, P20, P200, P1000
Pipettierhilfe	Pipetus-akku, Hirschmann
Photometer	Beckman DU-640 Spektrophotometer
Pumpe	Modell P1, APB
Reaktionsgefäßschüttler	Thermomixer 5437 u. 5438, Eppendorf
Roller Mixer	Typ SRT1, Stuart Scientifique
Rotoren	SS34, GSA, GS3, SLA-1500, SLA-300,
	SA600, Sorvall
Säulenmaterial	Heparin Sepharose CL-B,
	Protein G Sepharose FF,
	Protein A Sepharose FF,
	Glutathionsepharose 4B,
	Nickel-NTA-Agarose, Qiagen
	Phosphocellulose P11,
	Whatman
Schüttelinkubator	Innova 4400, Innova 4430,
	New Brunswick Scient.
Schüttelwasserbad	Typ 1083, GFL
SDS-PAGE-Apparaturen	Hoefer
SMART-System	APB
Sonifikator	Branson Sonifier, Modell 250-D
Spannungsgeräte	EPS 3500, APB
	PS250-2, Sigma
	PowerPAC 200, PowerPAC 3000, BioRad
	EPS 2A200, Hoefer
	E734, Consort
Spinnergefäße	Witeg, Wheaton
Sterile Werkbank	Typ UVF 6.12 S, BDK
Stickstofftank	Typ XLC-230, MCE Cryogenics
Szintillationszähler	Beckman LS 6000 TA
Taumler	Polymax 1040, Heidolph
	KS250, IKA Labortechnik

	Typ 3011, GFL
Tischautoklav	MELAG
Überkopfschüttler	REAX2, Heidolph
UV-Illuminatoren	Bachofer (254 nm, 366 nm)
Vakuumkonzentrator	RVC2-18 mit Kühlfalle CT02-50, Christ
Verstärker-Folie	Gel Intensifying Screen, Kodak
Vortex	Vortex Genie, Bender & Hobein
Wasserbäder	Thermo C10, Haake
Zentrifugen	J6 MC, Beckman
	Multifuge 3 L-R, Varifuge 3.OR,
	Biofuge 28RS, Heraeus
	Tischzentrifuge EBA 3S, Hettich
	Zentrifuge 5417, 5415R, Eppendorf
	2K15, Sigma
	5B Plus, Sorvall
	5C Plus, Sorvall

2.1.1 Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

Dialysefilter (0.025 μm Porendurchmesser)	Millipore
Dialyseschläuche (Viking, MWCO 15 kDa)	Roth
ECL Western Blot Kit	NEN
Einwegplastikmaterial	Greiner, NUNC
Filme	X-OMAT, BioMax, Kodak
Gel Drying Kit	Promega
Gelfiltrationssäulchen (G-25)	APB
Gewebekulturplatte (96-Loch),	Becton Dickinson
Microtest III, Falcon 3075	
GFX PCR DNA und	APB
Gel Band Purification Kit	
Luciferase Assay System	Promega
Sephadex G-50 (Nick column)	APB
Nitrocellulosemembran	BioRad
(0.45 μm Porendurchmesser)	
Nucleobond AX Plasmid DNA Kit	Macherery & Nagel

PCR-Reaktionsgefäße	Biozym
pH-Indikatorpapier (Neutralit pH 5-10)	Merck
PVDF-Membran (Transblot)	BioRad
Silikonisierte Plastikreaktionsgefäße, 1.7 ml, prelubricated	Sorenson Bioscience Inc.
Silver Staining Kit: plusone	APB
Sterilfilter (Millex-GP, 0.22 μm)	Millipore
Ultrafiltrationseinheit (MWCO 30 kDa)	Amicon
Ultrafiltration-Filtereinheit (MWCO 10 kDa)	Millipore
Ultrafree-Filtereinheit (0.45 μm Porendurchmesser)	Millipore
Whatman 3MM Papier	Bender & Hobein
Zellkulturflaschen, Nunclon Surface	Nalge Nunc International

2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamidlösung 30%, Rotiphorese Gel 30	Roth
Acrylamidlösung 30%, Rotiphorese Gel A	Roth
Agarose	Gibco BRL+
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Aprotinin	Boehringer Mannheim
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bacto Yeast Extract	Difco
Benzamidin	Sigma
Bisacrylamidlösung 2%, Rotiphorese Gel B	Roth
Borat (Natriumsalz)	Roth
Borsäure	Roth
Bradford-Reagenzlösung	BioRad
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Promega
Bromphenolblau	Merck
BSA-Lösung, 20 mg/ml	Merck

Calciumchlorid	Roche
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Riedel-de Haën
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
Coomassie Briliant Blue R-250	Sigma
Desoxyribonukleosidtriphosphate	USB
Dimethylpimelidat	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer Mannheim
DMEM-Medium (high glucose)	Gibco BRL
Essigsäure	Riedel-de Haën
Ethanol	Roth
Ethanolamin	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	Merck
FCS	Gibco BRL
Formamid	Merck
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia
Glutathion	Sigma
L-Glutaminlösung (200 mM)	Gibco BRL
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidiniumhydrochlorid	Roth
Harnstoff	Merck
HEPES	Biomol
Hexadecyltriammoniumbromid (CTAB)	Sigma
Imidazol	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl-b-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Boehringer Mannheim
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck

Kaliumhydroxid	Merck
N-Laurylsarcosin	Calbiochem
Lithiumchlorid	Sigma
Magermilchpulver	Frema
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck
Methanol	JT Baker
Natriumazid	Merck
b-Mercaptoethanol	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Nickelsulfat	Merck
Nonidet P40 (NP–40)	Sigma
OMG (3'O-Methylguanosin)	APB
Penicillin	Gibco
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phorbolmyristylester (PMA)	Sigma
Poly(dGdC)	Sigma
Polyoxyethylensorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Ribonuklease-Block	Stratagen
Ribonukleosidtriphosphat	USB
Rinderserumalbumin (BSA)	Boehringer Mannheim
Roti-Phenol/Chloroformlösung (TE-gesättigt)	Roth
RNA aus Saccharomyces cerevisiae	Roth
RPMI 1640-Medium (Festsubstanz)	Gibco
Salzsäure (HCl, 37%)	Riedel-de Haën
Streptomycin	Gibco
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Serva
Trichloressigsäure	Fluka
Trishydroxymethyl-aminoethan (Tris)	Riedel-de Haën
Triton-X100	Sigma

Xylencyanol	BioRad
yeast total RNA	Serva

2.1.3 Enzyme

Calf intestine phosphatase CIP, (Alkalische Phosphatase)	MBI Fermentas
DNA-Polymerase I (Kleenow-Fragment)	MBI Fermentas
l-Protein-Phosphatase	NEB
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
RNase A	Roche
RNase T1	Roche
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
Vent-DNA-Polymerase	NEB

2.1.4 Plasmide

pCI-neo	Expression	Promega
pMLC_2AT	Transkription	(Sawadogo und Roeder, 1985)
pMRG5	Transkription	(Kretzschmar et al., 1994a)
pMLδ53	Transkription	(Meisterernst et al., 1991)
pML5xGal	Transkription	(Ge und Roeder, 1994a)
pGLMRG5	eukaryontische Expression	(Ikeda et al., 2002)
pGEX-4T	Expression	APB

2.1.5 Bakterienstämme

DH5α	(Hanahan, 1985)
SURE	Stratagen
BL21 (DE3)	(Studier, 1986)
BL21 (DE3) pLysS	(Studier, 1986)
MC1061	(Casadaban, 1980)

2.1.6 Eukaryontische Zellinien

HeLa-Zellen: humanes Cervix-Karzinom
Jurkat-J6-Zellen: humane Leukämie T-Zell-Lymphoblasten
SW13-Zellen: humane Adenokarzinomzellen (adrenaler Cortex)
293T-Zellen: transformierte primäre humane embryonale Nierenzellen

2.1.7 Antikörper

Primärantikörper:

Antikörper	Bezeichnung	Tier	Bezug	Verdünnung
anti-PAQ	1H7	Ratte	E. Kremmer, München	1:10
anti-PAQ	6C9	Ratte	E. Kremmer, München	1:10
anti-CBP (HAT)	6D6	Ratte	E. Kremmer, München	1:10
anti-CBP (HAT)	1C8	Ratte	E. Kremmer, München	1:10
anti-hMed7	3E12	Ratte	E. Kremmer, München	1:10
	2A6	Ratte	E. Kremmer, München	1:10
anti-NC2α	4G7	Ratte	E. Kremmer, München	1:10
anti-NC2α	6G8	Ratte	E. Kremmer, München	1:10
anti-CTD	8WG16	Maus	E. Kremmer, München	1:10
anti-VCI/p103	9C2	Ratte	E. Kremmer, München	1:10
anti-hRPB1	sc-899 (N-20)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-Brg1	sc-8749 (N-15)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-Brg1	sc-10768 (H88)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.	1:500

anti-BAF170	sc-9744 (C-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-Ini1	sc-9749 (N-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.	1:2000
anti-PCAF	sc-8999 (H-369)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.	1:1000
anti-TRRAP	sc-5405 (T-17)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-hGcn5	2GC-2C11	Maus	Dr. L. Tora, Illkirch-Strasbourg	1:3000
anti-SAP130	1YO-1B10	Maus	Dr. L. Tora, Illkirch-Strasbourg	1:3000
anti-p300	cs-584 (N-15)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.	1:1000
anti-TRAP100		Kaninchen	Dr. R. G. Roeder, New York	1:500
anti-TRAP220	sc-8998 (M-255)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-TRAP240	sc-5369 (Y-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-CRSP70	sc-9426 (T-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-DRIP130		Kaninchen	Dr. L. P. Freedman, New York	1:500
anti-DRIP150		Kaninchen	Dr. L. P. Freedman, New York	1:500
CRSP77/TRAP80	sc-12453(G-17)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-hMed6	sc-9433 (E-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
Srb7	sc-9439 (V-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-Cdk8	sc-1521 (C-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnol.	1:1000
anti-PC1/PC4		Kaninchen	Eigenproduktion	1:500
anti-TAFII130	sc-736	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-TAFII30	6TA-2B11	Maus	Dr. L. Tora, Illkirch-Strasbourg	1:3000
anti-TAFII100	12TA-2D2	Maus	Dr. L. Tora, Illkirch-Strasbourg	1:3000
anti-RAP74	sc-234 (N-16)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-TFIIEα	sc-237 (C-17)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnol.	1:500
anti-TFIIH (p62)		Kaninchen	Eigenproduktion	1:500
anti-Flag	M2	Maus	Sigma	1:500

Sekundärantikörper:

Esel anti-Ziege IgG (sc-2022)	HRP-Konjugat	Santa Cruz Biotechnol.
Esel anti-Ziege IgG (sc-2022)	AP-Konjugat	Santa Cruz Biotechnol.
Ziege anti-Maus IgG H+L (S3721)	AP-Konjugat	Promega
Ziege anti-Kaninchen IgG Fc (S3731)	AP-Konjugat	Promega
Ziege anti-Ratte IgG H+L (S3831)	AP-Konjugat	Promega
Ziege anti-Kaninchen IgG H+L (W4011)	HRP-Konjugat	Promega
Ziege anti-Maus IgG H+L (W4021)	HRP-Konjugat	Promega

Ziege anti-Ratte IgG u. IgM H+L (112-035-068)	HRP-Konjugat	Dianova (Jackson Labs.)
Esel anti-Ziege IgG H+L (705-035-147)	HRP-Konjugat	Dianova (Jackson Labs.)

2.2 Längenstandards

2.2.1 Protein-Längenstandards

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

Protein	Molekulargewicht (Da)	Protein-Standard (niedriger Bereich)	Protein-Standard (hoher Bereich)
Myosin	200000		X
b-Galaktosidase	116250		X
Phosphorylase B	97400	X	X
Serum Albumin	66200	X	X
Ovalbumin	45000	X	X
Carboanhydrase	31000	X	
Trypsininhibitor	21500	X	
Lysozym	14400	X	

2.2.2 DNA-Längenstandards

1 kb DNA-Leiter (GeneRuler), MBI Fermentas Fragmentlängen in bp: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250

1 kb DNA-Leiter, Gibco BRL Fragmentlängen in bp: 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506, 517, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75

100 bp DNA-Leiter (GeneRuler), MBI Fermentas Fragmentlängen in bp: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

2.3 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

BC100:
20 mM Tris, pH 6,8 (RT)
100 mM KCl
20% (v/v) Glycerin
0,2 mM EDTA, pH 8,0

LB-Medium:
1% (w/v) Bacto Trypton
0,5% (w/v) Bacto Yeast Extract
0,5% (w/v) NaCl

PBS:
0,2 g KCl
1,15 g Na_2HPO_4 x 2 H_20
0,2 g KH_2PO_4
H_2O ad 1000 ml
pH 7,2-7,4

TBE:
0,1 M Tris
0,1 M Borsäure
0.45% (w/v) XC
2 mM EDTA, pH 8.0

TE:
10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA, pH 8,0

TGS:
25 mM Tris
0,192 M Glycin
0,11% (w/v) SDS

3 Methoden

3.1 Prokaryontische Zellkultur

3.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Alle Arbeiten mit Bakterien werden unter einer sterilen Werkbank oder auf dem Labortisch direkt neben einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. Kunststoffgeräte, Glaswaren, Metallgeräte und Lösungen werden autoklaviert. Hitzebeständige Glas- und Metallgerätschaften können auch durch kurzes Abflammen keimfrei gemacht werden. Das Bakterium *E. coli* wird auf Festmedium mit einer sterilen Platin-Öse im Verdünnungsausstrich überimpft und bei 37 °C im Brutschrank ÜN inkubiert. In Flüssigkultur wird *E. coli* unter guter Belüftung in LB-Medium bei 37 °C im Schüttler nach Bedarf inkubiert. Sowohl in Flüssig- als auch in Festmedien wird gegebenenfalls das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 μg/ml zugegeben.

LB-Medium: 1% (w/v) Bacto Trypton
0,5% (w/v) Bacto Yeast Extract
0,5% (w/v) NaCl

Festmedium: 1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium

3.1.2 Anlegen von Dauerkulturen

Für Dauerkulturen von *E. coli* werden 1 ml einer stationär in LB gewachsenen Bakterienkultur abzentrifugiert (Eppendorf, 3000 rpm, 1 min) und in 1 ml sterilem 20% (v/v) glycerinhaltigen LB-Medium aufgenommen. Die so gewonnene Bakteriensuspension läßt sich in 2 ml Nunc-Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckeln bei -80°C einfrieren.

3.2 Eukaryontische Zellkultur

3.2.1 Zellenvermehrung eukaryontischer Zellinien

Alle Arbeiten werden unter der Sterilbank mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, autoklavierten Glaswaren und mit vom Hersteller entkeimten Kunststoffmaterialien sowie Nährmedien durchgeführt.
HeLa-Zellen hält man in RPMI 1640-Medium, das mit 5% FCS (v/v), 1000 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin supplementiert ist. Nährmedien, die FCS enthalten, werden im nachfolgenden Teil der Arbeit als “komplette Medien“ bezeichnet. Die Zellvermehrung von Jurkat J6 Zellen erfolgt wie bei HeLa-Zellen. Man setzt hier allerdings 10% FCS (v/v) zu. Die Haltung der Zellen erfolgt bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit in horizontal gelagerten Zellkulturflaschen oder Spinnergefäßen auf Magnetrührern. Die Zellen werden jeden Tag in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und mit frischem “kompletten Medium“ auf eine Zelldichte von ca. 3,0 x 10^5 Zellen/ml verdünnt. Bei logarithmischem Wachstum verdoppelt sich die Zelldichte bei 37 °C in ca. 20 h.
Die Zellvermehrung der adhärenten 293T-Zellen und SW13-Zellen erfolgt in Kulturschalen bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit. Als Medium dient DMEM-Medium (“high glucose“), das mit 10 FCS (v/v), 1000 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin supplementiert wird. Die Zellen dichtgewachsener Platten (70-90% Konfluenz) werden verdünnt. Dazu wird das Medium von der Kulturschale abgezogen und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend verteilt man 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Fa. Sigma) auf die Schale und inkubiert diese 5 min bei 37°C. Die dadurch von der Oberfläche der Schale abgelösten Zellen werden auf 4 Schalen aufgeteilt. Anschließend wird neues Medium zugegeben (7 ml Medium für 6 cm Ø Schalen, 15 ml Medium für 10 cm Ø Schalen, 24 ml Medium für 14 cm Ø Schalen).

PBS: 0,2 g KCl
1,15 g Na_2HPO_4 x 2 H_20
0,2 g KH_2PO_4
H_2O ad 1000 ml
pH 7,2–7,4

3.2.2 Anlegen von Dauerkulturen

Für Dauerkulturen eukaryontischer Zellen wird eine logarithmisch wachsende Suspensions-Kultur abzentrifugiert (Heraeus, 1500 rpm, 5 min). Dann werden je ca. 1.5 x 10^7 Zellen in 1 ml eiskaltem Freeze-Medium aufgenommen und in 2 ml Nunc-Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckel überführt. Die Zellen werden langsam (in einem wärmeisolierenden Behältnis) bei -80 °C eingefroren. Nach zwei Tagen können die Zellen zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff eingebracht werden.
Zum Auftauen werden die Zellen rasch auf dem Wasserbad auf 37 °C erwärmt, mit 10 ml “komplettem Medium“ (Abschn. 3.2.1) vermischt, abzentrifugiert (Heraeus, 1500 rpm, 5 min) und in 40 ml weiterem “kompletten Medium“ resuspendiert.

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

3.3 Herstellung von Zellkernextrakten

3.3.1 Kernextrakte aus HeLa-Zellen

Die Präparation und die Extraktion von HeLa-Zellkernen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Dignam (Dignam et al., 1983).
HeLa-Zellen werden auf eine Zelldichte von 5,5 x 10^5 Zellen/ml wachsen gelassen und dann abzentrifugiert (Beckman J-6B, 10 min, 3.000 rpm, 4 °C). Die Pellets wäscht man anschließend mit einem großen Überschuß an PBS und zentrifugiert erneut (Heraeus, 2.500 rpm, 4 °C). Ab diesem Zeitpunkt erfolgen alle Arbeiten bei 4 °C im Kühlraum. Nach dem Abdekantieren des überstehenden Puffers werden die Röhrchen mit HB-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (Heraeus, 2.500 rpm, 5 min, 4 °C). Der HB-Puffer liefert hypotone Bedingungen, was zum Anschwellen der Zellen führt. Das Volumen des Sediments wird bestimmt und der Überstand vorsichtig abdekantiert. Die Sedimente werden im insgesamt vierfachen Volumen an HB-Puffer suspendiert und auf Eis für weitere 10 min schwellen gelassen. Den Fortgang des Anschwellens überprüft man im Lichtmikroskop. Ein davor entnommenes Aliquot dient als Referenz. Anschließend wird

die Suspension in einen vorgekühlten Glashomogenisator (Typ B) mit dicht sitzendem Pistill überführt. Dann homogenisiert man die Zellsuspension durch 15 harte Stöße mit dem Pistill. Bei diesem Vorgang platzt die äußere Zellmembran. Die Zellkerne bleiben jedoch intakt, was man im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Anschließend wird zentrifugiert (Heraeus, 3.900 rpm, 15 min, 4 °C) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Es hat sich bei der Herstellung von transkriptionsaktiven Zellkernextrakten bewährt, das Cytosol nicht quantitativ zu entfernen, sondern ca. 3 mm Überstand zu belassen. Die Zellkerne werden zusammen mit dem halben Volumenanteil des Pellets an kaltem Niedrigsalzpuffer in den Homogenisator (Typ B) überführt. Dann wird die Suspension sechsmal mit einem Pistill B sanft homogenisiert. Die Suspension legt man anschließend in einem Plastikbecher vor. Unter Rühren wird innerhalb von 30 min langsam Hochsalzpuffer entsprechend dem halben Volumenanteil des Pellets zugetropft. Nach weiteren 30 min Rühren wird der Extrakt vom Zellkernsediment abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 14.000 rpm, 30 min, 4 °C). Den klaren Zellkernextrakt überführt man dann in Dialyseschläuche und dialysiert solange gegen BC0, bis die Leitfähigkeit von BC100 erreicht ist (ca. 50 min). Es schließt sich ein letzter Zentrifugations-Schritt an (Sorvall, SS34, 18.000 rpm, 20 min, 4 °C). Dann kann der Zellkernextrakt aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

HB-Puffer:
10 mM Tris-HCl (pH 6,8 bei RT)
1,5 mM $MgCl_2$
10 mM KCl

Niedrigsalzpuffer:
20 mM Tris-HCl (pH 6,8 bei RT)
25% (v/v) Glycerin
20 mM KCl
1,5 mM $MgCl_2$
0,2 mM EDTA, pH 8,0

Hochsalzpuffer:
20 mM Tris-HCl (pH 6,8 bei RT)
25% (v/v) Glycerin
1600 mM KCl
1,5 mM $MgCl_2$
0,2 mM EDTA, pH 8,0

BC0: 20 mM Tris, pH 6,8 (RT)
20% (v/v) Glycerin
0,2 mM EDTA, pH 8,0

BC100: 20 mM Tris, pH 6,8 (RT)
100 mM KCl
20% (v/v) Glycerin
0,2 mM EDTA, pH 8,0

Allen Puffern wird vor Gebrauch 5 mM DTT, 1 mM PMSF (Stammlösung 200 mM in DMSO) und 0.1 mM Benzamidin (Stammlösung 0.1 M in DMSO) zugesetzt.

3.3.2 Kernextrakte aus 293T-Zellen

Adhärente 293T-Zellen werden in Petrischalen solange kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 80–90% erreicht haben. Für die Herstellung des Kernextraktes wäscht man die Zellen auf einer Petrischale einmal mit PBS und löst diese anschließend mit PBS/1% EDTA von der Oberfläche. Dann werden die Zellen abzentrifugiert (Heraeus, 1000 rpm, 7 min, 4 °C) und das Volumen des Pellets bestimmt. Es wird die dreifache Volumenmenge NEX A-Puffer zugegeben. Dann läßt man die Zellen für 30 min auf Eis schwellen. Die Suspension wird in einen vorgekühlten Glashomogenisator überführt und durch 15 harte Stöße mit einem Pistill (Typ B) homogenisiert. Den Aufschluss der Zellkerne kontrolliert man im Lichtmikroskop. Anschließend wird der Überstand, der das Cytoplasma enthält, abzentrifugiert (Eppendorf, 1565 rpm, 5 min, 4 °C). Die Zellkerne werden dann vorsichtig in dem dreifachen Volumenteil des Pellets in NEX B-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Man zentrifugiert die Suspension (Eppendorf, 13560 rpm, 10 min, 4 °C) und nimmt den klaren Zellkernextrakt als Überstand ab. Bei einer 14 cm Ø Schale mit 293T-Zellen ergibt sich eine Ausbeute von ca. 250 μl Zellkernextrakt mit einer Proteinkonzentration von 2–3 μg/μl.

NEX A: 10 mM HEPES, pH 7,9
0,25% Igepal CA630
10 mM KCl
0,1 mM EDTA, pH 8,0
0,1 mM EGTA, pH 8,0
1,0 mM DTT
0,5 mM PMSF
H_2O ad 10 ml
2 μg/μl Aprotinin

NEX B: 20 mM HEPES, pH 7,9
0,4 M NaCl
1,0 mM EDTA, pH 8,0
1,0 mM EGTA, pH 8,0
1,0 mM DTT
1,0 mM PMSF
10%(v/v) Glycerin
2 μg/μl Aprotinin

3.4 Präparation von Mononukleosomen aus Zellkernsediment

Für die Präparation von Mononukleosomen wird 1 ml des Kernsediments (siehe Abschnitt 3.3.1) zweimal in 10 ml Waschpuffer bei 4 °C gewaschen und abzentrifugiert (Heraeus, 300 rpm, 4 °C). Dann füllt man das Pellet mit Waschpuffer auf ein Gesamtvolumen von 5 ml auf, resuspendiert in einem Glashomogenisator und inkubiert für 15 min bei 37 °C. Man gibt zuerst $CaCl_2$ bis zu einer finalen Konzentration von 0,2 mM und dann Micrococcus Nuclease zu einer finalen Konzentration von 20 U/μl hinzu und inkubiert für 25 min bei 37 °C. Das Reaktionsgemisch wird auf Eis gestellt und durch Zugabe von EDTA bei einer finalen Konzentration von 5 mM gestoppt. Der Überstand, der die Mononucleosomen enthält, wird abzentrifugiert (Heraeus, 300 rpm, 4 °C). Die Mononucleosomen werden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können bei -80 °C aufbewahrt werden.

Waschpuffer: 25 mM Hepes pH 7,4
15 mM NaCl
60 mM LiCl
2,0 mM $MgCl_2$
0,2 mM PMSF
Aprotinin ad 1μg/ml

3.5 Transiente Reporter Assays

3.5.1 Elektroporation

Zur Transfektion menschlicher Tumor-T-Zellinien (Jurkat) hat sich die Elektroporation bewährt. Dazu werden Zellen mit einer Dichte von 3,5 x 10^5–8,5 x 10^5 Zellen/ml abzentrifugiert (Heraeus, 1000 rpm, 5 min) und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend zentrifugiert man die Zellen erneut und nimmt das Zellpellet zu einer Dichte von 3,0 x 10^7 Zellen/ml in RPMI-Medium auf.
Standardmengen für die zu transfizierende DNA waren 10 μg Luciferase-Reporter, 0,5 μg Aktivator und 0,5–10 μg Expressionsplasmid. Der Luciferase-Reporter pGLMRG5 enthält fünf GAL4-DNA-Bindungsstellen stromaufwärts eines synthetischen Kernpromotors (Ikeda et al., 2002). Die Gesamtmenge an transfizierter DNA wird durch Ausgleich mit Expressionsplasmid ohne Insert zwischen verschiedenen Ansätzen konstant gehalten.
400 μl der Zellsuspension werden mit der DNA-Lösung vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand gegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT stellt man die Küvette in eine Elektroporationsapparatur und appliziert einen Puls bei 250 V und 960 μF. Nach weiteren 15 min Inkubation bei RT wird die Zellsuspension zusammen mit 10 ml RPMI 1640-Medium, welches 10% FCS enthält, in eine 6 cm Ø Schale überführt und für 48 h im Zellinkubator inkubiert.

3.5.2 Transfektion mittels Calciumphosphat

Adhärente 293T-Zellen werden mittels Calciumphosphat transfiziert. Calciumphosphat und DNA bilden in geeigneten Verhältnissen Copräzipitate, die von den Zellen besser

aufgenommen werden als reine DNA.
Zwischen 70 und 90% konfluente Zellen werden am Vortag der Transfektion 1:4 mit “komplettem Medium“ verdünnt und auf 6 cm Ø Schalen verteilt (Abschn. 3.2.1). Als Standardmengen bewährten sich 1 μg Reporterplasmid pGLMRG5, 50 ng Aktivator und 0,05–1 μg Expressionsplasmid. Dabei wird die Gesamtmenge an transfizierter DNA zwischen verschiedenen Ansätzen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid ohne Insert ausgeglichen.
Man vermischt die DNA jeweils mit 250 μl einer 250 mM $CaCl_2$-Lösung. In ein 15 ml Falkonröhrchen legt man nun 250 μl Puffer A vor, tropft unter moderatem Vortex die DNA-Lösung zu und inkubiert 15 min bei RT. Dieses Gemisch wird dann auf eine 6 cm Ø Schale mit 293T-Zellen zugetropft, bei der zuvor das alte Medium entfernt und 5 ml frisches DMEM-Medium/10% FCS zugegeben wurde. Anschließend inkubiert man die Zellen für 12 h bei 37° C und 3,4% CO_2. Das Medium wird nun abgezogen und 5 ml frisches DMEM-Medium/10% FCS zugegeben. Dann werden die Zellen noch für weitere 34 h bei 37 $^\circ$C inkubiert.

Puffer A: 280 mM NaCl
50 mM BES
1.5 mM Na_2HPO_4
Der Puffer wird mit 5N NaOH auf pH 6,96 eingestellt

3.5.3 Auswertung der Transfektion

Suspensionszellen werden direkt in 15 ml Falkonröhrchen gesammelt, abzentrifugiert (Heraeus, 1000 rpm, 5 min) und einmal mit einem Überschuß PBS gewaschen. Bei adhärenten Zellen zieht man das Medium von der Platte ab. Nach 15 minütiger Inkubation werden die Zellen durch Zugabe von 5 ml PBS/0,5 mM EDTA von der Platte gelöst. Die Zellen werden abzentrifugiert (Heraeus, 1000 rpm, 5 min), einmal mit überschüssigem PBS-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert.
Das gewonnene Zellpellet nimmt man in 200 μl Lysis-Puffer auf, resuspendiert auf dem Vortex und inkubiert 15 min bei RT. Anschließend zentrifugiert man das Lysat im Eppendorfgefäß ab (Eppendorf, 14000 rpm, 2 min) und nimmt den Überstand ab.

40 μl dieses cytoplasmatischen Proteinextraktes werden in ein Messröhrchen gegeben und in ein Lumineszenz-Messgerät gestellt. Nach automatischer Einspritzung von 100 μl Luciferase-Assay-Reagenz wird jeweils 10 s das bei der enzymatischen Umsetzung des Substrats emittierte Licht gemessen. Die Anzahl der gemessenen relativen Lichteinheiten ist dabei ein Maß für die Menge des in dem Proteinextrakt enthaltenden Enzyms Luciferase.

Das in dieser Arbeit verwendete Reportergen codiert das im Leuchtkäfer *Photinus pyralis* vorkommende Enzym Luciferase; Dieses repräsentiert als primäres Translationsprodukt das aktive Enzym. Die durch Luciferase katalysierte Lumineszenzreaktion ist auf die Oxidation einer heteropolyzyklischen organischen Säure, dem Käfer-Luciferin, zurückzuführen. In einer von ATP und Magnesiumionen abhängigen chemischen Reaktion wird zunächst eine Acyl-AMP-Zwischenstufe des Luciferins gebildet, die in Gegenwart von Sauerstoff zu Oxyluciferin oxydiert wird. Das angeregte Oxyluciferin fällt dann in den Grundzustand zurück, wobei ein Photon emittiert wird.

Lysis-Puffer:
25 mM Tris-phosphat, pH 7,8
2 mM DTT
2 mM 1,2-diaminocyclohexan-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure
10% (v/v) Glycerin
1% (v/v) Triton X-100

Luciferase-Reagenz:
20 mM Tricin
1.07 mM $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2.5H_2O$
2.67 mM $MgSO_4$
0.1 mM EDTA
33.3 mM DTT
270 μM Coenzym A
470 μM Luciferin
530 μM ATP

3.6 DNA- und RNA-Arbeitstechniken

3.6.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung

Die Konzentration der DNA-Lösung wird mit Hilfe eines Photometers durch Messung der optischen Dichte (OD)[1] bei 260 nm ermittelt. Dabei entspricht 1 OD_{260} einer Konzentration von 50 μg ds-DNA/ml. Als Kriterium für die Reinheit einer DNA-Präparation wird zusätzlich die OD bei 280 nm (OD_{280}) gemessen und das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} ermittelt. Für reine DNA schwankt dieses Verhältnis je nach Guanin/Cytosin-Gehalt der Probe zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Quotienten lassen auf Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol, höhere Quotienten auf die Anwesenheit von RNA schließen.
Bei RNA-Lösungen entspricht 1 OD_{260} einer RNA-Konzentration von 40 μg/ml.

3.6.2 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich mit Hilfe von Agarosegelen auftrennen. Dazu wird TBE-Puffer mit 0,7–2% Agarose (w/v) (je nach DNA-Fragmentgröße) kurz aufgekocht. Die Agarosegellösung gießt man dann in eine Gelapparatur. Nach dem Erkalten wird die Apparatur mit TBE-Puffer als Laufmittel aufgefüllt. Um die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar zu machen, setzt man der Gellösung unmittelbar vor dem Gießen Ethidiumbromid (0,5 mg/ml Endkonzentration) zu. Die aufzutrennenden Proben werden in 1 x Auftragspuffer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Feldstärke von 5–8 V/cm.

TBE-Puffer: 0,1 M Tris
0,1 M Borsäure
0.45% (w/v) XC
2 mM EDTA, pH 8,0

[1] $OD = -\log_{10} (I/I_0)$
I = Intensität des durchgelassenen Lichtstrahls
I_0 = Intensität des eingestrahlten Lichtstrahls

3 x Auftragspuffer: 30% (v/v) Glycerin in H_2O
0.45% (w/v) BPB
0.45% (w/v) XC
30 mM EDTA, pH 8,0

3.6.3 Gelelution mittels des GFX DNA- und Gel Band Purification Kit

Die Gelelution dient zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen. Nach Abschluß des jeweiligen chromatographischen Laufs wird das Agarosegelstück, welches die jeweilige DNA enthält, ausgeschnitten. Das Stück prozessiert man nach Herstellerangaben (Fa. APB). Die gewonnene DNA wird in 30–50μl TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA, pH 8,0

3.6.4 Reinigung über Sephadex G50-Säule

Die DNA (beispielsweise gelöst in TE-Puffer) wird jeweils in einer Volumenmenge bis 0,1 ml auf eine 1 ml Sephadex G50-Säule aufgetragen. Diese muß vorher dreimal mit 1 ml H_20 (bidest.) sowie dreimal mit 1 ml TE äquilibriert werden. Die Säule wird mit 0,5 ml TE eluiert und der Durchlauf fraktioniert gesammelt. Die erste Fraktion von 0.35 ml wird stets verworfen. In der zweiten Fraktion von 0,4 ml eluiert die DNA. Auf diese Weise gelingt es Salze, Nukleotide und grobe Verunreinigungen weitgehend zu entfernen.

3.6.5 Chloropane-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Die Chloropane-Extraktion ist eine Methode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Lösungen von Nukleinsäuren.
Die jeweilige Nukleinsäure-Lösung wird dazu 1:1 mit einem Volumenanteil Chloropane auf dem Vortex vermischt und 5 min bei RT zentrifugiert (Eppendorf, 14.000 rpm, RT). Der wäßrige Überstand wird anschließend abgenommen und in ein neues

Gefäß geeigneter Größe überführt. Emulgiertes restliches Chloropane wird durch Ethanolfällung der DNA entfernt.
Die Ethanolfällung geschieht wie folgt: Es werden zu den gelösten Nukleinsäuren 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5 Volumenanteile eiskaltes Ethanol (100%) gegeben. In diesem Gemisch kommt es in Gegenwart der hohen Konzentrationen an Ethanol und Na^+-Ionen zur Aggregation der Nukleinsäure-Moleküle und zur anschließenden Präzipitation. Niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze bleiben dabei in Lösung. Durch Inkubation des gemischten Ansatzes für 30 min bei -20 °C kommt es zur vollständigen Fällung der Nukleinsäuren. Anschließend wird die Lösung zentrifugiert (Eppendorf, 14.000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Präzipitat wird in Gegenwart von geringen Mengen 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das gewonnene Pellet trocknet man an der Luft und löst es in einem geeigneten Volumen TE.

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

3.6.6 Transformation kompetenter *E. coli* (nach M. Scott, unveröffentlicht)

Zu 100 ml einer kompetenten *E. coli*-Suspension werden auf Eis 0.1–1 mg DNA in TE-Puffer zugegeben. Der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert, 30 s auf 42 °C erwärmt und erneut 5 min auf Eis gestellt. Anschließend gibt man 900 ml LB-Medium zu. Dann wird 45–60 min bei 37 °C geschüttelt. Je nach eingesetzter DNA-Menge werden 40 ml bis 1000 ml Aliquots auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

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

3 ml einer ÜN-Suspensionskultur werden abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14000 rpm, 30 s, RT). Der Überstand wird möglichst quantitativ abgenommen und verworfen. Das Sediment resuspendiert man in 300 ml STET-Puffer auf dem Vortex. Darauf folgt die Zugabe von 12 μl einer Lysozym- und 0.5 μl einer RNase A-Lösung. Anschließend erfolgt fünfminütige Inkubation bei RT. Zum Zellaufschluß werden die

Proben in einem Heizblock 45 s auf 95 °C erhitzt und anschließend 10 min bei RT zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14000 rpm). Die Bakterienreste mit der chromosomalen DNA sind nach der Zentrifugation zu einem gallertartigen Sediment verdichtet. Der plasmidhaltige Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dann werden 12 ml CTAB-Lösung zugegeben. Das entstehende Präzipitat wird nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT abzentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 rpm, 10 min, 4 °C). Nachdem der Überstand entfernt ist, wird das Präzipitat wieder in 300 ml 1.2 M NaCl gelöst. Die Nukleinsäuren werden anschließend durch Zugabe von 300 ml Isopropanol gefällt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wird abzentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 rpm, 10 min, 4 °C). Anschließend wäscht man das Präzipitat mit 900 ml 70% (v/v) Ethanol und zentrifugiert erneut. Das gewonnene Präzipitat trocknet man 5 min im Vakuumkonzentrator. Zur Weiterverarbeitung wird es in 50 ml TE-Puffer aufgenommen. 5 bis 7 ml dieser Lösung reichen in der Regel für eine analytische Restriktionshydrolyse aus.

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

Lysozym-Lösung: 50 mg/ml Lysozym
in 50 mM Tris-HCl, pH 7,3

CTAB-Lösung: 5% (w/v) Hexadecyltriammoniumbromid in H2O (bidest.);
zum Lösen auf 40° C im Wasserbad erwärmen

RNase A-Lösung: 10 mg/ml
in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
15 min kochen

3.6.8 Plasmid-DNA-Präparation mit Anionenaustauschersäulen

500 ml einer ÜN-Bakterienkultur werden abzentrifugiert (Sorvall, GSA, 7000 rpm, 7 min, 4 °C). Das isolierte Bakterienpellet wird in 12 ml Puffer P1 suspendiert, dann mit 12 ml Puffer P2 versetzt, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Es sollten 5 min nicht überschritten werden, da sonst die DNA irreversibel denaturiert wird. Dann gibt man 12 ml Puffer P3 zu, mischt vorsichtig und inkubiert 5 min auf Eis. Es fällt ein flockiger Niederschlag aus. Dieser besteht aus Proteinen, Zellwandresten sowie genomischer DNA. Der Niederschlag wird durch Zentrifugieren (Sorvall, SS34, 20000 rpm, 30 min, 4 °C) abgetrennt. Diesen Vorgang wiederholt man zweimal. Nach Äquilibrieren der Nucleobond AX-500-Säule mit 6 ml Puffer P4 wird der gewonnene Überstand geladen. Nach dem Lauf wird die an das Säulenmaterial adsorbierte DNA zweimal mit 16 ml Puffer P5 gewaschen und dann mit 15 ml Puffer P6 eluiert. Die im Eluat befindliche DNA wird anschließend mit 11 ml Isopropanol gefällt und zentrifugiert (Sorvall, SS34, 10000 rpm, 20 min, 4 °C). Das Pellet wäscht man mit wenig 70%igem EtOH, trocknet 5 min an der Luft und nimmt in einem geeigneten Volumen TE-Puffer auf.

Puffer P1: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA, pH 8,0
100 μg RNAse A/ml

Puffer P2: 200 mM NaOH
1% SDS

Puffer P3: 2,80 mM KAc, pH 5,1

Puffer P4: 100 mM Tris-H_3PO_4
15% Ethanol
900 mM KCl, pH 6,3
0,15% Triton X-100

Puffer P5: 100 mM Tris-H_3PO_4
15% Ethanol
1150 mM KCl, pH 6,3

Puffer P6: 100 mM Tris-H_3PO_4
15% Ethanol
1000 mM KCl, pH 8,5

3.6.9 DNA-Restriktion

Der Verdau von DNA-Fragmenten oder Plasmidpräparationen erfolgt in 10 μl gepufferter Lösung. Der für die jeweilige Restriktionsendonuklease geeignete Puffer und die erforderliche Reaktionstemperatur sind dabei den Herstellerangaben zu entnehmen. Dazu werden 0,5–10 μg DNA und 2–10 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Inkubation erfolgt in der Regel 1–3 h. Der Erfolg der Restriktion wird nach einer Agarose-Gelelektrophorese durch Färben mit Ethidiumbromid kontrolliert.

3.6.10 Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA aus Plasmid-DNA erfolgt durch Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1988). Dabei kommt Taq- oder Vent-DNA-Polymerase zum Einsatz. Die Vent-DNA-Polymerase besitzt eine 3'–5'-"Proofreading-Exonuklease-Aktivität", die im Vergleich zur Taq-DNA-Polymerase eine zehnfach niedrigere Fehlerquote bei der DNA-Synthese aufweist. Im Gegensatz zur Taq-DNA-Polymerase besitzen die Reaktionsprodukte glatte Enden.
Der jeweilige Reaktionsansatz enthält 20 pmol Primer, 100 ng Plasmid-DNA, 250 μM dNTPs, 10 μl des vom Hersteller mitgelieferten 10 x PCR-Puffers und 0,5 μl Enzym-Mix in einem Gesamtvolumen von 100 μl. Der Ansatz wird auf Eis gemischt. Die Reaktion erfolgt anschließend durch Zugabe des Enzyms bei 94 °C in der PCR-Maschine ("hot start"). Dadurch werden unspezifische Paarungen der Primer in der ersten Amplifikations-Runde vermieden. Die Hybridisierungstemperatur wird mit Hilfe des

Computer-Programms OLIGO 4.0-s (Molecular Biology Insights Inc., http://oligo.net/) bestimmt; Für jedes Guanosin oder Cytosin im hybridisierenden Bereich der PCR-Primer ergibt sich eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur (von 0°C ausgehend) um ca. 4°C und für jedes Adenosin oder Thymin eine Erhöhung um ca. 2°C. Die Reaktionsdauer resultiert aus der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Die Polymerisationsgeschwindigkeit der Taq-Polymerase, durchgeführt bei 72 °C, liegt bei ca. 1000 Nukleotide/min und die der Vent-Polymerase bei ca. 500 Nukleotide/min. Im Folgenden ist ein Beispiel für die Amplifikation eines PCR-Fragments bei Verwendung der Vent-Polymerase angegeben:

Zyklennummer	1	2-5	6-25	26
Denaturierung	95 °C 300 s	95 °C 30 s	95 °C 30 s	95 °C 30 s
Hybridisierung		60 °C 30 s	68°C 30 s	68 °C 30 s
Elongation		72°C 240 s	72°C 240 s	72°C 240 s

Anfänglich wird eine Hybridisierungstemperatur von 60 °C eingestellt. Im Fall zusätzlicher DNA-Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende des Primers wird die Hybridisierungstemperatur auf 68 °C erhöht. In der letzten Runde werden durch eine verlängerte Elongationszeit nicht fertig synthetisierte Produkte aufgefüllt.

10 x Vent-PCR Puffer: 100 mM KCl
200 mM Tris-HCl, pH 8,8 RT
100 mM $(NH_4)_2SO_4$
20 mM $MgSO_4$
1% (v/v) Triton X-100

10 x Taq-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,8 RT
500 mM KCl
0,8% Igepal CA630

3.6.11 Annealing von Oligodesoxyribonukleotiden

Jeweils 100 pmol zueinander komplementäre Oligodesoxyribonukleotide werden in 40 mM Tris-HCl und 0.2 M NaCl bei pH 7,5 in einem Volumen von 100 μl bei 95 °C für

5 min inkubiert. Anschließend erfolgt weitere Inkubation für 10 min bei der Schmelztemperatur des Doppelstranges. Anschließend läßt man die Lösung langsam auf RT abkühlen.

3.6.12 Dephosphorylierung von DNA

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm entfernt in einem linearen doppelsträngigen DNA-Molekül die endständigen 5'-Phosphatgruppen. Die Entfernung der Phosphatreste wird notwendig, wenn bei Klonierungen die interne Religation eines Vektors durch die anschließende DNA-Ligase-Reaktion verhindert werden soll.
Zur gezielten Durchführung der Dephosphorylierung werden in einem Reaktionsansatz 0,2 U Enzym pro pmol DNA mit kohäsiven 5'-überhängenden Enden eingesetzt. Die Reaktion wird für 1 h bei 37°C im 1 x Phosphatasepuffer durchgeführt. Zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wird dann EDTA (pH 8,0) zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben und 10 min auf 75°C erhitzt. Anschließend extrahiert man die DNA mit Chloropane und fällt mit Ethanol (siehe Abschnitt 3.6.5).

10 x Phosphatasepuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37 °C
100 mM $MgCl_2$

3.6.13 Phosphorylierung von Oligodesoxyribonukleotiden und radioaktive Markierung am 5´-Ende

Oligodesoxyribonukleotide tragen synthesebedingt keinen Phosphatrest an ihrem 5'-Ende. Die einzel- oder doppelsträngige DNA wird deshalb mit T4-Polynukleotidkinase für die Ligation in dephosphorylierte Vektoren vorbereitet oder am 5'-Ende der DNA markiert. Für die Endmarkierung werden 5–10 pmol dephosphorylierte DNA mit 10 U T4-Polynukleotidkinase (10 U/μl) in Gegenwart von 6 μCi (20 pmol) γ-^{32}P-ATP (3000 Ci/mmol) in dem vom jeweiligen Hersteller mitgelieferten Kinase-Puffer 1 h bei 37 °C in einem Volumen von 20 μl inkubiert. Da das Enzym bei 37 °C eine geringe Halbwertszeit besitzt, wird es sukzessive in zwei Aliquots von 0.5 μl zugegeben. Anschließend wird die DNA vom restlichen ATP über Sephadex G50 abgetrennt (siehe

Abschnitt 3.6.4). Phosphoryliert man die DNA mit unmarkiertem ATP, liegt die ATP-Konzentration bei 10 μM. Dabei werden 0.5 U T4-Polynukleotidkinase pro pmol DNA-Fragment eingesetzt. Die Hitze-Inaktivierung des Enzyms erfolgt bei 70 °C für 10 min.

10x Polynukleotidkinase-Puffer: 500 mM Tris-HCl, pH 7,6, RT
100 mM $MgCl_2$
50 mM DTT
1 mM Spermidin
1 mM EDTA, pH 8,0

3.6.14 Ligation

Für die Ligation setzt man eine Gesamtmenge DNA von 50–400 ng in 20 μl Reaktionsvolumen ein. Dabei soll das molare Verhältnis von Fragment zu Vektor zwischen 3:1 bis 5:1 liegen. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wird die Vektor-DNA im allgemeinen vor der Ligasereaktion dephosphoryliert (s. Abschnitt 3.6.12). Die Reaktion selbst erfolgt dann durch Zugabe von 2 U T4-DNA-Ligase in 1 x Ligasepuffer für 3–16 h bei 16 °C und in einem Volumen von 20–50 μl.

10 x Ligasepuffer: 400 mM Tris-HCl, pH 7,8 bei 25 °C
100 mM $MgCl_2$
100 mM DTT
5 mM ATP

3.7 Protein-Arbeitstechniken

3.7.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wird durch Absorptionsmessung nach der allgemein bekannten Methode von Bradford bestimmt. Dabei bilden die Proteine mit der Färbelösung (Fa. Biorad) einen Proteinkomplex, der bei 595 nm absorbiert. Die tatsächliche Proteinkonzentration läßt sich dann anhand einer Eichkurve errechnen. Diese erstellt

man durch Absorptionsmessung von definierten Protein-Konzentrationen als Standard in Färbelösung erstellt.

3.7.2 SDS-Gelelektrophorese

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

Minigelapparatur: Zum Gießen der Gele und für den Gellauf werden Mini-Gelapparaturen, Abstandshalter und Kämme der Firma Hoefer verwendet. Zwei gereinigte Glasplatten (6 cm x 10 cm) werden mittels zweier Abstandshalter (0,75 mm) in der Gießapparatur vertikal fixiert. Um die Apparatur abzudichten, muß ein ca. 0,5 cm hoher Sockel, bestehend aus Trenngel, zwischen beide Glasplatten gegossen werden. Man läßt 5 min auspolymerisieren und füllt dann das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 4,5 cm zwischen den beiden Glasplatten auf. Um eine glatte Gelfront zu erhalten, wird mit destilliertem Wasser die Gelfront etwas überschichtet. Die Polymerisation des Trenngels ist nach ca. 20 min beendet. Nach Abgießen des Wassers wird das Sammelgel 2 cm hoch über das Trenngel gegossen und dann sofort der Kamm eingesetzt. Nach ungefähr 10 min ist die Polymerisation des Sammelgels beendet. Der Kamm wird vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Gelelektrophoreseapparatur mit TGS als Laufpuffer eingesetzt. Die Proteinlösungen werden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem Volumenanteil 2 x SDS-Auftragspuffer gemischt, 1 min bei 95 °C erhitzt und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf-Zentrifuge, 1 min 14.000 rpm, RT). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 30 mA unter Wasserkühlung solange, bis das Bromphenolblau des Auftragspuffers den unteren Glasplattenrand erreicht hat. Anschließend wird das Gel mit Coomassie- bzw. Silberfärbung gefärbt oder die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Western-Blot).

Trenngellösung [15% (85:1)]: 1,46 ml H_2O
5,0 ml 30% (w/v) Acrylamid
0,9 ml 2% (w/v) Bisacrylamid
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
0,1 ml 10% (w/v) SDS
66 μl 30% (w/v) APS
16 μl TEMED

Sammelgellösung 6,2 ml H_2O
1,70 ml 30% (w/v) Acrylamid
0,7 ml 2% (w/v) Bisacrylamid
1,3 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8
0,1 ml 10% (w/v) SDS
50 μl 10% (w/v) APS
25 μl TEMED

TGS-Puffer: 25 mM Tris
0,192 M Glycin
0,11% (w/v) SDS

8 x SDS-Auftragspuffer: 400 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,8% (w/v) SDS
40% (v/v) Glycerin
0,5% (w/v) BPB
20 mM β-Mercaptoethanol oder 10 mM DTT

Große Gelapparatur: Zum Gießen der großen präparativen Gele und für den Gellauf werden Gelapparaturen von Pharmacia Biotech und Abstandshalter und Kämme der Firma Hoefer verwendet. Zwei gereinigte Glasplatten (16 x 18 cm) werden mittels zweier Abstandshalter (1 mm) in einer Gießapparatur vertikal fixiert. Anschließend gießt man das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 15 cm zwischen die beiden Glasplatten. Zum Einsatz kamen 10%-, 12%- und 15-ige% Trenngele mit einer Vernetzung von 170:1. Wie bei der Minigelapparatur überschichtet man rasch mit destilliertem Wasser und läßt ca. 20 min auspolymerisieren. Anschließend gießt man das Wasser ab,

setzt den Kamm ein und füllt das Sammelgel (Sammelgellösung s.o.) bis zum Erreichen des Glasrandes auf. Nach 10 min ist die Polymerisiation beendet und das Gel wird in die Gelelektrophoreseapparatur mit TGS als Laufpuffer eingesetzt. Die Proteinlösungen werden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem Volumenanteil 8 x SDS-Auftragspuffer gemischt, 1 min bei 95 °C erhitzt und anschließend unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf-Zentrifuge, 1 min, 14.000 rpm, RT). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 10–30 mA unter Wasserkühlung solange, bis das Bromphenolblau des Auftragspuffers den unteren Glasplattenrand erreicht hat. Dann wird das Gel auf eine Membran geblotet oder durch Silberfärbung entwickelt.

Vernetzung (170:1)	**Trenngel 10%**	**Trenngel 12%**	**Trenngel 15%**
H_2O	11.3 ml	9,2	5,97
30% (w/v) Acrylamid	9.9 ml	11,9 ml	14,91
2% (w/v) Bisacrylamid	0.9 ml	1,1 ml	1,32
Tris-HCl (pH 8,8)	7.5 ml	7,5 ml	7,5
10% (w/v) SDS	0.3 ml	0,3	0,3
30% (w/v) APS	100 μl	100 μl	100 μl
TEMED	20 μl	20 μl	20 μl

3.7.3 Coomassie-Färbung von Proteinen

Um Proteine nach erfolgter PAGE sichtbar zu machen, können sie im Gel mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt werden. Das Gel wird zunächst 20 min in Färbelösung und anschließend in Entfärberlösung solange geschwenkt, bis die Proteine als blaue Banden vor dem klaren Hintergrund sichtbar sind. Zum Trocknen wird das Gel luftblasenfrei in einen Rahmen zwischen zwei in Wasser getränkte durchsichtige Cellophanfolien gespannt (“Gel Drying Kit“, Promega) und über Nacht vertikal aufgestellt. Die untere Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei ca. 0,2 μg Protein.

Färbelösung: 40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue in Entfärbelösung

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

3.7.4 Silberfärbung

Mit der Silberfärbung (“Silver Stain Kit: plusone“ der Firma Pharmacia Biotech) lassen sich Proteine noch im Nanogrammbereich nachweisen. Zuerst wird das SDS-Polyacrylamidgel für 30 min vorsichtig in 250 ml Fixier-Lösung überführt. Nach Inkubation für 30 min in 250 ml Sensibilisierungslösung wird dreimal für je 5 min mit 250 ml deionisiertem Wasser gewaschen. Es folgt die Färbung für 20 min in 250 ml Silberreaktionslösung. Dann wird zweimal 1 min in je 250 ml deionisiertem Wasser gewaschen. Danach erfolgt die Sichtbarmachung der Proteinbanden in 250 ml Entwicklerlösung. Bei Erreichen der optimalen Farbintensität wird die Reaktion mit 250 ml Stopplösung beendet. Das Gel wird zwischen zwei in Wasser getränkte Cellophanfolien luftblasenfrei in einen Rahmen eingespannt und über Nacht getrocknet (“Gel Drying Kit“, Promega).

Fixierlösung:
100 ml Ethanol
25 ml Eisessig
auffüllen auf 250 ml mit deionisiertem Wasser

Sensibilisierungslösung:
1,25 ml Glutardialdehyd 25% (w/v)
10 ml Natriumthiosulfat 5% (w/v)
75 ml Ethanol
17 g Natriumacetat
auffüllen auf 250 ml mit deionisiertem Wasser

Silberlösung:
25 ml Silbernitratlösung 2,5% (w/v)
0,10 ml Formaldehyd 37% (w/v)
auffüllen auf 250 ml mit deionisiertem Wasser

Entwicklerlösung:
6,2 g Natriumcarbonat
0,50 ml Formaldehyd 37% (w/v)
auffüllen auf 250 ml mit deionisiertem Wasser

Stopplösung:
3,7 g EDTA, pH 8,0
auffüllen auf 250 ml mit deionisiertem Wasser

3.7.5 Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

Für die Expression von Proteinen in *E. coli* wurden unterschiedliche Bakterienstämme verwendet. Im Fall der Expression von Proteinen, deren cDNA in pET-Plasmide kloniert waren, kam der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) zum Einsatz. Bei der Expression von Proteinen, deren cDNA in pGEX2TK-Plasmide kloniert waren, erfolgte Transformation in den Bakterienstamm *E. coli* DH5α. In beiden Fällen wurde die Expression der rekombinanten Proteine durch IPTG induziert.

Expression der Proteine: 10 ml LB-Medium mit einer Ampicillinkonzentration von 100 μg/ml werden mit einer Kolonie rekombinanter *E. coli* DH5α bzw. BL21(DE3) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die ÜN-Kultur wird anschließend in 500 bis 1000 ml LB-Medium mit einer Ampicillinkonzentration von 100 μg/ml überführt und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,6–0,8 angezogen. Die Expression des jeweiligen Proteins wird durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Bei der Expression schwerlöslicher Proteine hat es sich bewährt, die gesamte Expression bei RT durchzuführen. Nach der Induktion wird 3 h wachsen gelassen. Anschließend werden die Bakterien abzentrifugiert (Sorvall, GSA, 4500 rpm, 15 min, 4 °C). Die Zellen können vor ihrer Weiterverarbeitung zu diesem Zeitpunkt bei -20 °C eingefroren werden. Der Verlauf der Induktion wird durch stündliche Probenentnahme kontrolliert. Dazu entnimmt man jeweils eine äquivalente Bakterienzahl aus der Bakteriensuspension (die Bakterienzahl wird durch Messung des OD_{600}-Wertes bestimmt) und läßt diese in einer Tischzentrifuge sedimentieren (1 min, 14.000 rpm, RT). Anschließend nimmt man das Bakterienpellet in 40 μl 2 x Harnstoff-Auftragspuffer auf. Dann wird die Suspension 1 min auf 95 °C erhitzt und kräftig auf dem Vortex durchmischt. Der Verlauf der Protein-Expression wird anschließend durch die SDS-Gelelektrophorese einer Lysat-Probe durch Coomassie-Färbung kontrolliert.

2 x Harnstoff-Auftragspuffer:
150 mM Tris-HCl, pH 6,8
8 M Harnstoff
4% (w/v) SDS
0,5% (w/v) Bromphenolblau
20 mM β-Mercaptoethanol

Aufarbeitung der Proteine (nativ): Alle Arbeitsschritte werden bei 4 °C durchgeführt. Für die Reinigung des jeweils gewonnenen überexprimierten Proteins suspendiert man die Bakterien in 25 ml Lysispuffer, dem die Proteaseinhibitoren Benzamidin (in DMSO) und PMSF (in DMSO) ad 1 mM frisch zugesetzt werden. Der Zellaufschluß erfolgt mit Hilfe von Ultraschall (Branson Sonifier W 250, spitze Form r = 0,25 cm). Dazu wird die Bakteriensuspension in einem 50 ml Falcon Polypropylenröhrchen eisgekühlt dreimal 5 min bei einer Pulsdauer von 30% und einer Pulsstärke von 3 Einheiten auf der Geräteskala beschallt. Zwischen der Beschallung wird jeweils eine Pause von 5 min eingelegt. Das bei erfolgreichem Zellaufschluß leicht bewegliche Lysat wird anschließend 30 min in einem SS34-Rotor zentrifugiert (35 min, 18.000 rpm, 4 °C). Die Kontrolle des Aufschlusses erfolgt durch SDS-PAGE.

Lysispuffer: 10% (v/v) Glycerin
500 mM NaCl
20 mM Tris-HCl, pH 7,3 (RT)
0,1% (v/v) Igepal CA630
20 mM β-Mercaptoethanol

3.7.6 *In-vitro*-Translation

Zur Expression von Deletionskonstrukten *in-vitro* wurde ein Kaninchen-Retyculocyten-Lysat-System verwendet (Promega). Das Lysat enthielt alle für die Translation benötigten Komponenten, so daß ausgehend von einer DNA-Matrize mit T7-Promotor das jeweilige Protein exprimiert werden konnte. Der Reaktionsmix wurde jeweils den Herstellerangaben entsprechend vorbereitet und die gebildeten Proteine mit ^{35}S-Methionin radioaktiv markiert.

3.7.7 Nachweis der Proteine durch Western-Blot-Analyse

Der Immunoblot dient der Identifizierung eines spezifischen Antigens mittels eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers. Dabei bindet in einem weiteren Schritt ein zweiter Antikörper an eine konservierte Domäne des ersten Antikörpers. An den

zweiten Antikörper ist kovalent ein Enzym gekoppelt (bereits vom jeweiligen Hersteller durchgeführt), das durch den Umsatz seines Substrats die Detektion des gebildeten Sandwichkomplexes erlaubt. Als Nachweisreaktionen werden entweder die Bildung eines schwerlöslichen Farbstoffes oder aber die Bildung photolabiler Komplexe genutzt; Letztere lassen sich über Chemiluminiszenz detektieren.
Zuerst werden die Proteinfraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt. Als Marker wird ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard (BioRad) aufgetragen. Dessen Banden sind auch während der Elektrophorese gut erkennbar. Alternativ kann auch ein nicht gefärbter Molekulargewichtsstandard verwendet werden. Dieser muß allerdings nach dem Transfer auf die Membran (s.u.) mit Ponceau S angefärbt werden. Im letzten Fall läßt sich der Farbstoff mit Wasser jedoch reversibel entfernen.
Anschließend wird das Gel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen. Letztere besitzt eine vergleichsweise größere Bindungskapazität für Proteine. Wegen der hydrophoben Oberfläche der PVDF-Membran muß diese allerdings vor Verwendung für 30 sec in abs. Methanol und dann für 2 min in deionisiertem Wasser vorinkubiert werden. Alle weiteren Arbeitsgänge sind für beide Membranen identisch. Für den Transfer der Proteine auf die jeweilige Membran haben sich die Elektroblotapparatur und die Tankblotapparatur gleichermaßen bewährt.

Einsatz der Elektroblotapparatur (Fa. Biorad): Nach der Elektrophorese wird das jeweilige Gel in einer Schale mit Transferpuffer eingebracht. Anschließend bedeckt man das darin schwimmende Gel mit einer mittels Transferpuffer behandelter gleich großen Membran. Dann wird das Gel zusammen mit der Membran zwischen zwei Doppellagen angefeuchtetem 3MM Papier (Whatman) gelegt. Nun erfolgt der Protein-Transfer bei 15 V für 45 min auf die Membran. Der Erfolg des Transfers ist an der Übertragung des vorgefärbten Molekulargewichtsstandards erkennbar.

Einsatz der Tankblotapparatur (Fa. Biorad): Entsprechend der vorhergehenden Beschreibung wird das Gel nach der Elektrophorese zwischen einer Membran und zwei Doppellagen 3MM Papier eingepackt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgt ÜN in einem mit Transferpuffer gefüllten Tank geeigneter Größe (Biorad) zwischen zwei Elektroden bei 25 V.
Daran anschließend wird die Membran mit den gebundenen Proteinen zunächst für

30 min in TBS-T mit 6% (w/v) Magermilchpulver (Frema) bei RT geschüttelt. Dies dient dazu unspezifische Bindungsstellen auf der Matrix abzusättigen. Dann erfolgt Inkubation mit dem ersten Antikörper für 90 min. Bewährt haben sich Verdünnungen von 1:10 bis 1:3000 in TBS-T (die jeweilige Verdünnung der Antikörper ist in Abschnitt 2.1.7 angegeben). Anschließend wird die Membran dreimal je 15 min mit TBS-T gewaschen. Bewährt hat sich den zweiten Antikörper 1:2000 bis 1:3000 zu verdünnen. Für an Peroxidase gekoppelte Antikörper aus Ziege hatten sich demgegenüber Verdünnungen von 1:3000 bis 1:8000 in TBS-T mit 1% Milchpulver als praktikabel erwiesen. Nach erneuter Inkubation für 30 min wird die Membran dann dreimal für 30 min mit TBS-T und anschließend eine weitere Stunde mit TBS gewaschen.
Der Nachweis von peroxidasegekoppelten Antikörpern erfolgt mittels einer photochemischen Reaktion. Dabei wird die Membran zuerst 1 min in Wasser und dann 1 min unter Lichtausschluß mit den 1:1 gemischten Reagenzlösungen (ECL Western blotting detection reagents 1 und 2, Amersham Buchler) inkubiert. Der Nachweis erfolgt durch Exposition (10 s bis 5 min) der in Frischhaltefolie eingewickelten Membran auf einen Film in einer Autoradiographiekassette.
Hingegen werden phosphatasegekoppelte Antikörper mittels Bildung eines unlöslichen Farbstoffs nachgewiesen. Hierzu wäscht man die Membran zuerst mit AP-Puffer und bringt die Membran dann in 15 ml AP-Puffer ein. Der Start der Farbreaktion erfolgt durch Zugabe von 100 ml einer 10%igen Lösung von NBT in 70%igem Formamid und 50 ml einer Lösung von 50 mg/ml BCIP in 100%igen DMF. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wird die Nitrocellulosemembran mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen; Damit stoppt man die Reaktion.

Transferpuffer: 192 mM Glycin
25 mM Tris
20% (v/v) Methanol
0,1% SDS

TBS: 20 mM Tris
137 mM NaCl
27 mM KCl
pH mit HCl auf 7,6 einstellen.

TBS-T: 0,1% (v/v) Tween-20 in TBS

AP-Puffer: 100 mM NaCl
5 mM $MgCl_2$
100 mM Tris-HCl, pH 8,8

Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S
3% (w/v) Trichloressigsäure
3% (w/v) Sulfosalicylsäure

3.7.8 Ni^{2+}-NTA-Affinitätschromatographie

Als Säulenmaterial kam mit Ni^{2+}-Ionen beladene immobilisierte Nitrilotriessigsäure (NTA) zum Einsatz. NTA besetzt vier der sechs Ligandenbindungsstellen in der Koordinationsphäre des Ni^{2+}- Ions. An die verbleibenden zwei Koordinationsstellen können mit hoher Affinität rekombinante Proteine binden. Diese lassen sich als Fusionsproteine mit einem Hexahistidinrest exprimieren (Hochuli et al., 1987).

Durchführung der Ni^{2+}-NTA-Affinitätschromatographie: Alle Arbeiten werden bei 4 °C im Kühlraum oder auf Eis durchgeführt. Die jeweiligen Ni^{2+}-NTA-Agarosesäulen werden mit Nickel-Puffer, der 5 mM Imidazol enthält, voräquilibriert. Beladung der Säule erfolgt mit 2 CV/h. Daran anschließend wird die Säule mit Nickel-Puffer (15–40 mM Imidazol) so lange gewaschen, bis sich im Durchlauf mit Biorad-Proteinfärbelösung keine Farbreaktion mehr nachweisen läßt (ca. 20 CV). Dann eluiert man mittels Nickel-Puffer, der 400 mM Imidazol enthält. Die Eluate werden fraktioniert gesammelt. Die jeweiligen Fraktionen werden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden. Die Analyse der Proteinfraktionen erfolgt über SDS-PAGE.

Nickel-Puffer:	20 mM Tris-HCl (pH 7,3, bei RT) 500 mM KCl Imidazol s.o. 20% (v/v) Glycerin 0,1% (v/v) Igepal CA630
In den Puffer frisch zugeben:	5 mM β-Mercaptoethanol 0,2 mM PMSF 0,1 mM Benzamidin Aprotinin ad 1μg/ml

3.7.9 Heparin-Sepharose-Chromatographie

Mittels der Heparin-Sepharose lassen sich viele rekombinante Proteine gut von *E. coli*-Proteinen abtrennen. Deshalb schließt sich der Nickelsäule oft eine Heparinsäule an. Damit gelingt die Isolierung der rekombinanten Proteine in hoher Reinheit. Mit einer Proteinbindungskapazität von 10 mg/ml eignet sich dieser Kationenaustauscher mit den Eigenschaften eines DNA-Analogons auch gut zum Konzentrieren von Proteinlösungen.

Durchführung der Heparin-Sepharose-Chromatographie: Die Heparin-Säule wird zunächst in Wasser zum Quellen gebracht und anschließend in Heparin-Puffer (Menge an KCl: 200 mM KCl) äquilibriert. Dann wird die Säule mit der Proteinlösung bei einer Flußgeschwindigkeit von 2 CV/h beladen und dann mit 20 CV Heparin-Puffer (Menge an KCl: 200 mM KCl) solange gewaschen, bis sich im Durchlauf mit Biorad-Proteinfärbelösung keine Farbreaktion mehr nachweisen läßt. Anschließend eluiert man die Proteine mit Heparin-Puffer (Menge an KCl: 500 mM KCl) und sammelt in Fraktionen. Die jeweiligen Proteinfraktionen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Ihre Analyse erfolgt über SDS-PAGE.

Heparin-Puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,3, bei RT)
KCl 200 mM bzw. 500 mM
20% (v/v) Glycerin
0,1% (v/v) Igepal CA630
1 mM EDTA
5 mM DTT
0,2 mM PMSF
0,1 mM Benzamidin
Aprotinin ad 1μg/ml

3.7.10 Gelfiltration

Die Gelfiltration dient dem Auftrennen von Proteingemischen entsprechend dem Molekulargewicht. In den Versuchen hat sich die Verwendung der Superose 6 (SMART-System) bewährt. Diese trennt Proteine optimal im Molekulargewichtsbereich zwischen 5 x 10^3 und 1 x 10^6 Da bei einer Ausschlußgrenze von 4 x 10^7 Da.

Durchführung der Gelfiltration: Es werden 0,5–500 μg Protein in BC100 in einem Volumen von 200 μl bei einer Flußrate von 20–40 μl/min auf die Säule geladen. Als Laufmittel verwendet man Superose-Puffer. Während des Laufs sollte ein Druck von 1–2 MPa nicht überschritten werden. Die Fraktionsvolumina betragen 50 μl. Der Molekulargewichtsvergleich erfolgt durch entsprechende Gelfiltration von Größenstandards mit bekanntem Molekulargewicht.

Superose-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,3(RT)
300 mM KCl
20% (v/v) Glycerin
0,2 mM EDTA, pH 8,0

3.7.11 Q-Sepharose-Anionenaustauscher-Chromatographie

Die Q-Sepharose auf Basis quartärer Amine [funktionelle Gruppe: -CH_2-N^+-$(CH_3)_3$] ist ein starker Anionenaustauscher. Die eingesetzte HiLoad 16/10 Q-Sepharose-Säule ist

vom Hersteller (Pharmacia-Biotech) bereits fertig gepackt und kommt in einem FPLC-System (APC) zum Einsatz. Ausmaß und Stärke der Bindung eines Proteins hängt von der Ionenstärke des Puffers, dem isoelektrischen Punkt des Proteins und der Dichte der Ladungen der Säulenmatrix ab.

Durchführung der Anionenaustauscher-Chromatographie: Die Säule wird in 10 CV BC100 äquilibriert. Anschließend erfolgt Beladung in 4 h mit der Proteinlösung in BC100. Die gebundenen Proteine werden dann automatisch mit einem Gradienten von 100–500 mM KCl von der Säule eluiert und in 10 ml-Fraktionen gesammelt. Die Analyse der Proteinfraktionen erfolgt über SDS-PAGE.

3.7.12 Affinitätschromatographie an immobilisierten GST-Fusionsproteinen

Vorbereitung der Säulen: Nach der nativen Aufarbeitung der rekombinanten und mit GST-Expressionsplasmid induzierten Bakterien wird das Bakterienlysat mit in Lysispuffer (s.o.) äquilibrierter Glutathion-Sepharose 4B vermischt. Dabei erfolgt die Wahl des Verhältnisses von Bakterienlysat zu Glutathion-Sepharose 4B so, daß sich eine Beladungsdichte von 1–2 mg Protein pro 1 ml Glutathion-Sepharose auf der Säule einstellt. Der Ansatz wird für 4 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert und anschließend abzentrifugiert (Heraeus, 2.500 rpm, 5 min, 4 °C). Um unspezifisch bindende Proteine zu eluieren, wird die Glutathion-Sepharose 4B je viermal mit einem Überschuß BC2000 für 30 min auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert und dann abzentrifugiert (Heraeus, 2.500 rpm, 5 min, 4 °C). Schließlich wird die Glutathion-Sepharose 4B in sechs Säulenvolumen BC2000 aufgenommen und kann so einige Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.
Um das GST Fusionsprotein wieder von der Matrix zu eluieren, wird wie folgt verfahren: Die Glutathion-Sepharose 4B wird abzentrifugiert (Heraeus, 2.500 rpm, 5 min, 4 °C) und das überstehende BC2000 verworfen. Anschließend äquilibriert man in BC100 und eluiert je zweimal für eine halbe Stunde mit einer dem Säulenvolumen ensprechenden Menge an BC100/20 mM Glutathion.

Durchführung der Affinitätsreinigung: 1 ml HeLa-Kernextrakt (enthält 8–12 μg/μl Protein) wird zunächst mit 20 mM HEPES (pH 7,6), 0,1% Igepal CA630, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 0,1 mM Benzamidin und 1 μg/ml Aprotinin versetzt. Die jeweiligen Säulen werden in 0,1 M KCl HEGN-Puffer voräquilibriert. Um Proteine, die an das GST-Protein binden auszuschließen, wird der Kernextrakt für 1 h mit 20 μl GST-Säule inkubiert. Der Kernextrakt wird anschließend abzentrifugiert (Heraeus, 2500 rpm, 4 °C) und dann auf 50 μl Säule überführt (Auf der Säule befindet sich die jeweilige GST-VP16-Aktivatordomäne, immobilisiert an GSH-Sepharose). Die Säule wird für 2–3 Stunden inkubiert. Anschließend zentrifugiert man ab (Heraeus, 2500 rpm, 4 °C) und entfernt den Überstand. Dann wird vier- bis sechsmal mit mindestens zehnfachem Überschuß 0,1 M KCl HEGN-Puffer gewaschen und der Überstand erneut abzentrifugiert (Heraeus, 2500 rpm, 4 °C). Die gebundenen Proteine werden dann für je 10 min zweimal mit der dem Säulenvolumen entsprechenden Menge an 0,5 M KCL HEGN-Puffer bzw. 0,2% Sarcosysl in 0,1 M KCL HEGN-Puffer eluiert. Die Analyse der Eluate erfolgt über SDS-PAGE.

BC2000: 20 mM Tris-HCl, pH 7,3(RT)
100 mM KCl
20% (v/v) Glycerin
0,2 mM EDTA, pH 8,0

HEGN-Puffer: 20 mM HEPES, pH 7,6
KCl 0,1 M KCl bzw. 0,5 M KCl
10% Glycerin.
0,1% (v/v) Igepal CA630
0,1 mM EDTA

In den Puffer frisch zugeben: 1 mM DTT
0,2 mM PMSF
0,1 mM Benzamidin
Aprotinin ad 1μg/ml

3.7.13 Immunoaffinitätsreinigung

Bei der Immunoaffinitätschromatographie wird ein Antikörper an eine Matrix immobilisiert und dessen Antigenbindungsstelle als funktionelle Affinitätsgruppe eingesetzt. Daran binden die zu untersuchenden Proteine, insofern diese das zugehörige Epitop zu der Antigenbindungsstelle des Antikörpers besitzen. Als Matrix dient je nach Bedarf Protein G Sepharose oder Protein A Sepharose. Auf deren Träger-Oberfläche sind bakterielle Proteine gebunden, die spezifisch die konstante Region von Immunglobulinen binden (Protein G und Protein A stammt ursprünglich aus *Streptococcus aureus*). Diese bakteriellen Proteine sind in der Lage alle gängigen IgG-Immunglobuline an die Säule zu binden. Allerdings unterscheiden sich Protein G und Protein A in ihrer Präferenz für Immunglobuline verschiedener Spezies (s. dazu Tabelle 6). Diese Vorgehensweise der Immobilisierung der Antikörper ist wegen ihrer gerichteten Bindung vorteilhaft. Darüberhinaus weist die Antigenbindungsstelle auch noch eine freie Zugänglichkeit für die Epitopbindung auf.
Die Protein A bzw. G Sepharose wird in PBS Puffer äquilibriert und anschließend mit dem jeweiligen Antikörper für 1,5 h bei RT inkubiert. Die Beladungsdichte auf der Säule soll 2 μg/μl betragen. Bei Hybridoma-Überständen (Immunglobulinkonzentration ca. 50 μg/ml) setzt man ein Verhältnis von vier CV Antikörperüberstand gegenüber der Sepharose ein. Dabei ist davon auszugehen, daß der Antikörper quantitativ an die Matrix bindet. Nach der Inkubation wird der Überstand abzentrifugiert (Heräus, 1000 rpm, 3 min) und die Antikörpersäule mit PBS mehrmals gewaschen.
Soll der Antikörper bei der späteren Elution nicht zusammen mit den gefällten Proteinen eluiert werden, muß er kovalent an die Matrix gebunden werden. Dazu wird der an Protein A bzw. G Sepharose gebundene Antikörper zweimal mit 10 CV 0,2 M Natriumborat als Puffer (pH 9,0) gewaschen und in 10 CV 0,2 M Natriumborat (pH 9,0) mit 20 mM Dimethyl-pimelidat für 30 min auf dem Drehrad bei RT inkubiert. Die Kopplungsreaktion der Antikörper an die Säule wird durch Waschen mit 10 CV 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) und anschließende zweistündige Inkubation in 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) gestoppt. Dann wäscht man die Säule mehrmals mit PBS. Zur Kontrolle der kovalenten Kopplung entnimmt man vor und nach der Quervernetzung 10 μl Säule und analysiert diese nach Elution mit SDS-Puffer mittels SDS-PAGE. Die hergestellten Antikörpersäulen können bei 4 $^\circ$C mehrere Monate gelagert werden. Um das Wachsen

Antikörperquelle	Interaktion mit Protein A	Interaktion mit Protein G
Monoklonale Antikörper:		
Maus IgG1		+
Maus IgG2a, IgG2b, IgG3	+	
Ratte		+
Polyklonale Antikörper:		
Kaninchen	+	
Ziege	+	

Tabelle 6: Bindung Immunglobuline an Protein A oder Protein G

von Mikroorganismen zu verhindern, wird 0,01% (w/v) NaN_3 zugesetzt.

Durchführung der Immunoaffinitätsreinigung: Alle Arbeiten werden bei 4 °C mit silikonisierten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Säulen äquilibriert man durch dreimaliges Waschen in 10 CV IP-Puffer. Das Verhältnis der eingesetzten Proteinmenge aus Kernextrakt sollte 40 μg Protein pro 1 μg Antikörper betragen. Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen während der Immunoaffinitätsreinigung empfiehlt es sich, Kernextrakte mit Protein A bzw. Protein G Sepharose oder alternativ auch mit einem immobilisierten Kontrollantikörper für 1 h vorzuinkubieren. Bei polyklonalen Antikörpern setzt man als Kontrollantikörper einen Antikörper aus der gleichen Spezies ein. Bei monoklonalen Antikörpern verwendet man als Kontrollantikörper einen Antikörper der gleichen Spezies und des gleichen IgG-Isotyps.
Anschließend wird der vorinkubierte Kernextrakt abzentrifugiert (Heraeus, 2500 rpm, 4 °C) und mit der jeweiligen Antikörper-Säule für 3 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Säule wird anschließend einmal mit 10 CV IP-Puffer (Menge KCl: 100 mM), dreimal mit 10 CV IP-Puffer (Menge KCl: 1000 mM) und dann noch einmal mit 10 CV IP-Puffer (Menge KCl: 100 mM) gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten zentrifugiert man ab (Eppendorf, 2000 rpm, 2 min). Anschließend wird für 5–10 min auf Eis inkubiert.
Das so gereinigte Säulenmaterial kann direkt in jedem *in-vitro*-Testsystem eingesetzt werden (z.B. *in-vitro*-Transkription oder enzymatischer Assay). Bei Bedarf kann Elution mittels eines geeigneten Peptids erfolgen, welches das zu dem Antikörper passende Epitop besitzt. Hierzu wird die Antikörpersäule ÜN mit 2 CV IP-Puffer und 200 ng/μl

Peptid bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Zur Analyse der gebundenen Proteine eluiert man mit 2 CV 2 x SDS-Auftragspuffer bei 95 °C für 1 min und trennt die Proteine mittels SDS-PAGE auf.

IP-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,3
20% (v/v) Glycerin
150 mM KCl bzw. 1000 mM KCl
0,1% (v/v) Igepal CA630
0,2 mM EDTA
0,25 mM DTT

In den IP-Puffer frisch zugeben: 1 mM DTT
0,2 mM PMSF
0,1 mM Benzamidin
Aprotinin ad 1μg/ml

3.8 *In-vitro*-Transkription

Die *In-vitro*-Transkription eignet sich zur funktionellen Untersuchung von Transkriptionsfaktoren, welche die Aktivität der RNA-Polymerase II regulieren. Als Transkriptionssysteme haben sich zum einen “grobe“ Systeme, die Zellkernextrakte enthalten und zum anderen “rekonstituierte“ Systeme, die aus rekombinanten oder gereinigten Faktoren bestehen, bewährt.
Die Zellkernextrakte enthalten alle mit Salz extrahierbaren Kernproteine. Wegen der daraus resultierenden komplexen Zusammensetzung des “groben“ Transkriptionssystems ist es deshalb problematisch einzelne Faktoren zu analysieren. Großer Vorteil ist allerdings, daß “grobe“ Systeme den physiologischen Bedingungen näher kommen als “rekonstituierte“ Systeme. Ein weiterer Vorteil der “groben“ Systeme ist, daß aus den Kernextrakten einzelne Transkriptionsfaktoren depletiert und nach Manipulationen durch Rückgabe wieder hinzugefügt werden können. Im Gegensatz dazu eignen sich “rekonstituierte“ Systeme zur Untersuchung einzelner Faktoren. Sie stellen nämlich ein definiertes Minimalsystem dar. Letzteres System kam nicht zum Einsatz.

Bei der Analyse von RNA-Polymerase II-Transkripten hat sich die Methode von Sawadogo und Roeder (Sawadogo und Roeder, 1985) bewährt. Dazu verwendet man synthetische DNA-Konstrukte, die Transkripte einer definierten Länge erzeugen; Diese enthalten in 3´-Richtung vom Transkriptionsstart über eine Länge von 200 bp bis 400 bp keine Guanosin-Basen in ihrer Sequenz. Verwendet man nun 3´-O-Methyl-guanosintriphosphat (OMG) anstelle von Guanosintriphosphat (GTP), so bricht die RNA-Synthese nach dem Einbau des ersten Guanosin-Analogons in die RNA-Kette ab. In einem Kernextrakt kompetitiert allerdings vorhandenes GTP mit OMG um den Einbau in die wachsende RNA. Damit wird eine Termination der Transkription am Ende der G-freien Kassette verhindert. Bei Einsatz von Kernextrakten linearisiert man deshalb den Vektor direkt am 3´-Ende der G-freien Kassette, so daß die RNA-Polymerase II dann an dieser Stelle von der Matrize abfällt. Dieses Vorgehen ermöglicht auch die Verwendung von GTP als Substrat. Man bezeichnet diese Methode als “run-off“-Transkription. Verwendet man ein zirkuläres DNA-Templat, so kann man alternativ die unerwünschten RNA-Produkte mit RNAse T1 verdauen. Damit werden spezifisch Phosphordiesterbindungen nach G-Basen hydrolisiert. Diese Methode wird auch als “run-on“-Transkription bezeichnet.
In dieser Arbeit wurde als DNA-Templat ein vom HIV-Virus abgeleiteter Promotor pMRG5 eingesetzt. pMRG5 besitzt von Positon -65 bis -8 die HIV-Kernpromotorsequenz und von -7 bis +9 den “Major Late“-Initiator des Adenovirus. Zusätzlich enthält das DNA-Templat fünf Bindungsstellen für die DNA-Bindungsdomäne des Hefe-GAL4-Proteins stromaufwärts der TATA-Box. In den Untersuchungen kamen synthetische Aktivatoren zum Einsatz, die mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert waren. Diese sind in der Lage an die GAL4-Bindungsstellen von DNA-Templaten zu binden.

***In-vitro*-Transkription im “groben“-System mit Kernextrakten:** Zunächst legt man für jeden einzelnen Ansatz einen vorgemischten Mix (Mix A) vor. Dieser enthält neben dem DNA-Templat pMRG5 weitere für die Transkription essentielle Komponenten. Anschließend werden in jeden Ansatz jeweils 3–8 μl des zu testenden Kernextraktes zugegeben. Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe der Nukleotide, eingebracht durch den NTP-Mix. Der NTP-Mix enthält auch α ^{32}P-CTP als radioaktiven Marker zur späteren Quantifizierung der RNA. Das Reaktionsvolumen wird mit Wasser

auf 20 μl ergänzt. Das Gemisch wird anschließend für 60 min bei 28 °C inkubiert. Die Reaktion beendet man durch Zugabe von 0,4 ml Stop-Puffer. Dann erfolgt einmalige Extraktion mit einer Lösung bestehend aus 50% (v/v) Phenol, 49% (v/v) Chloroform und 1% (v/v) Isoamylakohol. Aus der extrahierten Lösung wird die bei der Transkriptionsreaktion gebildete DNA mit 0,4 ml eiskaltem Isopropanol gefällt. Dieser Verfahrensschritt erfolgt durch Inkubation der Lösung für mindestens 1 h bei -20 °C. Nach 45 min Zentrifugation (4 °C, 15.000 rpm) schließt sich das Waschen des Präzipitats mit 0,8 ml eiskaltem 70%igem Ethanol an. Der getrocknete Niederschlag wird in 10 ml Formamid-Auftragspuffer aufgenommen und durch Inkubation (15 min) bei 55 °C gelöst. Damit ist die gewonnene RNA für die Elektrophorese vorbereitet.

Mix A: BC-Puffer mit variablem KCl-Gehalt, pH 6,8
50-80 mM KCl
25 mM HEPES, pH 8,2
$MgCl_2$ 4 mM
DTT 5 mM
PMSF 0,2 mM
ad 10% Glycerin
BSA 140 μg
5 x pMRG5 100 μg
RNase Block 0,5 μl

NTP-Mix: 0,6 μl α ^{32}P-CTP (3000 Ci/mmol)
0,1 mM ATP
0,1 mM UTP
0,1 mM GTP
0,025 mM CTP

Die Mengenangaben für den Mix A und den NTP-Mix beziehen sich jeweils auf ein finales Reaktionsvolumen von 20 μl.

Stop-Puffer: 7 M Harnstoff
10 mM Tris-HCl, pH 7,8
10 mM EDTA/NaOH, pH 8,0
0,5% (w/v) SDS
100 mM LiCl
0,1 mg/ml tRNA
300 mM Natriumacetat, pH 5,0

Formamid-Auftragspuffer: 97% Formamid (deionisiert auf Dowex)
20 mM Tris-HCl pH 7,0
10 mM EDTA/NaOH pH 8,0
0,1% (w/v) BPB, 0,1% (w/v) XC

Elektrophorese mittels eines denaturierenden Polyacrylamidgels: Die vorher gewonnenen Proben werden mit Hilfe eines 5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgels (20 cm x 16 cm Glasplatten, 1,5 mm Abstandshalter) aufgetrennt.
Dazu werden zu 50 ml Gellösung 0,4 ml einer 30%igen (w/v) wäßrigen APS-Lösung und 20 ml TEMED zugegeben. Anschließend gießt man die Gellösung zwischen die Glasplatten, setzt den Geltaschenformer ein und läßt das Gel 1 h auspolymerisieren. Nach 30 min Vorlauf bei 50 mA werden jeweils die Proben aufgetragen und für ca. 90 min bei 50 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel abgenommen, 10 min in 10%iger (v/v) Essigsäure fixiert, dreimal gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen, auf 3MM Papier (Whatman) übertragen und 1 h bei 70 °C auf dem Geltrockner getrocknet. Die Autoradiographie erfolgt zweckmäßigerweise über Nacht oder länger mit einer Verstärkerfolie bei –80 °C.

Gellösung: 5% (w/v) (19:1) Acrylamid/Bisacrylamid
8 M Harnstoff
mit 1xTBE auffüllen

3.9 *In-vitro*-Methylierung von Histonen

Mittels *in vitro*-Methylierung von Histonen werden fraktionierte Zellkernextrakte bzw. Immunoaffinitäts-gereinigte Proteinfraktionen auf Methyltransferaseaktivität untersucht.
In Vorbereitung der Proben mischt man 4–8 μl Antikörpersäule in BC100 (siehe Abschnitt 3.7.13) oder 20–60 μg Protein einer fraktionierten Proteinlösung mit 5–10 μg Kalbsthymus Histonen und 50 nCi S-[^{14}C] Adenosylmethionin in Methylierungspuffer. Dann inkubiert man für 1 h bei 37 °C. Anschließend wird die inkorporierte Radioaktivität mittels Szintillationszähler oder über Autoradiographie analysiert.

Szintillationsmessung: Das vorbereitete Reaktionsgemisch wird mit einer Pipette auf ein P81 Filterpapier (1,5 cm x 1,5 cm) getropft. Man läßt kurz antrocknen und wäscht den Filter dreimal jeweils 5 min in einem großen Überschuss Waschpuffer. Dann läßt man den Filter an der Luft trocknen. Anschließend wird dieser in ein Szintillationsröhrchen mit 5 ml Szintillationslösung (Rotiszint, Sigma) überführt. Nach Kalibrierung des Szintillationsmeßgerätes wird die Radioaktivität der Probe gemessen. Die Meßzeit beträgt 4 min. Mindestens drei unabhängige Reaktionsansätze werden vermessen. Damit wird eine statistische Auswertung ermöglicht.

Autoradiographie: Die jeweiligen Reaktionsansätze werden in 1 x SDS-Puffer aufgenommen und über ein 18%iges Polyacrylamidgel (200:1) (Einzelheiten s. Abschnitt 3.7.2) mit Histon-Laufpuffer aufgetrennt. Anschließend überträgt man die Proben analog der Beschreibung in Abschnitt 3.7.7 auf eine Nitrozellulosemembran. Die Autoradiographie erfolgt je nach Bedarf 1 bis 14 Tage bei RT.

Methylierungspuffer:
25 mM Tris-HCl pH 8,5
10 mM KCl
5 mM $MgCl_2$
125 mM Sucrose
0,5% (v/v) Igepal CA630
5 mM DTT
0,2 mM PMSF
0,1 mM Benzamidin

Waschpuffer:
50 mM Natriumcarbonat, pH 9,2

18%iges Polyacrylamidgel:
15 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
5,4 g Acrylamid
1,35 ml 2% (w/v) Bisacrylamid
0,3 ml 10% (w/v) SDS
H_2O ad 30 ml

Histon-Laufpuffer: 50 mM Tris
3,84 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS
H_2O ad 1000 ml

3.10 *In-vitro*-Acetylierung von Histonen

Mittels *in vitro*-Acetylierung von Histonen lassen sich fraktionierte Zellkernextrakte oder Immunoaffinitäts-gereinigte Proteinfraktionen auf Acetyltransferaseaktivität untersuchen. Die Vorgehensweise erfolgt analog zur Analyse der Methylierung. Dazu wird die zu untersuchende Probe mit 100 nCi [^{14}C]Aceytl-CoA und 5–10μg Kalbsthymus Histonen in 50μl Acetylierungspuffer vermischt und 1 h auf 37 $^\circ$C inkubiert. Die inkorporierte Radioaktivität wird entsprechend den Angaben des vorherigen Abschnitts entweder mit Hilfe von Szintillationsmessung oder durch Autoradiographie quantifiziert.

Acetylierungspuffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
75 mM NaCl
2,5 EDTA
0,1 mM Butyrat
0,5% (v/v) Igepal CA630
5 mM DTT
0,2 mM PMSF
0,1 mM Benzamidin

4 Ergebnisse

4.1 CBP ein an VP16-bindender Cofaktor

4.1.1 Konzeptionelle Vorgehensweise zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von Cofaktoren an die VP16-Aktivierungsdomäne

Der virale Aktivator VP16 eignet sich wegen seiner mit 79 Aminosäuren kompakten Aktivierungsdomäne und seiner Fähigkeit zur Transaktivierung als Modellaktivator in Eukaryonten. Die Charakterisierung von VP16-interagierenden Faktoren und die Untersuchung ihres Einflusses auf die Funktion von VP16 können deshalb gut zum allgemeinen Verständnis der Wirkungsweise von Aktivatoren beitragen.
Die Aktivierungsdomäne von VP16 am *C*-Terminus umfaßt die Aminosäuren aa 411–490 (Triezenberg et al., 1988; Cress und Triezenberg, 1991; Triezenberg, 1995). Man kann VP16:AD in zwei Subdomänen mit den Aminosäurebereichen aa 411–452 (H1) und aa 453–490 (H2) unterteilen. Diese können für sich als eigenständige Aktivierungsdomänen wirken (Walker et al., 1993).
Der hohe Anteil saurer Aminosäuren in VP16:AD könnte zur unspezifischen Bindung positiv geladener Proteine führen. Als Kontrolle wurden daher die Mutationen VP16:H1[F442P] (Ersatz von Phenylalanin durch Prolin an der Position 442) und VP16:H2[F473A,F475A,F479A] (Ersatz von Phenylalanin durch Alanin an den Positionen 473, 475 und 479) herangezogen. Diese Mutationen eliminieren faktisch die Transaktivierung sowohl in transienten Reportersystemen als auch im Kontext des Virus (Regier et al., 1993). Die vergleichenden Untersuchungen sollten daher in erster Näherung die spezifisch interagierenden Faktoren identifizieren. Ziel war es, Zusammenhänge zwischen Funktion der VP16-Aktivierungsdomäne und der Bindungsspezifität interagierender Faktoren aufzuzeigen.

4.1.2 CBP interagiert mit der H2-Region der VP16-Aktivierungsdomäne *in vivo*

Die Histon-Acetyltransferase CBP (“CREB binding protein“) spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Apotose (Bannister und Kouzarides, 1996; Janknecht et al., 1998; Giordano und

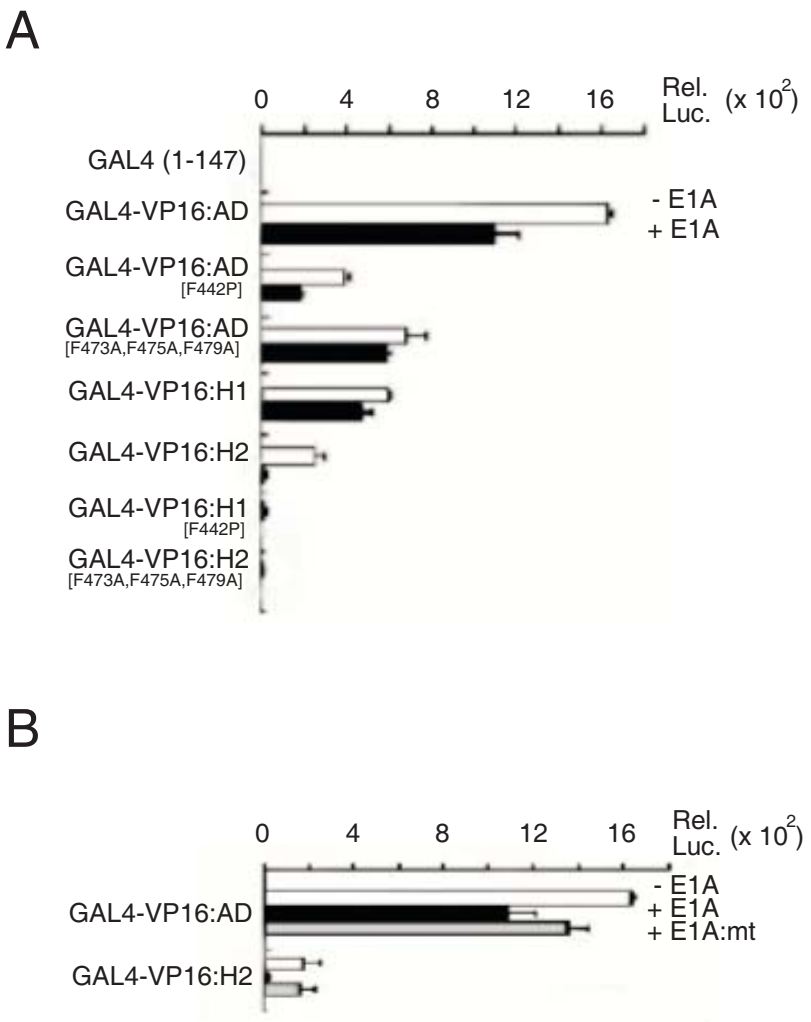


Abbildung 5: E1A-12S inhibiert in Säugerzellen die Transaktivierung von VP16:AD und VP16:H2, nicht aber von VP16:H1. (A) Transfektion von pGLMRG5-Reporter, VP16:AD, VP16:H1, VP16:H2, VP16:H1[F442P], VP16:H2[F473A,F475A,F479A], VP16:AD[F442P] und VP16:AD[F473A,F475A,F479A] als Fusion mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (aa 1–147) in Anwesenheit (schwarze Balken) bzw. Abwesenheit von E1A-12S (weiße Balken) in Jurkat-Zellen (Mengenangaben in Abschn. 3.5.1). Gezeigt sind die relativen Luciferase-Aktivitäten normiert auf β-Galaktosidase-Aktivität. (B) Transfektion von pGLMRG5, GAL4-VP16:AD und GAL4-VP16:H2 in Abwesenheit von E1A-12S (weiße Balken) bzw. Anwesenheit (schwarze Balken) von E1A-12S bzw. einer E1A-12S (E1A:mt)-Mutante; Letzterer fehlt die für die Interaktion mit CBP benötigte Region (grauer Balken).

Avantaggiati, 1999; Goodman und Smolik, 2000; Shikama et al., 2000; Chan und La Thangue, 2001; Marmorstein 2001). Damit kam CBP als Bindungspartner für VP16 in Frage.

In Zusammenarbeit mit K. Ikeda (Jichi Medical School, Japan) wurde ein *in vivo*-System in Säugerzellen ausgearbeitet. VP16:AD, VP16:H1 und VP16:H2 wurden als Fusion mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (aa 1–147) in Transfektionsexperimenten eingesetzt. Als Spezifitätskontrolle dienten die Mutanten VP16:H1[F442P], VP16:H2[F473A,F475A,F479A], VP16:AD[F442P] und VP16:AD[F473A,F475A,F479A]. Die VP16-Konstrukte wurden zusammen mit dem Luciferase-Reporter pGLMRG5, welcher fünf GAL4-Bindungsstellen stromaufwärts vor einem synthetischen Kernpromotor besitzt, in Jurkat-Zellen transfiziert.

Die Vollänge VP16:AD aktivierte 1600-fach, die VP16:H1-Region 600-fach und die VP16:H2-Region 300-fach über Hintergrund (Abb. 5A, weiße Balken). Der Austausch des Phenylalanins F442 durch Prolin erwies sich als kritisch für die Aktivierung *in vivo*, sowohl im Kontext der VP16-Vollänge, als auch der VP16:H1-Region. Die Dreifach-Mutation der Phenylalanine F473, F475 und F479 jeweils durch Alanin in der VP16:H2-Region schwächte die Aktivität ebenfalls stark. Diese Ergebnisse bestätigten die früheren *in vivo*-Befunde von Triezenberg und O'Hare (Walker et al., 1993; Regier et al., 1993).

Die Jurkat-Zellen wurden nun mit einem Expressionsplasmid für das Adenovirus E1A-12S-Protein cotransfiziert. E1A-12S bindet CBP über die konservierte Region I (CR 1) und reprimiert Bindungen an regulatorische Oberflächen (Lillie et al., 1987; Offringa et al., 1990; Wong und Ziff, 1994). E1A-12S inhibierte die Aktivierung von VP16:AD und VP16:H2, aber nicht von VP16:H1 (Abb. 5A, schwarze Balken). Die Cotransfektion einer E1A-Mutante, welcher die für die Interaktion mit CBP wichtige CR 1-Region fehlte (Bannister und Kouzarides, 1995), blieb ohne Wirkung (Abb. 5B). Die Daten schlagen vor, daß CBP mit der H2-Region von VP16 interagiert und für seine Aktivierung in transienten Assays wichtig ist.

4.1.3 VP16:H2 depletiert CBP aus Kernextrakten

Es galt nun die Interaktion von CBP mit der VP16-Aktivierungsdomäne mit Hilfe von GST-VP16-Affinitätssäulen *in vitro* zu bestätigen.

VP16:AD wurde als Fusionsprotein mit GST (Glutathion-S-Transferase) auf Glutathion-Sepharose immobilisiert und Jurkat-Kernextrakt wurde auf die Affinitätssäule geladen. Der Durchlauf wurde mit Hilfe der Western-Blot-Analyse auf CBP untersucht. Zum Vergleich erfolgte auch die Prüfung auf Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren TBP, TFIIB, PC4, P/CAF und HDAC1 (Abb. 6). Die Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren TBP, PC4 und TFIIB im Kernextrakt nach Inkubation mit der VP16:AD-Affinitätssäule änderten sich nicht oder nur wenig (Abb. 6A), wiewohl bekannt war, daß sie an VP16 binden (Kretzschmar et al., 1994a; Nedialkov und Triezenberg, 2004; Jonker et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurde CBP vollständig aus dem Kernextrakt depletiert, was auf eine starke Wechselwirkung zwischen CBP und VP16:AD hinweist. P/CAF und HDAC1 banden nicht an VP16 und dienten damit als Negativkontrolle. Die Spezifität der Bindung wurde mit Hilfe der Mutanten VP16:AD[F442P], VP16:AD[F473A,F475A,F479A], VP16:H1[F442P] und VP16:H2[F473A,F475A,F479A] der Subdomänen H1 und H2 nachgewiesen (Abb. 6B).

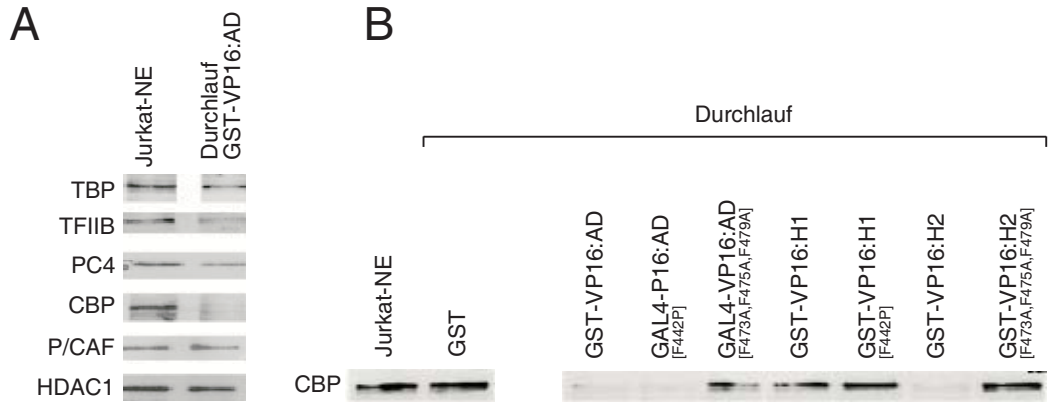


Abbildung 6: Interaktion von CBP mit VP16:H2. (A) Western-Blot von Jurkat-Kernextrakt nach Bindung an GST-VP16:AD-Affinitätssäule. Auftrag und Durchlauf wurde mit spezifischen Antiseren gegen die Transkriptionsfaktoren TBP, TFIIB, PC4, P/CAF, HDAC1 und CBP getestet. (B) Western-Blot-Analyse von Jurkat-Kernextrakt nach Bindung an die gezeigten GST-VP16-Konstrukte (immobilisiert an Glutathion-Sepharose) mit einem spezifischen Antikörper gegen CBP. CBP wird sowohl durch VP16:H2 als auch durch VP16:AD vollständig depletiert. Dreifach-Mutation der Phenylalanine F473, F475 und F479 zu Alanin in VP16:AD bzw. in VP16:H2 hebt die Interaktion mit CBP vollständig auf. Die VP16:H1-Region zeigt keine Interaktion mit CBP.

VP16:AD[F473A,F475A,F479A], VP16:H1[F442P], VP16:H2[F473A,F475A,F479A] und auch VP16:H1 depletierten CBP nicht. Die Untersuchungen lassen insgesamt den Schluß zu, daß CBP mit der H2-Region und nicht mit der H1-Region von VP16 interagiert. In Übereinstimmung mit den funktionellen Daten (Abb. 5A) depletierte VP16:AD und auch die VP16:H2-Region CBP vollständig aus dem Extrakt.

4.1.4 VP16:H2 bindet die amino- und carboxyterminale Region von CBP

Aus den vorherigen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob CBP die VP16:H2-Domäne direkt bindet und wenn, in welcher Region. Um dies zu klären wurden CBP-Deletionskonstrukte mit den Aminosäurebereichen aa 1–1098, aa 1098–1758 und aa 1678–2441 als Fusionsproteine mit GST *E. coli* exprimiert. In Abb. 7A sind CBP und die eingesetzten CBP-Deletionskonstrukte schematisch dargestellt. Die drei isolierten und gereinigten CBP-Deletionskonstrukte wurden jeweils an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Anschließend erfolgte Inkubation jeder der Affinitätssäulen mit GAL4-VP16:H2 und parallel dazu mit der VP16:H2-Mutante GAL4-VP16:H2[F473A,F475A,F479A]. Der Durchlauf der jeweiligen Säule wurde mit einem GAL4-Antikörper auf Anwesenheit von VP16:H2 bzw. VP16:H2[F473A,F475A,F479A] geprüft. GAL4-VP16:H2 war im Durchlauf der Affinitätssäulen, welche die amino- (aa 1–1098) und die carboxyterminale Region (aa 1678–2441) von CBP enthielten, nicht nachzuweisen (Abb. 7B, Spur 2 und 4). Im Durchlauf der Säule, welche die zentrale CBP-Region (aa 1098–1758) enthielt, konnte hingegen GAL4-VP16:H2 nachgewiesen werden (Abb. 7B, Spur 3). VP16:H2 bindet demnach an die amino- und carboxyterminale, nicht aber an die zentrale Region von CBP. Es zeigte sich, daß die aminoterminale CBP-Region (aa 1–1098) geringfügig die Konzentration der VP16:H2-Mutante vermindert (Abb. 7B, Spur 2). Die carboxyterminale CBP-Region (aa 1678–2441) konnte auch die VP16:H2-Mutante binden (Abb. 7B, Spur 4). Damit bindet VP16:H2 nur an die aminoterminale CBP-Region spezifisch.

Mit dem Ziel der weiteren Eingrenzung der Bindungsregionen wurden in Fortsetzung dieser Untersuchungen auch noch weiter verkürzte amino- und carboxyterminale Fragmente (aa 1–99, aa 100–461, aa 462–661, aa 662–1098, aa 1758–1892, aa 1891–2441, aa 2058–2163) von CBP hergestellt. Nach Vorbereitung der Säulen, wie oben beschrieben, und anschließender Affinitätschromatographie zeigte sich, daß nur die

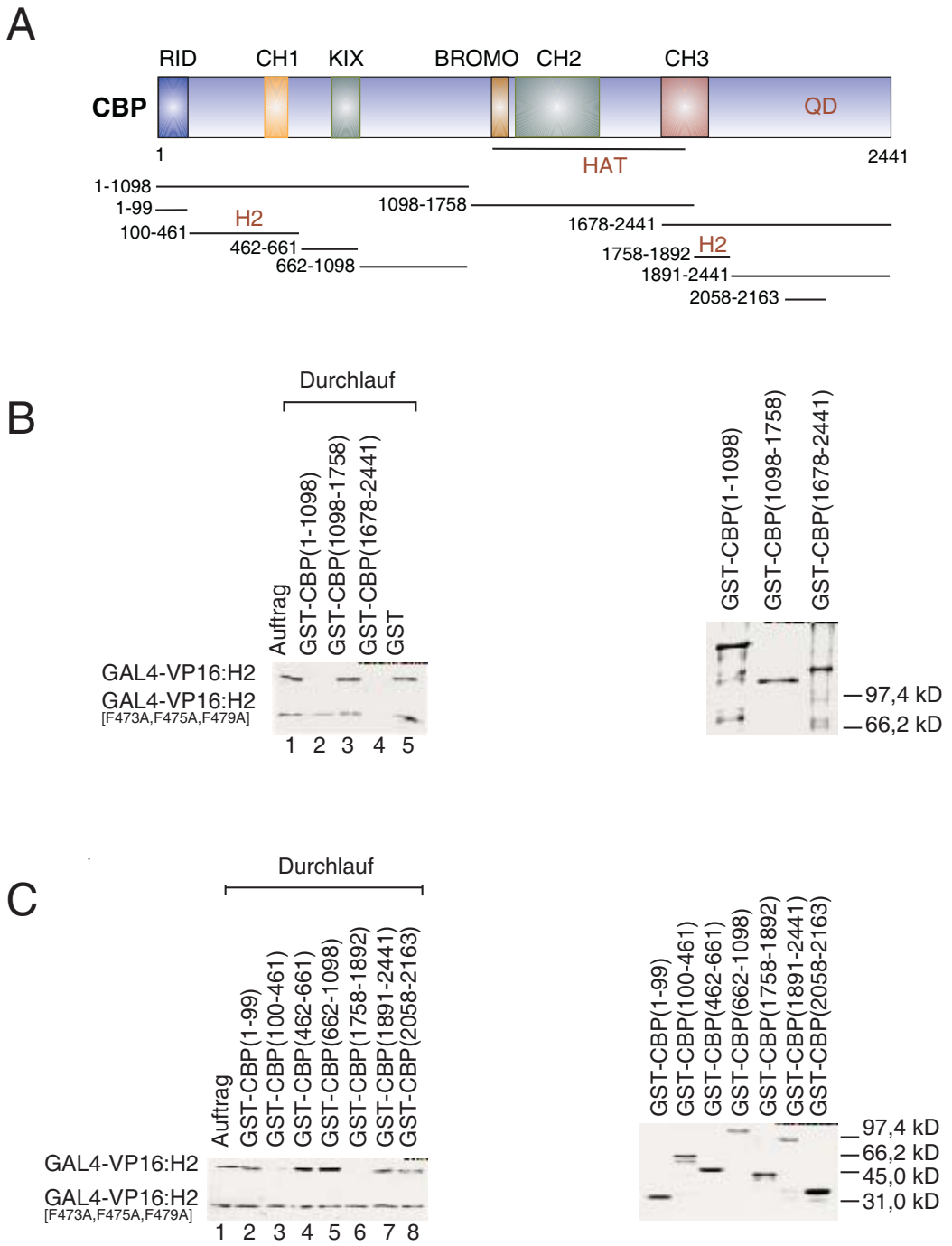


Abbildung 7: Identifizierung der Interaktionsregionen von CBP mit VP16:H2. (A) Schematische Darstellung von CBP und der im Experiment verwendeten CBP-Deletionskonstrukte. Eingezeichnet sind charakteristische Regionen von CBP: CH1, CH2 und CH3 (Cystein- und Histidin-reiche Regionen); BROMO (BROMO-Domäne); HAT ("Histon-Acetyl-Transferase"-Domäne); KIX-Domäne ("CREB binding domain"); QD (Glutamin-prolinreiche-Domäne); RID ("nuclear receptor interacting-domain") (Goodman und Smolik, 2000).

(B) Western-Blot-Analyse von GAL4-VP16:H2 und GAL4-VP16:H2[F473A,F475A,F479A] nach der Bindung an GST-CBP-Deletionskonstrukte (immobilisiert an Glutathion-Sepharose). Der Nachweis erfolgte jeweils durch einen spezifischen Antikörper gegen GAL4. GAL4-VP16:H2 wird durch GST-CBP (aa 1–1098) und GST-CBP (aa 1678–2441) aus dem Extrakt depletiert. Die GST-CBP-Affinitätssäulen wurden zur Kontrolle der Beladung durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (rechts). (C) Western-Blot-Analyse von GAL4-VP16:H2 und GAL4-VP16:H2[F473A,F475A,F479A] nach der Bindung an weiteren CBP-Deletionskonstrukten. Die Vorgehensweise war analog zu (B). GAL-VP16:H2 wird spezifisch sowohl durch GST-CBP (aa 100–461) als auch durch GST-CBP (aa 1758–1892) depletiert. Die Kontrolle der GST-CBP-Affinitätssäulen ist rechts dargestellt.

CBP-Deletionskonstrukte aa 100–461 und aa 1758–1892 GAL4-VP16:H2 binden (Abb. 7C, Spur 3 und 6). Die beiden Deletionen wechselwirkten nicht mit der VP16:H2-Mutante. Die Daten verdeutlichen, daß CBP direkt an VP16:H2 bindet. Die Bindung erfolgt offensichtlich über zwei voneinander unabhängige Regionen. Diese befinden sich in der aminoterminalen- (aa 100–461) und der carboxyterminalen-Region (aa 1758–1892) von CBP.

4.2 Bindung von Chromatin-modifizierenden Faktoren an VP16

Als nächstes wurde ein funktioneller Screen auf Bindung Chromatin-modifizierender Faktoren an VP16 etabliert. Getestet wurde auf Histon-Acetyltransferase- und Histon-Methyl-Transferaseaktivität. Zunächst wurden die GST-Fusionsproteine VP16:H1, VP16:H2, VP16:H1[F442P] und VP16:H2[F473A,F475A,F479A] an Glutathion-Sepharose gebunden und mit HeLa-Kernextrakt inkubiert. Gebundene Proteine wurden mit Kalbsthymus-Histonen (Fa. Roche) und S-[^{14}C]Adenosyl-methionin bzw. [^{14}C]Acetyl-CoA als Coenzym inkubiert.

Die Auswertung der Überstände mittels Autoradiographie lieferte Hinweise auf spezifische Interaktion der VP16:H2-Domäne mit einer H2- und H3-Histon-Acetyltransferaseaktivität (Abb. 8, Spur 4). Die an VP16:H1 gebundenen Aktivitäten wurden hingegen in gleicher Stärke auch bei den Kontrollen gemessen (Abb. 8, Spur 2,3,5). Die spezifische Wechselwirkung einer Histon-Acetyltransferase mit VP16:H2 deutet auf CBP hin. CBP kann alle vier Kern-Histone *in vitro* acetylieren (Bannister und Kouzarides, 1996). Sowohl VP16:H1, VP16:H2 (Abb. 8, Spur 3,4) als auch

VP16:H1[F442P] und VP16:H2[F473A,F475A,F479A] (Abb. 8, Spur 2,5) interagierten mit H4-Histon-Acetyltransferaseaktivität und H4-Histon-Methyltransferase-Aktivität; deren Identitäten unbekannt sind.
Abb. 8 zeigt auch, daß VP16:H1 und VP16:H2, nicht aber die VP16:H1- und VP16:H2-Mutanten mit H3-Histon-Methyltransferaseaktivität interagierten (vgl. Spur 9,10 mit 8,11). Bis heute ist keine H3-Histon-Methyltransferase identifiziert, die an VP16 bindet.

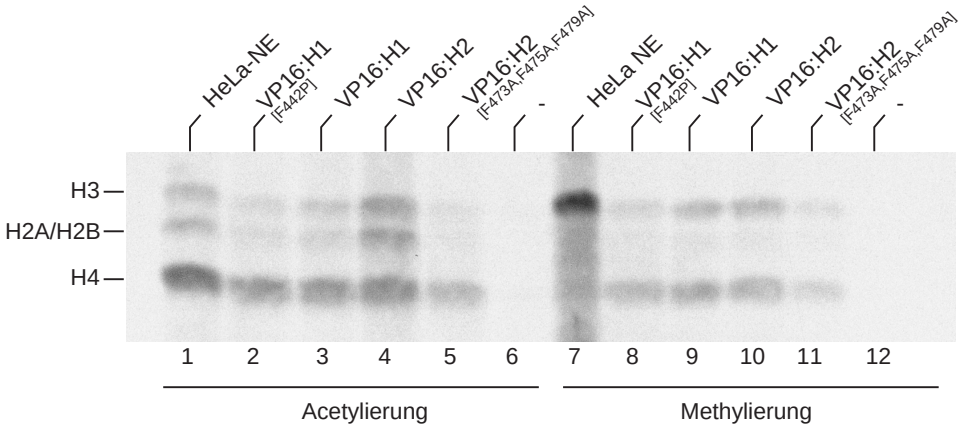


Abbildung 8: Qualitative Prüfung auf Interaktion von Histon-Acetyltransferasen und Histon-Methyltransferasen mit VP16. Autoradiographie von VP16-bindenden enzymatischen Aktivitäten aus HeLa-Kernextrakt. HeLa-Kernextrakt wurde mit an Glutathion-Sepharose immobilisierten GST-VP16:H1, GST-VP16:H2, GST-VP16:H1[F442P] und GST-VP16:H2[F473A,F475A,F479A] inkubiert. Die Säulen wurden jeweils mit 100 mM KCl gewaschen und mit Kalbsthymus-Histonen, [^{14}C]Acetyl-CoA (s. Abschn. 3.10) bzw. S-[^{14}C]Adenosyl-methionin (s. Abschn. 3.9) inkubiert. Die Negativkontrolle (Spur 6 und 12) enthielt nur Histone und das radioaktive Substrat. HeLa-Kernextrakt diente als Positivkontrolle (Spur 1 und 7). Die Säulenüberstände wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und die inkorporierte Radioaktivität durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

4.3 Humaner Mediator bindet spezifisch an VP16

Die Bindung und Spezifität von Mediator und anderen Cofaktoren wurde in GST-Pull-Down Studien untersucht. Es wurde folgendes Reinigungsprotokoll angewendet. Um unspezifische Wechselwirkungen bei der Affinitätsreinigung mit den VP16-Konstrukten

zu reduzieren, wurde der für die Proteinreinigung verwendete HeLa-Kernextrakt im ersten Schritt mit einer GST-Sepharosesäule vorinkubiert. Die gebundenen Proteine wurden anschließend fünfmal mit zehnfachem Überschuss an 100 mM KCl-Puffer gewaschen und dann zweimal mit der dem Säulenvolumen entsprechenden Volumen an 0,2% *N*-Lauryl-Sarcosin in 100 mM HEGN-Puffer oder mit 500 mM KCl-HEGN-Puffer eluiert. Die Charakterisierung der in den Eluaten enthaltenen Polypeptide erfolgte mit Hilfe der Western-Blot-Analyse (Abb. 9).

VP16:AD, VP16:H1 und VP16:H2 interagieren spezifisch mit MED1, MED7, MED14, MED15, MED23, MED24, MED21 und CDK8. PC4 bindet präferentiell an VP16:H2. Erstaunlicherweise zeigten einige Untereinheiten geringere Spezifität als andere.

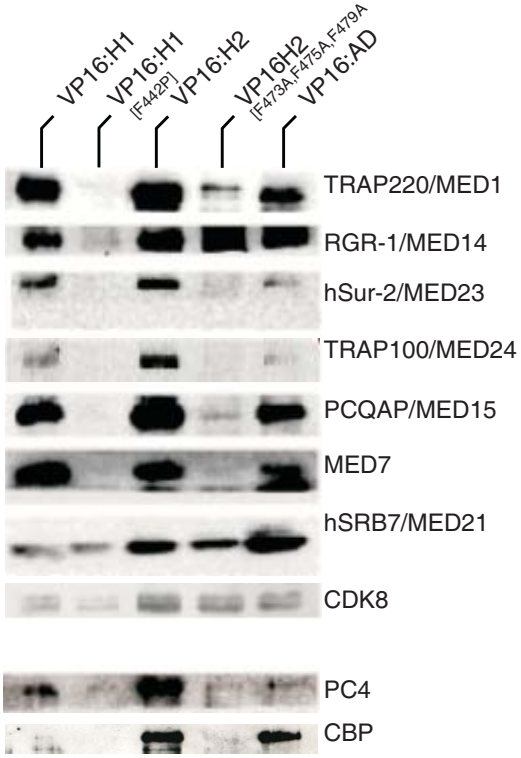


Abbildung 9: Western-Blot-Analyse VP16-gebundener Proteine. Jeweils 20 μl der Affinitätssäulen GST-VP16:H1, GST-VP16:H2, GST-VP16:AD, GST-VP16:H1[F442P] und GST-VP16:H2[F473A,F475A,F479A] wurden mit 1 ml HeLa-Kernextrakt inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit 500 mM KCl eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt (s. auch Abschn. 3.7.12). Aufgetragen sind jeweils 20% der Eluate. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch spezifische Antiseren gegen die in der Abbildung gekennzeichneten Proteine.

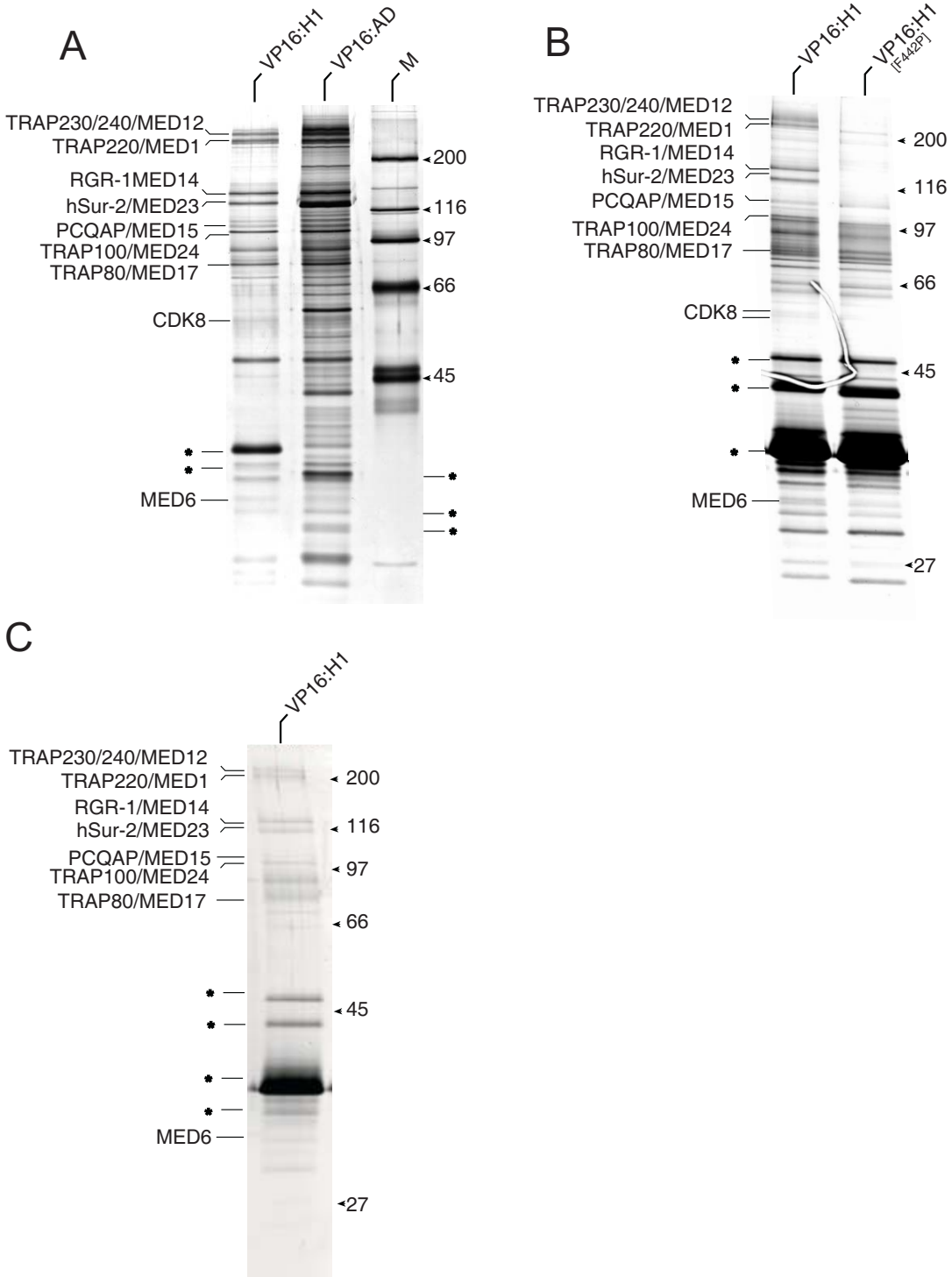


Abbildung 10: Analyse von Proteinen, die aus HeLa-Kernextrakt bzw. USA-Fraktion an VP16:AD

und VP16:H1 binden. (A) Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel von VP16:H1- und VP16:AD-bindenden Proteinen. GST-VP16:AD und GST-VP16:H1 wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Jeweils 20 μl Affinitätssäule wurde mit 1 ml HeLa-Kernextrakt inkubiert und die gebundenen Proteine mit 500 mM KCl eluiert (Auftrag jeweils 10% der Fraktion); s. auch Abschn. 3.7.12. Die Mediator-Untereinheiten sind soweit zuzuordnen. Die molekularen Massen der Markerproteine (M) sind angegeben. Sterne markieren kontaminierende Proteine. (B) Silbergefärbtes SDS-Gel der Detergenseluate von GST-VP16:H1 und GST-VP16:H1[F442P]. Vorgehensweise anlog zu (A), aber Elution mit HEGN100/0.2%N-Lauryl-sarcosin (Auftrag jeweils 50% der Fraktion). (C) Silbergefärbtes SDS-Gel des Detergenseluats von GST-VP16:H1 aus USA-Fraktion. 20 μl Affinitätssäule wurde mit 1 ml USA inkubiert und die gebundenen Proteine wurden mit 500 mM KCl eluiert (Auftrag jeweils 50% der Fraktion; USA: HeLa-Kernextrakt über Phosphocellulose P11-Säule gereingt und bei 0,85 M KCl eluiert).

Möglicherweise liegt das an unterschiedlichem Elutionsverhalten. Die Daten unterstrichen in Übereinstimmung mit den Befunden aus Abschnitt 4.1.2, daß CBP ausschließlich an die VP16:H2-Domäne, nicht aber an die VP16:H1-Domäne bindet. Die Versuchsergebnisse erlauben die Aussage, daß die Bindung von CBP an VP16 unabhängig von Mediator erfolgt. Die nähere Charakterisierung der Eluate der Affinitätsreinigungen von VP16:AD, VP16:H1 und VP16:H1[F442P] erfolgte darüberhinaus auch mittels Silberfärbung. Dabei wurde im Vergleich der Bandenmuster von VP16:H1 und VP16:AD sichtbar, daß die Vollänge deutlich mehr Protein bindet als VP16:H1 (Abb. 10A). Der humane Mediator ließ sich reiner mit der VP16:H1-Domäne anreichern. Die VP16:H2-Domäne verhielt sich ähnlich wie VP16:AD (Daten nicht gezeigt). Die silbergefärbten Proteingele bestätigen grundsätzlich die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse. Dies ist beispielsweise daran zu erkennen, daß die Mutation F442P in VP16:H1 die Bindung des Mediators verhindert. Die vorliegenden Befunde unterstreichen die spezifische Bindung des humanen Mediators an VP16.

Um humanen Mediator mit aufgereinigtem PC2 zu vergleichen wurde eine angereicherte USA-Fraktion mit VP16:H1 inkubiert und gebundene Proteine mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Das Bandenmuster ähnelte dem mit Extrakt beobachteten (vgl. Abb. 10C mit A und B).

In Fortsetzung dieser Studien im Arbeitskreis gelang es G. Mittler mit Hilfe von Immunoaffinitätsreinigungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen MED15 nachzuweisen, daß USA einen definierten Mediator-Komplex, genannt B-Med, enthält

(Mittler et al., 2001). Dieser enthält MED26, ihm fehlt aber MED16 ebenso wie MED13 und CDK8. B-Med aktiviert die basale Transkription. Sein Elutionsverhalten ähnelt dem von PC2 (Kretzschmar et al., 1994a; Malik et al., 2000). Es bleibt allerdings unklar, ob die hinter den Aktivitäten stehenden Komplexe identisch sind.

4.4 MED25 ein neues VP16-bindendes Protein

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß CBP direkt an VP16:H2 bindet und damit wichtig für die zelluläre Funktion von VP16 ist. In diesem Zusammenhang klärte K. Ikeda auf, daß VP16:H2 in einem groben *in-vitro*-Transkriptionssystem in Kombination mit einem Chromatin-Reporter Acetyl-CoA-abhängig voll aktiv ist. Im Gegensatz dazu funktioniert die VP16:H1-Domäne in einem groben *in vitro*-Transkriptionssystem auch ohne Chromatin-Reporter vollständig (Ikeda et al., 2002). Andererseits gelang es bisher nicht, die Aktivität von VP16:H1 in einem gereinigten Polymerase II-Transkriptionssystem mit Hilfe der aus der USA-Fraktion gereinigten Cofaktoren PC2 (Malik et al., 2000) bzw. PC4 (Kretzschmar et al., 1994b) zu rekonstituieren (Meisterernst, 1999). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, daß es einen spezifischen Faktor für VP16 geben sollte, der die Aktivierung der VP16:H1-Domäne vermittelt. Dieser hypothetische Faktor hatte im Arbeitskreis bereits den Arbeitstitel PC6 erhalten (Meisterernst, 1999). Unabhängig davon gelang es G. Mittler parallel zu den eigenen Untersuchungen, ein neues mit VP16:H1 interagierendes Protein mit einem apparenten Molekulargewicht (bestimmt durch SDS-PAGE) von 103 kDa (p103) zu isolieren (Mittler et al., 2003). Es galt nun zu prüfen, ob p103 den gesuchten Faktor PC6 repräsentiert.

4.4.1 Identifikation von ACID1/MED25

Die Auswertung der Computeranalyse der Primärstruktur des Proteins p103 im Arbeitskreis, unter eigener Beteiligung, ergab eindeutige Hinweise auf mindestens zwei strukturierte Domänen. Die erste Domäne (aa 17–226) erwies sich homolog zur bekannten A-Domäne des “Von Willebrand Faktors“ (VWA). Die zweite Domäne zeigte ein bisher unbekanntes Strukturmotiv, das von *Drosophila* bis hin zum Menschen hoch

konserviert vorliegt. Diese neuartige Domäne erhielt den Namen ACID (aa 389–543) (“Activator Interacting Domain“)(Mittler et al., 2003).
Parallel dazu wurde ein weiteres Protein, bezeichnet als PTOV1, isoliert und charakterisiert, das zwei ACID-Domänen enthält (NCBI-Zugangsnummer AF238381). p103 wurde deshalb zunächst als ACID1 und PTOV1 als ACID2 bezeichnet (Mittler et al., 2003). Weitere Untersuchungen mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen ACID1 (in diesem Arbeitskreis unter eigener Beteiligung) klärten dann, daß ACID1 eine Komponente des humanen Mediators ist. Später erwies sich ACID1 als identisch mit der publizierten Untereinheit des ARC-Mediator-Komplexes ARC92 (Yang et al., 2004). ACID1 wurde nach der Einführung einer einheitlichen Nomenklatur für Mediator-Untereinheiten in MED25 umbenannt (Bourbon et al., 2004). In Abbildung 11 ist die Primärstruktur von MED25, (synonym mit p103, ACID1 und ARC92) schematisch dargestellt.

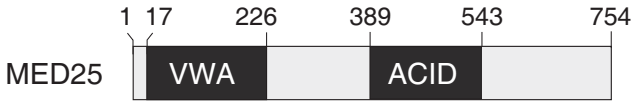


Abbildung 11: Primärstruktur von MED25, synonym mit p103, ACID1 und ARC92 (VWA = Von-Willebrand-Faktor-Typ-A-Domäne; ACID = Activator Interacting Domain).

4.4.2 Die ACID-Domäne von MED25 bindet VP16

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Bindungsverhalten von MED25 an die VP16-Aktivierungsdomäne untersucht werden. Dazu wurden MED25-Konstrukte, die die Aminosäuren 1–715, 144–715, 290–715, 389–543, 1–290, 541–715 und 1–754 (Vollänge) enthielten, hergestellt. Dies erfolgte durch Klonierung von PCR-Konstrukten unterhalb eines eukaryontischen Expressionsvektors. Dabei handelte es sich um einen im Arbeitskreis modifizerten pCI-neo Vector (Promega). Dieser enthält entweder FLAG-tag, das zwischen die Restriktionsschnittstellen *Nhe*I und *Xho*I kloniert wurde oder eine GAL4-DNA-Bindungsdomäne, fusioniert mit einem c-*Myc*-Epitop, zwischen den Restriktionsschnittstellen *Nhe*I und *Eco*RI. Die klonierten MED25-Konstrukte enthielten FLAG-tag und zusätzlich das Kernlokalisationssignal NLS.

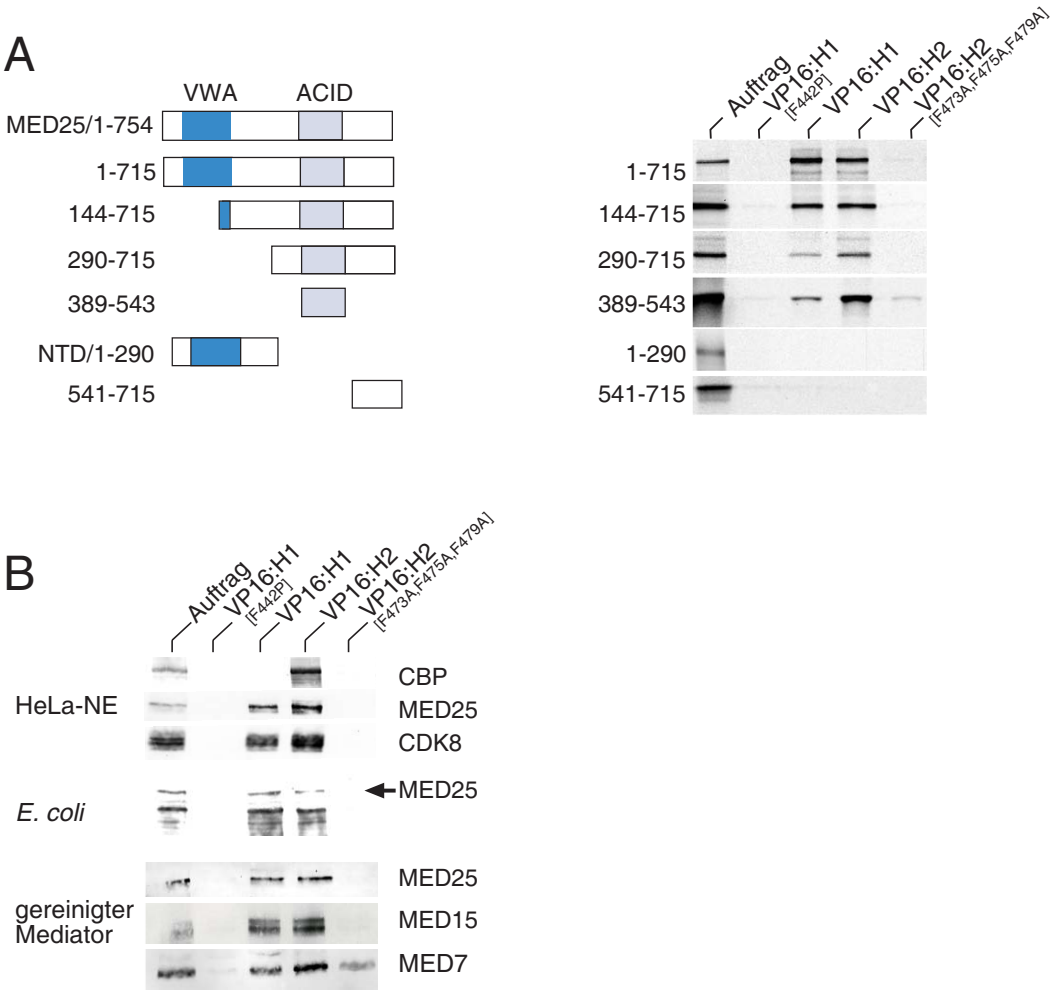


Abbildung 12: Die ACID-Domäne von MED25 bindet spezifisch an die H1- und H2-Region der VP16-Aktivierungsdomäne. (A) (links) Schematische Darstellung der im Experiment verwendeten MED25-Deletionskonstrukte. (rechts) Autoradiographie der MED25-Deletionskonstrukte nach Bindung an die Affinitätssäulen von GST-VP16:H1, GST-VP16:H2, GST-VP16:H1[F442P] und GST-VP16:H2[F473A,F475A,F479A]. Die MED25-Deletionskonstrukte wurden in Reticulocyten exprimiert und auf inkorporiertes [^{35}S]-Methionin standardisiert. Nach Inkubation mit den an Glutathion-Sepharose immobilisierten GST-VP16-Säulen wurden diese mit 100 mM KCl HEGN-Puffer gewaschen (s. Abschn. 3.7.12) und die gebundenen Proteine mit 500 mM KCl HEGN-Puffer eluiert. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit einem Film exponiert. (B) Western-Blot-Analyse von HeLa-Kernextrakt, *E. coli* exprimiertem MED25 und mit VCI-Antikörper gereinigtem und peptid-eluierten Mediator nach der Bindung an GST-VP16:H1-, GST-VP16:H2-, GST-VP16:H1[F442P]- und GST-VP16:H2[F473A,F475A,F479A]-Affinitätssäulen. Die Säulen wurden mit 100 mM KCl HEGN-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine mit 500 mM KCl eluiert. MED25 und die Mediator-Komponenten CDK8, MED15 und MED7 binden spezifisch an beide VP16-Regionen; CBP hingegen bindet nur an VP16:H2.

Anschließend erfolgte Expression der Konstrukte in einem Reticulocyt-Lysat-System. Die inkorporierte Radioaktivität ([^{35}S]-Methionin) wurde auf einem Direct Imager quantifiziert und die für die jeweiligen Experimente eingesetzte Menge der MED25-Deletionsprodukte wurde darauf standardisiert. Zunächst wurden GST-VP16:H1, GST-VP16:H2, GST-VP16:H1[F442P] und GST-VP16:H2[F473A,F475A,F479A] an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit den synthetisierten MED25-Konstrukten beladen. Die Untersuchungsergebnisse sind in Abbildung 12A rechts gezeigt. Die Konstrukte mit den Aminosäuren 1–715, 144–715, 290–715 und 389–543 interagierten mit VP16:H1 und VP16:H2. Die Bindung war spezifisch für die intakten VP16-Aktivierungsdomänen H1 und H2. Dagegen bindet aa 1–290 (nachfolgend auch als NTD bezeichnet für *N*-terminales Konstrukt) und aa 541–725 nicht an VP16. Zusammengefaßt ergibt sich, daß die ACID-Domäne (aa 389–543) allein an die H1- und H2-Region der VP16-Aktivierungsdomäne bindet. Sowohl die ACID-Domäne als auch das Konstrukt aa 290–715 weisen eine Präferenz für die Interaktion mit der VP16:H2-Region gegenüber der VP16:H1-Region auf (siehe dazu verstärkte Signalintensität Abb. 12A (rechts)). Im Gegensatz dazu interagieren die Konstrukte aa 144–715 und aa 1–715 mit VP16:H1 und VP16:H2 gleichermaßen. Dieser Befund läßt vermuten, daß ACID flankierende Regionen die Bindung an VP16 modulieren.
Die Expression im Reticulocyt-Lysat-System läßt prinzipiell die Frage offen, ob MED25 mit Hilfe anderer Mediatorproteine an VP16 bindet. Zur Klärung dieses Aspekts wurde MED25 in *E. coli* exprimiert und die Bindung an VP16 überprüft. Als Vergleich diente HeLa-Kernextrakt sowie immunoaffinitätsgereinigter, peptideluierter MED25-Mediator. Die Charakterisierung der gebundenen Proteine mit Western-Blot ist in Abb. 12B gezeigt. Mediator wurde durch die Untereinheiten CDK8, MED15 und MED7 nachgewiesen. *E. coli* exprimiertes MED25 bindet spezifisch an VP16:H1 und VP16:H2. In der Tat konnte kein Unterschied zwischen gereinigtem MED25 und Mediator festgestellt werden. Die Bindung von CBP an VP16:H2 bestätigte die Spezifität der Interaktionen.

4.4.3 Die *N*-terminale Region von MED25, welche die VWA-Domäne enthält, bindet Mediator

Zur Identifizierung der an den humanen Mediator bindenden Region in MED25 wurden ACID (aa 389–543), NTD (aa 1–290) und Vollänge MED25 verglichen. NTD,

besitzt neben der VWA-Domäne noch weitere Aminosäurebereiche am *N*-Terminus von MED25. Die Reticulocyten-Lysate (s. Abschn. 4.4.2) wurden zusätzlich mit HeLa-Kernextrakt als Quelle für den Mediator versetzt und anschließend mit einem monoklonalen Antikörper (6C9) gegen die Mediator-Untereinheit MED15 immunopräzipitiert. Die an den Mediator-Komplex bindenden MED25-Deletionskonstrukte wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Vollänge MED25 und NTD copräzipitieren mit MED15, nicht aber ACID (Abb. 13A). Offensichtlich bindet die *N*-terminale Region an Mediator. Weitere Deletionsanalysen zeigten, daß die konservierte Region (aa 17–226) für die Bindung an Mediator ausreicht (Mittler et al., 2003). Die durchgeführte experimentelle Verfahrensweise der Umsetzung von MED25 mit dem Mediator und die nachgewiesenen Bindungsverhältnisse sind in Abb. 13B vereinfacht dargestellt.

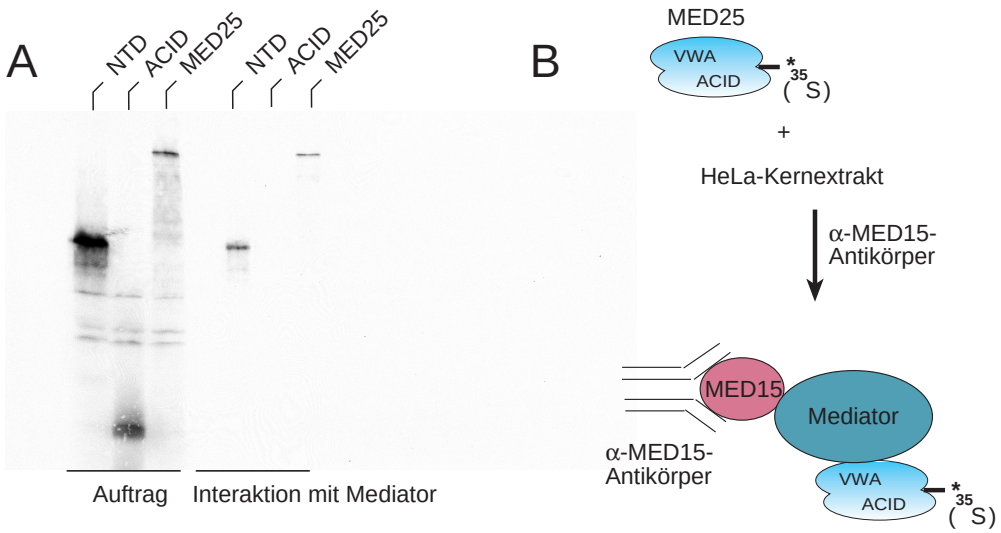


Abbildung 13: Bestimmung der Interaktionsregion von MED25 an den humanen Mediator. (A) Autoradiographie der MED25-Deletionskonstrukte. [^{35}S]-MED25-Deletionskonstrukte wurden in einem Reticulocyt-Lysat-System exprimiert und jeweils mit HeLa-Kernextrakt inkubiert. Die Proteinfraktionen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Mediator-Untereinheit MED15 immunoaffinitätsgereinigt, die Eluate über SDS-PAGE aufgetrennt und ein Film exponiert. (B) Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise im Fall von MED25 und vereinfachte Darstellung der Bindungsverhältnisse zwischen MED25 und Mediator.

4.4.4 MED25 ist kritisch für die Aktivierung von VP16 *in vivo*.

Die nächste Frage war, ob MED25 die Aktivierung von VP16 beeinflußt. Es wurden MED25-Deletionskonstrukte in eukaryontische Expressionsvektoren kloniert (vgl. Beschreibung der Vektoren in Abschn. 4.4.2). Diese enthielten FLAG-tag und zusätzlich das Kernlokalisationssignal NLS. Es handelte sich um aa 389–543 (ACID-Domäne), aa 144–715 (enthält die ACID-Domäne und Teile der VWA-Domäne), aa 290–715 (beinhaltet die ACID-Domäne) und die Vollänge. Weiterhin wurde das Konstrukt aa 1–290, das die VWA-Domäne enthält, sowohl aus humaner (NTD) als auch aus muriner DNA (mNTD) hergestellt. Das Expressionsverhalten aller Konstrukte wurde in 293T-Zellen untersucht und die für die folgenden Transfektionsexperimente eingesetzte Menge DNA wurde darauf standardisiert (Daten nicht gezeigt). Die ACID-Domäne erwies sich in Zellen als instabil und konnte daher nicht analysiert werden (Daten nicht gezeigt). Zur Untersuchung des Einflusses der Deletionskonstrukte auf die Aktivierung von VP16 wurden diese jeweils zusammen mit GAL4-VP16:H1 und Reporter in Jurkat-Zellen cotransfiziert. Der experimentelle Vergleich der Vollänge von MED25 mit den Deletionskonstrukten (aa 1–290, aa 144–715 und aa 290–715) zeigte, daß MED25 die Aktivität von VP16:H1 nur wenig inhibiert. Deutliche Inhibierung von VP16:H1 wurde indessen bei den eingesetzten Deletionskonstrukten sichtbar (Abb. 14A).

In weiteren Untersuchungen kam auch mNTD anstelle von NTD zum Einsatz. Dazu wurde mNTD zusammen mit Reporter und GAL4-VP16:H1, GAL4-VP16:H2 bzw. GAL4-VP16:AD in Jurkat-Zellen exprimiert. Auch mNTD inhibiert die Aktivierung von VP16:H1, VP16:H2 und VP16:AD stark und zwar bei GAL4-VP16:H1 etwa 9-fach, bei GAL4-VP16:H2 etwa 10-fach und bei GAL4-VP16:AD etwa 4-fach (Abb. 14B). Der vergleichsweise stark dominant negative Effekt des eingesetzten murinen NTD im Vergleich zum humanen Konstrukt läßt sich mit der dreifach höheren Expression in Säugerzellen erklären (Daten nicht gezeigt).

Die funktionellen Untersuchungen zeigten, daß MED25 kritisch für die Funktion von VP16 in Zellen ist.

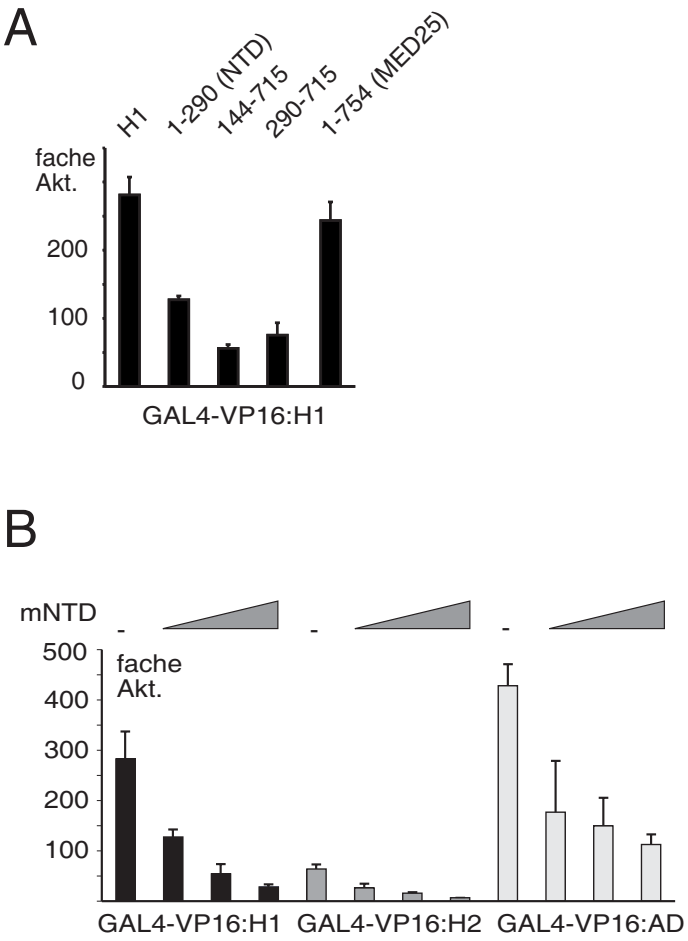


Abbildung 14: MED25-Deletionskonstrukte inhibieren die Aktivierung von VP16 *in vivo*. (A) Transfektion der MED25-Deletionskonstrukte mit den Aminosäuren aa 1–290, aa 144–715, aa 290–715 und der Vollänge von MED25 (1–754) zusammen mit 0,5 μg GAL4-VP16:H1 und 10 μg Reporterplasmid pGLMRG5 in Jurkat-Zellen. Die Menge der transfizierten MED25-Deletionskonstrukte wurde auf die Expression in 293T-Zellen standardisiert. Dabei wurden 2 μg DNA für NTD (aa 1–290) transfiziert. Die Zahlen entsprechen relativen Luciferase-Aktivitäten. (B) Transfektion von 0,5 μg, 4 μg, bzw. 10 μg mNTD zusammen mit 1 μg Reporter pGLMRG5 und 0,05 μg GAL4-VP16:H1, GAL4-VP16:H2 bzw. GAL4-VP16:AD in SW13-Zellen. mNTD erwies sich als dominant negativ für die Aktivierung von VP16.

4.4.5 Die Funktion von MED25 *in vivo* korreliert mit dem Verlust von endogenem MED25 aus Mediator

Die vorherigen funktionellen Studien zeigten, daß die Mediator-bindende VWA-Domäne VP16 inhibiert. Es galt nun zu klären, ob die VWA-Domäne endogenes MED25 aus dem Mediator verdrängt. Dazu wurde Extrakt aus mit mNTD transfizierten Zellen gewonnen. Die Kernextrakte wurden anschließend mit einem Antikörper gegen MED15 immunoaffinitätsgereinigt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Die Charakterisierung erfolgte mit MED7- (stellvertretend für den Mediator) und mit MED25-Antikörpern, die den *N*-Terminus erkennen. Tatsächlich copräzipitiert mNTD mit Mediator (Abb. 15, vgl. Spur 2 mit 4). MED25 wird teilweise verdrängt. In Kontrollextrakten tritt die NTD-Bande nicht auf (Abb. 15, vgl. Spur 1 mit 3). Die Aufnahme von NTD in den Mediator-Komplex korreliert mit der Abnahme der Aktivierung von VP16. Dies läßt vermuten, daß Mediator für VP16 limitierend wird, weil NTD die Region für die Bindung an VP16 fehlt.

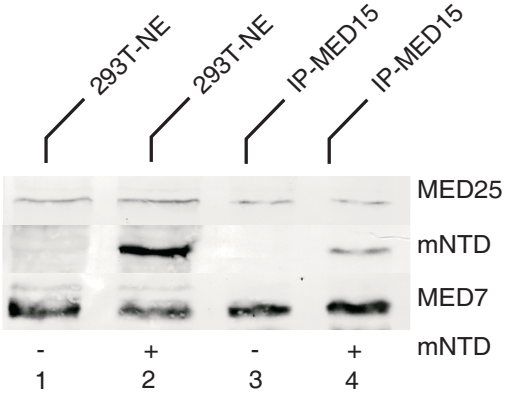


Abbildung 15: NTD bindet an Mediator *in vivo*. Western-Blot-Analyse von Kernextrakten aus mNTD-transfizierten (2 μg DNA) bzw. untransfizierten 293T-Zellen nach Immunoaffinitätsreinigung mit einem Antikörper gegen die Mediator-Untereinheit MED15. MED7 diente als Referenz für Mediator.

4.4.6 MED25 zeigt wenig Einfluß auf die basale Transkriptionsrate der RNA-Polymerase II

Mediator unterstützt die aktivierte und die basale Transkription (Mittler et al., 2001; Baek et al., 2002). Eine Rolle der Mediator-Untereinheit MED25 blieb nachzuweisen. Dazu wurde die Wirkung des mNTD auf basalen pGL2-Luciferase-Reportern (pGL2-basal, Fa. Promega) getestet, welche keine definierten Promotor-Sequenzen enthalten. Als weitere Kontrolle diente der pGLMRG5-Reporter, ein synthetischer Promotor, der basale HIV- und ML-Sequenzen zusammenfaßt. Die Transkriptionsrate des pGL2-Reporters wurde nicht und die von pGLMRG5 minimal beeinflußt (Abb. 16). Es ließ sich also kein Einfluß von MED25 auf die basale Transkription nachweisen.

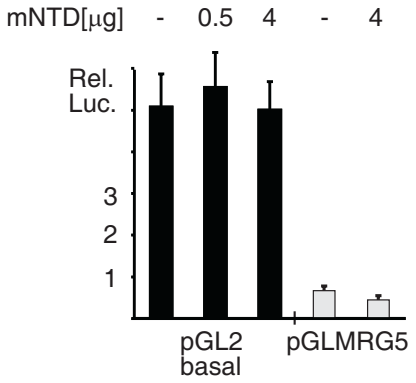


Abbildung 16: Untersuchung des Einflusses von NTD auf die basale Transkriptionsrate. Transfektion von 10 μg basalem Reporter PGL2- bzw. 10 μg pGLMRG5-Reporter zusammen mit dem im Diagramm angezeigten Mengen mNTD in Jurkat-Zellen. Die Zahlen entsprechen relativen Luciferase-Aktivitäten.

4.4.7 NTD und damit MED25 erweist sich als spezifischer Cofaktor für VP16

Von Interesse war nun, ob MED25 auch andere Gene reguliert. Es wurden zunächst im Labor etablierte Gene untersucht, darunter Simian Virus (SV40) und das T-Zell-Rezeptor β 8.1-Gen. Es wurde der SV40-Promotor (pGL2-Promotor, Fa. Promega) alleine oder mit dem SV40-Enhancer (pGL2-Control, Fa. Promega) untersucht. Das T-Zell-Rezeptor-Gen wurde in einer minimalen Form aus Promotor (Position -42 bis

+20) und Enhancer (Position 150 bis 481) in Jurkat-Zellen eingesetzt (Halle et al., 1997). Der SP1-regulierte SV40-Promotor wurde durch Überexpression von mNTD nicht, das SV40-Promotor-Enhancer-Paar etwas beeinflußt (Abb. 17A). Anders TCRβ, auf dem keine Wirkung von mNTD auf den Enhancer feststellbar war (Abb. 17B).
Anschließend wurden verschiedene Aktivierungsdomänen, darunter der glutaminreiche Aktivator SP1 (die Aktivierung von SP1 hängt *in vitro* vom PC2/CRSP-Mediator-Komplex ab; Kretzschmar et al., 1994b; Naar et al., 1998b; Malik et al., 2000), der prolinreiche Aktivator CTF und der Estrogen-Rezeptor (ER) α eingesetzt (CTF und ERα binden den Mediator über MED1; Kang et al., 2002). Es erfolgte Cotransfektion dieser Aktivatoren als Fusion mit GAL4 zusammen mit pGLMRG5-Luciferase-Reporter und mNTD. Die Aktivatoren CTF und ERα wurden kaum durch NTD reprimiert. Der Transkriptionsfaktor SP1 (dieser aktiviert die Transkription der frühen SV40 Promotoren; Dynan und Tjian, 1983) gewann leicht an Aktivierungspotential (Abb. 17C). Diese Beobachtung wurde *in vitro* bestätigt. Hierin konnte nach der Depletion von MED25-Mediator-Komplex aus Kernextrakt von Säugerzellen eine schwache Stimulation der *in vitro*-Transkription von SP1 beobachtet werden (Mittler et al., 2003). Die Ursache dieser moderaten Stimulation von SP1 durch NTD ist bisher noch ungeklärt.
Insgesamt zeigen die Untersuchungsergebnisse bisher, daß MED25 spezifisch VP16 bindet und wichtig für dessen Funktion ist.

4.4.8 MED25-Mediator-Komplex (A-Med) ist kritisch für die Aktivierung von VP16 *in vitro*, nicht jedoch generell für saure Aktivierungsdomänen

Vorkenntnisse zu A-Med im Arbeitskreis: Untersuchungen im Arbeitskreis zu MED25 hatten gezeigt (Mittler et al., 2003; Darstellung dieser Ergebnisse in Abbildung 18A und 18B), daß Depletion von HeLa-Kernextrakt mit MED25-Antikörper zu einer verminderten Transkriptionsaktivität von GAL4-VP16:AD auf dem pMRG5-Promotor (pMRG5 enthält ein Initiator-Element und eine TATA-Box) führt (Abb. 18A, Spur 1 und 2). Bei Rückgabe von Überschuß an MED25-Mediator wird verstärkte Transkriptionsaktivität beobachtet (Abb. 18A, Spur 3, 4 im Vergleich zu Spur 1). Der durch Immunoaffinitätsreinigung mit MED25-Antikörper erhaltene Mediator-Komplex (im weiteren Verlauf der Arbeit auch A-Med genannt) ist somit kritisch für die Transkriptionsaktivierung von VP16. Auch die Aktivität von GAL4-VP16:H1 ist im depletierten Extrakt deutlich reduziert (Abb. 18B, Spur 5,7). Ein Extrakt der mit einem Kontrollantikörper

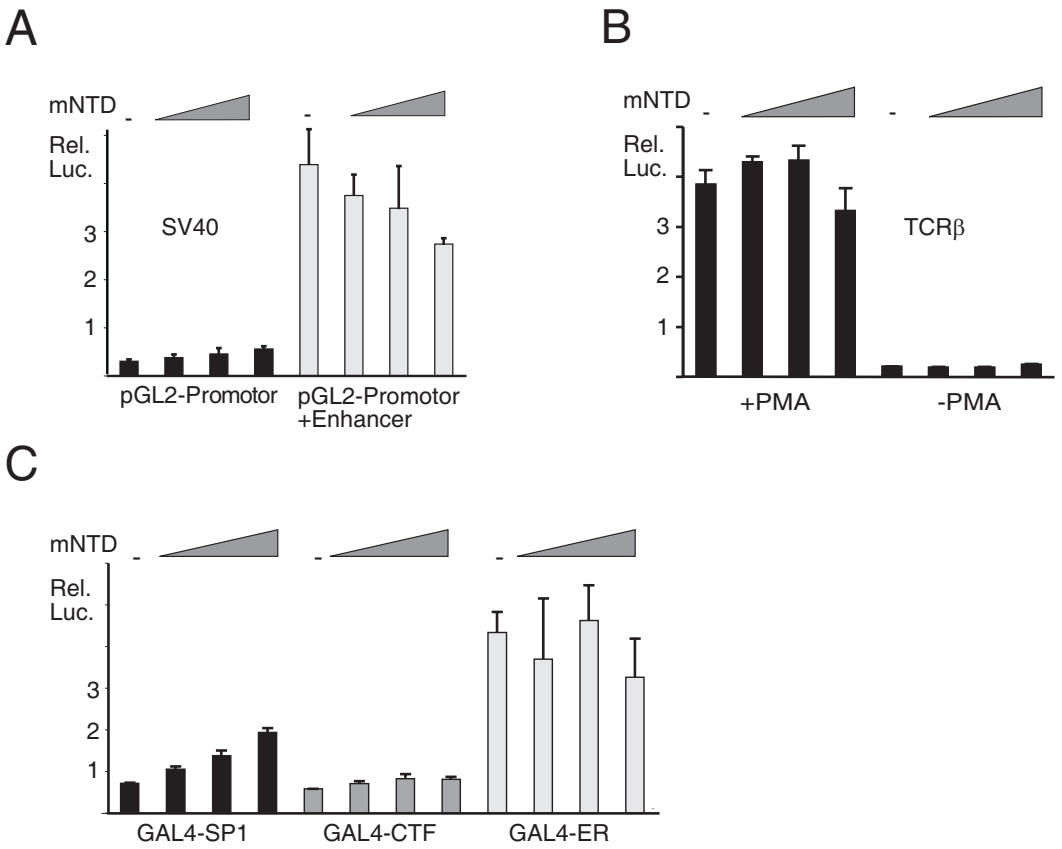


Abbildung 17: NTD und damit MED25 erweist sich als spezifischer Inhibitor für VP16. (A) Transfektion von 10 μg SV40-Promotor (SV40-Promotor, Fa. Promega) bzw. SV40 Promotor/Enhancer-Reporterplasmid (SV40-control, Fa. Promega) zusammen mit 0,5 μg, 4 μg, bzw. 10 μg mNTD in Jurkat-Zellen. Die Zahlen entsprechen rel. Luciferase-Aktivitäten. (B) Transfektion von 10 μg TCRβ-Promotor/Enhancer-Reporterplasmid zusammen mit je 0,5 μg, 4 μg, bzw. 10 μg mNTD in Jurkat-Zellen. Der Reporter enthält die Promotorsequenz (Position -42–+20) und Enhancersequenz (Position 150–481) des T-Zell-Rezeptors β 8.1 (Halle et al., 1997). Die Bestimmung der Transkriptionsrate erfolgte mit bzw. ohne Stimulation durch PMA (20 ng/ml). (C) Transfektion von 0,5 μg Aktivator GAL4-SP1, GAL4-CTF bzw. GAL4-ER und 10 μg pGLMRG5-Expressionsplasmid mit 0,5 μg, 4 μg, bzw. 10 μg mNTD in Jurkat Zellen. Der ER-Rezeptor α wurde mit Estradiol stimuliert (20 nM).

des gleichen Isotyps (IgG) depletiert war, zeigte keine Veränderung (Abb. 18B, Spur 9,10,11,12). Im Gegensatz dazu wurde der synthetische Aktivator GAL4-AH, der sowohl in *vitro* als auch in Säugerzellen aktiv ist (Ptashne und Gann, 1990), durch die Depletion von A-Med kaum beeinflußt (vgl. Abb. 18B, Spur 4,8,12). GAL4-AH wird wie SP1 durch PC2/CRSP-Mediator reguliert (Kretzschmar et al., 1994b; Naar et al.,

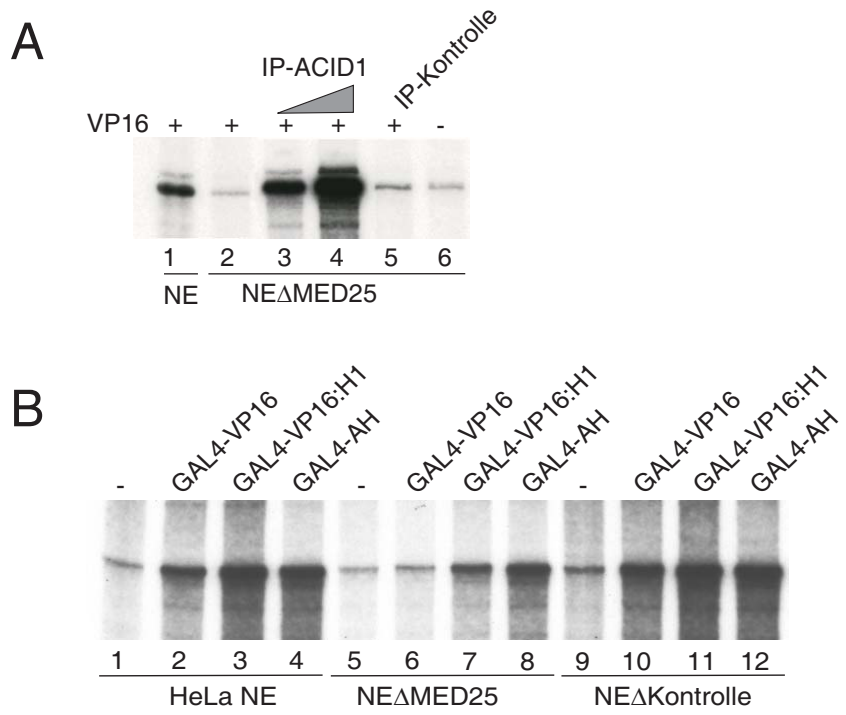


Abbildung 18: A-Med ist ein kritischer Coaktivator für VP16 *in vitro* (Untersuchungen im Arbeitskreis; Mittler et al., 2003). (A) Transkriptionsanalyse von HeLa-Kernextrakt, welcher mit einem spezifischen Antikörper gegen MED25 bzw. einem Kontroll-Antikörper des gleichen Isotyps (IgG) depletiert wurde. VP16 aktiviert nicht in A-MED-depletiertem Extrakt, hingegen steigert die Rückgabe von immunoaffinitätsgereingtem MED25 die Funktion. Die Transkriptionsanalyse wurde entsprechend dem Verfahren in Abschnitt 3.8 mit den Aktivatoren GAL4-VP16, GAL4-VP16:H1 und mit pMRG5 als Templat durchgeführt. (B) Die Depletion von A-Med beeinträchtigt die Transkriptionsaktivierung von VP16. HeLa-Kernextrakt wurde mit MED25-Antikörper bzw. mit einem Kontroll-Antikörper depletiert und die Transkriptionsreaktion mit den Aktivatoren GAL4-VP16, GAL4-VP16:H1, GAL4-AH und mit pMRG5 als Templat durchgeführt.

1998b; Malik et al., 2000). Möglicherweise unterscheidet sich diese Mediatorform von A-Med. Alternativ dazu wirken AH und SP1 durch alle Mediatorformen, auch solche, die durch MED25 nicht (oder nur teilweise) depletiert werden.

Untersuchungsergebnisse: Es stellte sich nun die Frage, ob A-Med auch andere Aktivatoren beeinflußt. Da VP16 eine saure Aktivierungsdomäne besitzt (s. auch Abschn. 1.4.2), wurden zunächst verwandte Aktivatoren für die *in vitro*-Transkription

herangezogen. Von GAL4-TA1 (Meisterernst et al., 1997), GAL4-p53 (O'Rourke et al., 1990) und GAL4-AH als Kontrolle wurde jeweils die Transkriptionsrate in HeLa-Kernextrakt (Abb. 19, Spur 1,2,3,4), A-Med-depletiertem Extrakt (Abb. 19, Spur 5,6,7,8) und Kontrollantikörper-depletiertem Extrakt (Abb. 19, Spur 9,10,11,12) unter standardisierten Bedingungen bestimmt (s. Abschn. 3.8). GAL4-AH wurde durch die Depletion von A-Med leicht stimuliert (Abb. 19, Spur 2 und 6), was frühere Beobachtungen bestätigte. Die Aktivität des Aktivators TA1 und p53 wurde durch Depletion des A-Med-Komplexes nicht beeinträchtigt (Abb. 19, Spur 7 und 8). Die Coaktivatorfunktion von A-Med scheint innerhalb dieses Spektrums spezifisch für die Aktivierung von VP16 wichtig zu sein.

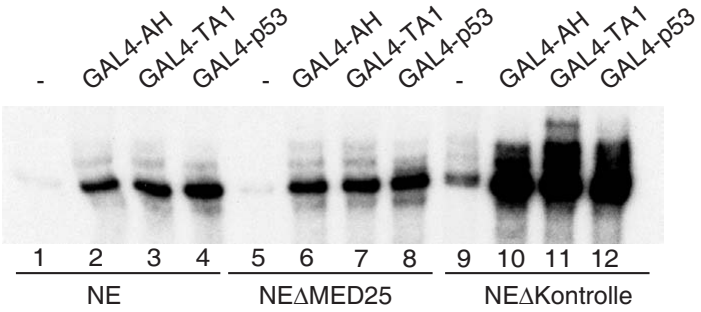


Abbildung 19: A-Med erweist sich als spezifischer Coaktivator für VP16. Transkriptionsanalyse von HeLa-Kernextrakt, A-Med-depletiertem und einem mit Kontrollantikörper (IgG) depletiertem Extrakt jeweils mit den Aktivatoren GAL4-AH, GAL4-TA1 (*C*-terminale Aktivierungsdomäne von NFκb p65) und GAL4-p53 (p53 aa 1-60) sowie pMRG5 als Templat (s. auch Abschn. 3.8)

4.4.9 MED25 ist eine substöchiometrische Komponente des Mediators

Datenbankenvergleiche von Homologen zu MED25 in anderen Organismen zeigten, daß MED25 zwar in *Drosophila* vorkommt, allerdings nicht mehr in den Nematoden und in der Hefe (Mittler et al., 2003). MED25 hat demnach eine Funktion, die nur in höheren Metazoen benötigt wird, was möglicherweise mit einem Anstieg der Komplexität der Transkriptionskontrolle in höheren Organismen zusammenhängt. Eventuell wirkt diese Mediator-Untereinheit als zusätzlicher Adapter an einen Kern-Mediator, der die basalen Funktionen ausüben kann.

Von diesen Überlegungen ausgehend wurde untersucht, in welchem stöchiometrischen Verhältnis MED25 im Vergleich zu anderen Mediator-Untereinheiten in der Zelle vorliegt. Dazu wurde zunächst HeLa-Kernextrakt über Phosphozellulose-Säule P11 chromatographisch gereinigt. Die an P11 gebundenen Proteine wurden dann in Folge mit 0,1, 0,3, 0,5 und 0,85 M KCl-Lösung eluiert und die Fraktionen jeweils mittels Western-Blot-Analyse charakterisiert. Die Elutionsprofile von MED25 und der Kern-Mediator-Untereinheit MED7 unterscheiden sich. So eluiert MED25 im Gegensatz zu MED7 bereits bei 0,1 M Salz (Abb. 20A). Um diese Beobachtungen weiter zu verfolgen, wurde HeLa-Kernextrakt mit einem monoklonalen MED25-Antikörper depletiert. Anschließend erfolgte Analyse des Durchlaufs im Western-Blot (Abb. 20B). Nur etwa 10% MED25, aber ca. 30% MED7 und 30% MED15 verblieben im Extrakt. Beide Resultate deuten darauf hin, daß MED25 nur in Teilen des Mediators vorkommt.

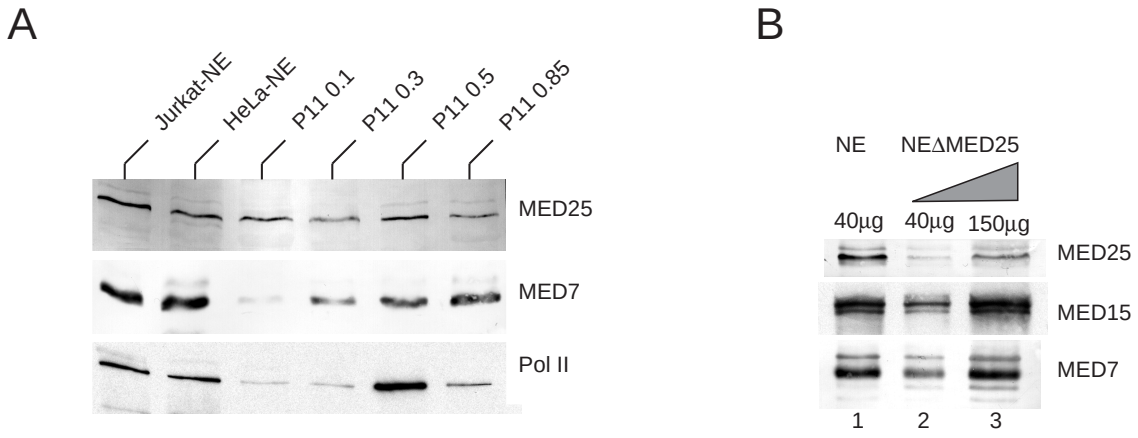


Abbildung 20: Biochemische Analyse von Mediator-Komponenten (A) Western-Blot-Analyse von über Phosphozellulose P11 gereinigtem und nachfolgend mit 0,1 M, 0,3 M, 0,5 M bzw. 0,85 M KCl eluierten HeLa-Kernextrakt. Das Elutionsprofil von P11 enthält in der 0,1 M KCl-Fraktion MED25, jedoch nur Spuren der Kern-Mediator Untereinheit MED7 (das RNA-Polymerase II-Elutionsprofil dient als Referenz). (B) Western-Blot-Analyse von HeLa-Kernextrakt nach der Depletion mit MED25-Antikörper. In Spur 1 wurden 40 μg unbehandelter Kernextrakt aufgetragen. Spur 2 enthielt 40 μg und Spur 3 150 μg des MED25-depletierten Extrakts. Bei der Depletion von MED25 verblieb ein Großteil des Mediator-Komplexes im Kernextrakt.

4.4.10 Vergleich der MED25- und MED15-assoziierten Mediator-Komplexe mittels Immunoaffinitätsreinigung

Weitere Untersuchungen zielten auf die nähere Charakterisierung des A-Med-Komplexes. Dazu wurde dieser mit dem monoklonalen Antikörper VCI gegen MED25 aus HeLa-Kernextrakt immunoaffinitätsgereinigt. Die gebundenen Proteine wurden anschließend mit einem gegen das Epitop dieses Antikörpers spezifischem Peptid eluiert und silbergefärbt (Abb. 21, Spur 1). Als Vergleich dazu wurde parallel eine weitere Immunoaffinitätsreinigung von HeLa-Kernextrakt mit dem monoklonalen Antikörper 6C9 gegen MED15 durchgeführt. Für diesen Antikörper war bekannt, daß er Mediator-Komplexe präzipitiert (Mittler et al., 2001). Die gebundenen Proteine wurden mit einem gegen das Epitop dieses Antikörpers spezifischen Peptid eluiert und anschließend silbergefärbt (Abb. 21, Spur 2). Der Vergleich der Bandenmuster der beiden Mediator-Komplexe erwies A-Med als “bona fide“-Mediator-Komplex.
Ein detaillierteres Bild zur Zusammensetzung der beiden Mediator-Komplexe erlaubte die massenspektrometrische Analyse (s. Tab. 4). Dieses analytische Verfahren (QTOF - Qstar 1, MDS-Sciex; durchgeführt von G. Mittler im CEBI - Protein Interaction Laboratory, Dänemark) zeigte die Anwesenheit nahezu aller bekannten humanen Mediator-Untereinheiten sowohl in A-Med als auch im MED25-assoziierten Mediator-Komplex.
Im MED15-Komplex fehlten MED10 und MED11. Im A-Med fehlten ebenfalls diese beiden Mediator-Untereinheiten und zusätzlich MED22. Antikörper gegen diese Untereinheiten standen zum Zeitpunkt der Durchführung noch nicht zur Verfügung. Deshalb konnte nicht geprüft werden, ob ihr Nachweis in der massenspektroskopischen Analyse nicht gelang. Insgesamt kann jedoch angenommen werden, daß der A-Med und MED25-assoziierte Mediator-Komplex nahezu identisch sind.

4.5 Interaktion des MED25- (A-Med) bzw. MED15-assoziierten Mediator-Komplexes mit Kernfaktoren

Die Analyse der Immunoaffinitätsreinigungen von Mediator mit Antikörpern gegen MED25 (VCI) bzw. MED15 (6C9) machte deutlich, daß sich A-Med und der MED15-assoziierte Mediator-Komplex stark ähneln.
Der Vergleich der Bandenmuster in der Silberfärbung zeigte aber auch weitere

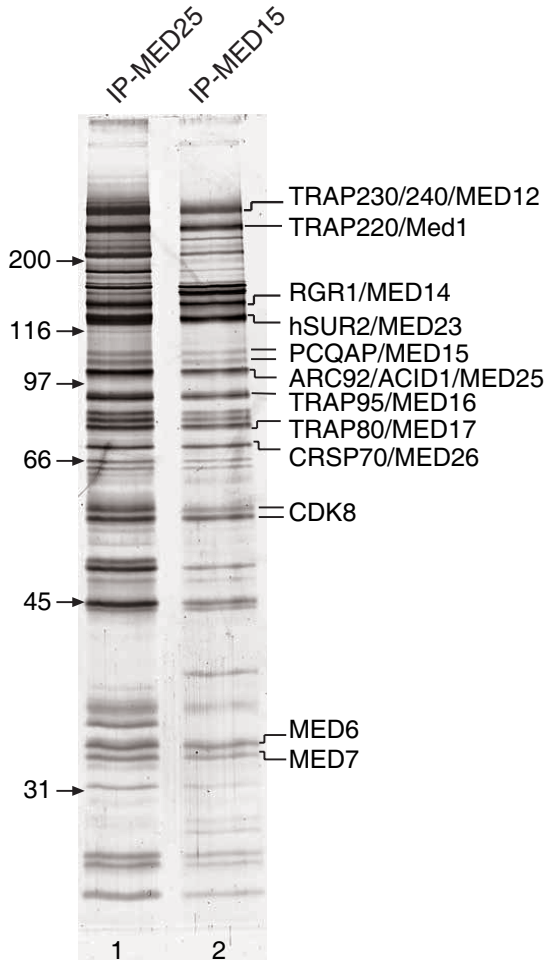


Abbildung 21: Vergleich des MED25- und MED15-assoziierten Mediator-Komplexes mittels Immunoaffinitätsreinigung. Sichtbarmachung der an den MED25- bzw. MED15-Antikörper bindenden Proteine aus HeLa-Kernextrakt durch Silberfärbung des Polyacrylamidgels. Der jeweilige Kernextrakt wurde durch Inkubation mit einer Antikörpersäule, bestehend aus Immunglobulinen des gleichen Isotyps (IgG), vorgereinigt. Die an die Antikörper bindenden Proteine wurden mit 1 M KCl gewaschen und anschließend mit spezifischen Peptiden gegen die Epitope der Antikörper eluiert (für MED25: APPQALPPVPPQYQVPGNLS; für MED15: VSQAQALPGQMLYTQPPLKF) (s. auch Abschn. 3.7.13).

Polypeptide, die spezifisch für die Antikörper waren (Abb. 21). Ein Grund dafür könnte sein, daß es sich dabei um unspezifische Wechselwirkungen mit den jeweiligen Antikörpern handelt. Denkbar wäre aber auch, daß es sich um bisher unbekannte, mit Mediator-Komplexen interagierende Kernfaktoren handelt.

Mediator-Untereinheit	**6C9-IP** MED15	**VCI-IP** MED25	**IPI**	**Swiss-Prot/ TrEMBL**	**Zahl der Peptide 6C9-IP/VCI-IP**
MED1/TRAP220	+	+	IPI00427522	Q15648	37/49
MED4/TRAP36	+	+	IPI00556494	Q9NPJ6	14/19
MED6	+	+	IPI00102495	O75586	9/17
MED7	+	+	IPI00003562	O43513	4/5
MED8	+	+	IPI00300278	Q96G25	6/8
MED9/Cse2	+	+	IPI00017552	Q9NWA0	2/3
MED10/Nut2	-	-	*	*	
MED11	-	-	*	*	
MED12/TRAP230	+	+	IPI00004068	Q93074	50/71
MED13/TRAP240	+	+	IPI00021388	Q9UHV7	65/49
MED13L/PROSIT240	+	+	IPI00400834	Q71F56	15/17
MED14/DRIP150/hRgr1	+	+	IPI00297191	O60244	56/45
MED15/PCQAP	+	+	IPI00107693	Q96RN5	14/29
MED16/TRAP95	+	+	IPI00556603	Q9Y2X0	23/31
MED17/TRAP80	+	+	IPI00301139	Q9NVC6	25/30
MED18/p28b/hSrb6	+	+	IPI00305986	Q9BUE0	4/6
MED19/LCMR1/hRox3	+	+	IPI00185518	Q8IV02	2/3
MED20/TRFP/hSrb2	+	+	IPI00174852	Q9H944	10/13
MED21/Srb7	+	+	IPI00013677	Q13503	1/1
MED22/Surf5/hSrb5	+	-	IPI00018040	Q15528	1/-
MED23/DRIP130	+	+	IPI00646226	Q5JWT3	41/46
MED24/TRAP100	+	+	IPI00219430	O75448	28/41
MED25/ACID1/ARC92	+	+	IPI00479592	Q6QMH5	11/19
MED26/CRSP70	+	+	IPI00294682	O95402	14/21
MED27/CRSP34/TRAP37	+	+	IPI00302652	Q6P2C8	19/22
MED28/FSKG20	+	+	IPI00097532	Q9H204	6/8
MED29/Intersex	+	+	IPI00032780	Q9NX70	7/10
MED30/TRAP25	+	+	IPI00063213	Q96HR3	10/12
MED31/hSoh1/CGI-125	+	+	IPI00007021	Q9Y3C7	3/3
CDK8	+	+	IPI00026791	P49336	12/13
CycC	+	+	IPI00031076	P24863	8/8

Tabelle 4: Darstellung der bekannten humanen Mediator-Untereinheiten und Vergleich mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse des Eluats der 6C9- bzw. VCI-Immunoaffinitätsreinigung. Verweise auf die zur Auswertung herangezogenen Datenbanken im Internet: für die IPI (International Protein Index): http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html. Für Swiss-Prot/TreMBL: http://www.expasy.org/sprot/. (*) in der Datenbank nicht bestimmt.

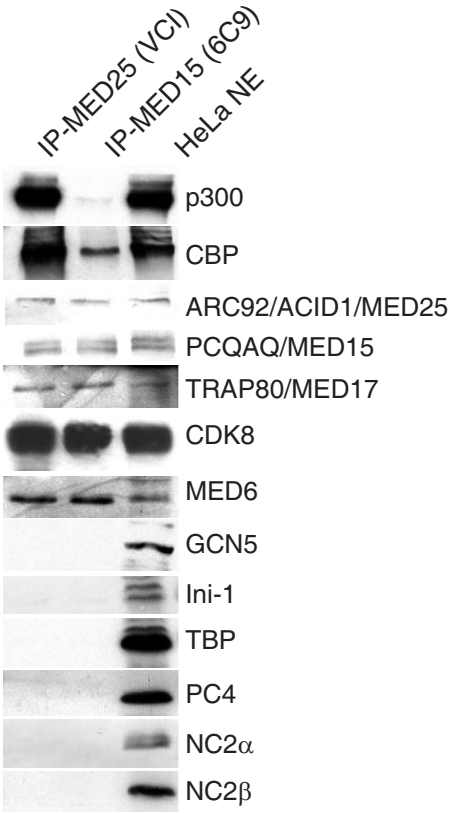


Abbildung 22: Western-Blot-Analyse von Transkriptionsfaktoren, die an den MED25- (VCI) bzw. MED15-Antikörper (6C9) binden. HeLa-Kernextrakt wurde analog zu Abschn. 4.4.10 mit dem VCI- bzw. 6C9-Antikörper immunoaffinitätsgereinigt und die gebundenen Proteine peptideluiert.

Ergebnisse der Western-Blot-Analyse: Zur näheren Bestimmung dieser Proteine wurden die Eluate der beiden Antikörper zunächst mittels Western-Blot-Analyse näher charakterisiert. In beiden Mediator-Komplexen (Abb. 22) konnten die Mediator-Untereinheiten MED6 und MED15, MED17, MED25 und CDK8 nachgewiesen werden. TBP, PC4, NC2 und GNC5 waren abwesend. Indessen gelang der Nachweis von CBP und p300 im Eluat des VCI-Antikörpers. CBP konnte im Eluat des 6C9-Antikörpers ebenfalls gefunden werden; dessen Anwesenheit war allerdings weniger ausgeprägt.

Massenspektrometrische Untersuchungsergebnisse: In Zusammenarbeit mit G. Mittler (s. dazu auch Abschn. 4.4.10) wurden die Eluate des VCI- und 6C9-Antikörpers auch weitergehend massenspektrometrisch untersucht. In der VCI-Fraktion konnte

CBP und p300 detektiert werden. Wie in der Immunoaffinitätsreinigung konnte p300 massenspektrometrisch nicht gefunden werden. Allerdings wurde auch CBP nicht detektiert. Im Massenspektrum konnten weitere Mediator- und/oder MED15- bzw. MED25-assoziierte Proteine gefunden werden. Bei beiden Immunoaffinitätsreinigungen auftretende Proteine sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Die Tabelle 6 bzw. 7 enthält die Proteine, die nur im Eluat des 6C9-Antikörpers bzw. im Eluat des VCI-Antikörpers zu finden waren.

Im Einklang mit früheren Studien (Maldonado et al., 1996; Liu et al., 2001a; Mittler et al., 2001) finden sich in beiden Mediatorfraktionen Komponenten der RNA-Polymerase II (Abb. 5). Es sind dies die Untereinheiten Rpb1, -2, -3, -5. Zusätzlich konnte auch noch Rpb7 in der 6C9-Fraktion nachgewiesen werden (Tab. 6).

Weiterhin wurde im Massenspektrum der VCI-Fraktion auch Brd4 (“bromodomain containing protein 4“) gefunden. Von diesem ist bekannt, daß es acetyliertes Chromatin bindet (Tab. 7). Es ist gezeigt worden, daß Brd4 für die Rekrutierung des Elongationsfaktors P-TEFb an den Promotor benötigt wird. Weiterhin vermittelt Brd4 auch die Interaktion von P-TEFb mit Mediator (Yang et al., 2005).

Aus der Fülle der massenspektrometrisch beobachteten Proteine in Tabelle 5, 6 und 7 sollen hier nur einzelne Proteine aus Tabelle 5 angesprochen werden, und zwar solche, die in beiden Mediator-Fraktionen gleichermaßen nachgewiesen wurden. Diese sollten besonders gute Kandidaten für physiologisch relevante interagierende Kernfaktoren sein.

Es handelt sich dabei um die Transkriptionsfaktoren AP-2, das Zink-Finger Protein ubi-d4, den Transkriptionsfaktor FBP1 (“far upstream element binding protein 1“), den Elongationsfaktor EF1-α1 und zwei Untereinheiten (160 kDa und 25 kDa) von CPSF (“cleavage and polyadenylation specificity factor“). Weitere Faktoren, die zusammen mit beiden Mediator-Komplexen präzipitierten, waren NuMa und Proteine aus der Klasse der Heat-Shock-Proteine (HSP70 (Protein 5), HSP70 (Protein 9), HSP60). Zusätzlich fanden sich Vertreter der Proteine der hnRNP-Familie (A1, A/B, A2B1, D-like, K, M) (“heterogeneous nuclear ribonucleoprotein“) und Vertreter der snRNP-Familie (U1) (“small nuclear ribonucleoprotein“). Von letzteren ist bekannt, daß sie in der Zelle verschiedenste Funktionen bei der RNA-Regulation übernehmen (Übersichtsartikel: Hirose und Manley, 2000).

Weiterhin konnte auch eine Reihe von Komponenten des Swi/Snf-Komplexes

(Actin, Brg-1, Brm, BAF47, BAF53a, BAF57, BAF60A, BAF155, BAF170, BAF250a, BAF250b) nachgewiesen werden. Dieser ist an der Umwandlung des Chromatins beteiligt (Übersichtsartikel: Sudarsanam und Winston, 2000).
Diese massenspektrometrischen Ergebnisse der Eluate des VCI- und des 6C9-Antikörpers geben Anlaß zur Vermutung, daß Mediator andere, noch unbekannte, Interaktionen eingehen kann.

Kernfaktoren in den Eluaten von beiden Immunoaffinitätsreinigungen	**IPI**	**Swiss-Prot/ TrEMBL**	**Zahl der Peptide 6C9-IP/VCI-IP**
CPSF			
CPSF1 - cleavage and polyadenylation specificity factor 160 kDa subunit	IPI00026219	Q10570	4/4
CPSF5 - cleavage and polyadenylation specificity factor 25 KDa subunit	IPI00646917	O43809	2/4
RNA-Polymerase II			
Rpb1 - DNA-directed RNA polymerase II largest subunit	IPI00031627	A6NN93	19/3
Rpb2 - DNA-directed RNA polymerase II 140 kDa polypeptide	IPI00027808	P30876	10/1
Rpb3 - DNA-directed RNA polymerase II 33 kDa polypeptide	IPI00018288	P19387	2/3
Rpb5 - DNA-directed RNA polymerase II 23 kDa polypeptide	IPI00291093	P19388	7/7
hnRNP-Familie			
hnRNP A/B	IPI00334587	Q99729	3/4
hnRNP A2B1	IPI00396378	P22626	4/12
hnRNP D-like	IPI00011274	O14979	4/3
hnRNP K	IPI00216049	P61978	6/6
hnRNP M	IPI00171903	P52272	6/18
isoform A1/B of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HDP)	IPI00215965	P09651	3/4
snRNP-Familie			
U1 snRNP A	IPI00012382	P09012	9/1
Swi/Snf-Komplexe			
Actin,	IPI00021439	P60709	19/30
Brg-1	IPI00029822	Q9HBD4	42/66
Brm	IPI00386718	Q5T4E0	18/28
BAF47/hSnf5/Ini1	IPI00029695	Q12824	15/23
BAF53a/hArpN beta	IPI00003627	O96019	18/29
BAF57	IPI00017669	Q969G3	16/24
BAF60A/Swp73-like protein	IPI00062599	EAW58125^{+}	30/21
BAF155	IPI00797830	Q58EY4	48/52
BAF170	IPI00216047	Q8TAQ2	24/52
BAF250a	IPI00643722	O14497	27/31
BAF250b	IPI00302835	Q8NFD5	12/8

Kernfaktoren in den Eluaten von beiden Immunoaffinitätsreinigungen (Fortsetzung)	**IPI**	**Swiss-Prot/ TrEMBL**	**Zahl der Peptide 6C9-IP/VCI-IP**
AP-2 - activating enhancer binding protein 2 alpha	IPI00181288	Q8N1C6	8
EF1-α1 - elongation factor 1-alpha 1	IPI00396485	P68104	9/12
FBP1 - far upstream element binding protein 1	IPI00375441	Q96AE4	6/11
Hsp70 protein 5 - 78 kDa glucose-regulated protein precursor	IPI00003362	P11021	27/20
Hsp70 protein 9 - stress-70 kDA protein, mitochondrial precursor	IPI00007765	P38646	31/39
Hsp60 - 60 kDA heat shock protein, mitochondrial precursor	IPI00784154	P10809	22/19
NuMA - nuclear mitotic apparatus protein 1	IPI00006196	Q14980	7/5
ubi-d4, zinc-finger protein	IPI00023322	Q92785	11/18

Tabelle 5: Zusammenfassung der massenspektrometrischen Ergebnisse zu den Kernfaktoren, die sowohl in der VCI- als auch in der 6C9-Fraktion nachgewiesen werden konnten. Verweise auf die zur Auswertung herangezogenen Datenbanken im Internet: für die IPI (International Protein Index): http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html. Für Swiss-Prot/TreMBL: http://www.expasy.org/sprot/. Für NCBI (+): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez

Kernfaktoren im Eluat der MED15-Immunoaffinitätsreinigung	IPI	Swiss-Prot/ TrEMBL	Zahl der Peptide
hnRNP-Familie			
hnRNP D0	IPI00028888	Q14103	4
hnRNP H	IPI00013881	P31943	4
snRNP-Familie			
snRNP B - splice isoform SM-B' of P14678 small nuclear ribonucleoprotein associated proteins B and B'	IPI00027285	P14678	5
snRNP core protein D2	IPI00017963	P62316	3
snRNP core protein D3	IPI00017964	P62318	3
U1 snRNP B - splice isoform 2 of P08621 U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	IPI00219483	P08621	7
U2 snRNP B" - U2 small nuclear ribonucleoprotein B"	IPI00029267.1	P08579	4
RNA-Polymerase II			
Rpb7 - DNA-directed RNA-polymerase II 19 kDa polypeptide	IPI00218895	P62487	2
Swi/Snf-Komplexe			
BAF60b	IPI00062599	EAW58125.1^{+}	29
ARID - isoform 1 of AT-rich interactive domain-containing protein 1A	IPI00643722	O14497	26
BCL7B - B-cell CLL/lymphoma 7B	IPI00550034	Q9BQE9	7
BCL9L - B-cell CLL/lymphoma 9-like	IPI00328798	Q67FY1	9
BUB1 - mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase	IPI00013467	NP_004327.1^{+}	10
BUB3 - mitotic checkpoint protein	IPI00013468	O43684	5
DDB1 - DNA damage binding protein 1	IPI00293464	Q16531	3
FBP2 - far upstream element binding protein 2	IPI00298363	Q92945	6
Golgin 45	IPI00455985	Q9H2G9	11
GSCR1 - Glioma tumor suppressor candidate region gene 1 protein	IPI00024568	Q9NZM4	2
ILF2 - Interleukin enhancer-binding factor 2	IPI00005198	Q12905	5
NFI - nuclear factor 1	IPI00472959	Q5VW27	5
NFIA - nuclear factor 1 A-type	IPI00029745	Q12857	11
PBX2 - pre-B-cell leukemia transcription factor-2	IPI00028416	P40425	7
ROCK1 - RHO-associated protein kinase 1	IPI00022542	Q13464	5

Kernfaktoren im Eluat der MED15-Immunoaffinitätsreinigung (Fortsetzung)	**IPI**	**Swiss-Prot/ TrEMBL**	**Zahl der Peptide**
PSF - isoform of splicing factor, proline and glutamine rich	IPI00010740	P23246	5
RuvB-like 2	IPI00009104	Q9Y230	3
SEC31L1 - isoform 3 of protein transport protein SEC31A	IPI00305152	O94979	39
Synaptopodin	IPI00027258	Q8N3V7	4
TCRG1 - transcription elongation regulator 1	IPI00247871	O14776	59
TFG - putative MAPK activation protein	IPI00788849	Q7Z426	3
TNFIA - nuclear factor 1 A-type	IPI00029745	Q12857	11
TRIM11 - isoform 1 of tripartite motif-containing protein 11	IPI00219527	Q96F44	9

Tabelle 6: Zusammenfassung der massenspektrometrischen Ergebnisse zu den Kernfaktoren, die nur in der 6C9-Fraktion nachgewiesen werden konnten. Verweise auf die zur Auswertung herangezogenen Datenbanken im Internet: für die IPI (International Protein Index): http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html. Für Swiss-Prot/TreMBL: http://www.expasy.org/sprot/. Für NCBI (+): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez

Kernfaktoren im Eluat der MED25-Immunoaffinitätsreinigung	IPI	Swiss-Prot/ TrEMBL	Zahl der Peptide
CPSF			
CPSF2 - cleavage and polyadenylation specificity factor 100 kDa subunit	IPI00292928	Q9P2I0	3
CPSF3 - cleavage and polyadenylation specificity factor 73 kDa subunit	IPI00007818	Q9UKF6	3
CstF			
CstF-64 - isoform 1 of cleavage stimulation factor 64 kDa subunit	IPI00013256	P33240	4
hnRNP-Familie			
hnRNP F	IPI00003881	P52597	6
hnRNP H3	IPI00013877	P31942	4
hnRNP R	IPI00012074	O43390	3
Swi/Snf-Komplexe			
BAF200	IPI00470537	Q68CP9	4
BAF180 - Polybromo-1	IPI00301041	Q86U86	23
BAF60C	IPI00106988	Q6STE5	17
AF-10 protein	IPI00023464	P55197	3
ASH2L - isoform 1 of SET1/ASH2 histone methyltransferase complex subunit ASH2	IPI00328658	Q9UBL3	2
MARCH7 - E3 Ubiquitin-protein ligase	IPI00010195	Q9H992	4
BCL7A - B-cell CLL/lymphoma 7 protein family member A	IPI00025786	Q4VC05	8
Brd4 - Bromodomain-containing protein 4	IPI00440727	O60885	10
Brd7 - Bromodomain-containing protein 7	IPI00001707	Q9NPI1	7
Brd9 - Bromodomain-containing protein 9	IPI00549384	A6NFY8	3
CBP	IPI00023339	Q92793	36
CDK11 isoform 1 of cell division cycle 2-like protein kinase 6	IPI00250316	Q9BWU1	8
CROP - isoform 1 of cisplatin resistance-associated overexpressed protein	IPI00107745	O95232	2
DAZP1 - isoform 1 of DAZ-associated protein 1	IPI00165230	Q96EP5-1	2
DJBP - CAP-binding protein complex-interacting protein 1	IPI00009724	Q5THR3	3
DDX5 - probable ATP-dependent RNA helicase	IPI00017617	P17844	3
DOT1L - splice isoform 2 of Q8TEK3 Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific	IPI00170643	Q8TEK3	4

Kernfaktoren im Eluat der MED25-Immunoaffinitätsreinigung (Fortsetzung)	**IPI**	**Swiss-Prot/ TrEMBL**	**Zahl der Peptide**
E1A-associated protein p300	IPI00020985	Q09472	35
EF-1-gamma - elongation factor 1-gamma	IPI00000875	P26641	3
FIP1 - 3'-end-processing factor	IPI00008449	Q6UN15	4
Feminitation homolog A	IPI00064238	Q8N3V8	3
FUS - RNA-binding protein	IPI00221354	P35637	3
HCC-1 - nuclear protein	IPI00014938	P82979	2
HDAC1 - histone deacetylase 1	IPI00013774	Q13547	4
HDAC2 - histone deacetylase 2	IPI00289601	Q92769	12
Hsp90 - heat shock protein HSP 90-BETA	IPI00334775	BAB20776.1^{+}	8
jun-B - transcription factor	IPI00013439	P17275	2
jun-D - transcription factor	IPI00289547	P17535	5
KH-type splicing regulatory protein	IPI00479786	Q59EZ9	18
MRE11A - double-strand break repair protein	IPI00029159	P49959	3
MYST3 - similar to histone acetyltransferase MYST3	IPI00107282	Q8WUB8	7
NonO - non-POU domain-containing octamer-binding protein	IPI00304596	Q15233	3
Nucleolysin TIAR	IPI00291398	P31483	6
OTU domain-containing protein 6B	IPI00182180	Q8N6M0	1
PBX1A - isoform of pre-B-cell leukemia transcription factor 1	IPI00028415	P40424	3
PCBP1 - Poly(rC)-binding protein 1	IPI00016610	Q15365	2
RTP1 - receptor-transporting protein 1	IPI00168265	P59025	1
RuvB-like 2	IPI00009104	Q9Y230	11
SEC23-interacting protein	IPI00026969	Q9Y6Y8	30
SEC23B - transport protein	IPI00017376	Q15437	7
Sec24B - transport protein	IPI00030851	O95487	5
SFPQ - splicing factor, proline-and glutamine-rich	IPI00010740	P23246	6

Kernfaktoren im Eluat der MED25-Immunoaffinitätsreinigung (Fortsetzung)	**IPI**	**Swiss-Prot/ TrEMBL**	**Zahl der Peptide**
TAF9	IPI00002993	Q16594	4
TIA-1 related protein isoform 2	IPI00644708	XP_001367857.1+	14
TCRG1 - transcription elongation regulator 1	IPI00247871	O14776	3
TDP-43 - TAR DNA-binding protein-43	IPI00025815	Q13148	2
clone TCBAP0758 MRNA sequence	IPI00163419	Q9HB34	13
hypothetical protein LOC140699 ISOFORM 3	IPI00220372	Q9H579-1	4
LOC126353 protein	IPI00217121	Q8IVT2	14
uncharacterized protein C14ORF43	IPI00784739	Q6PJG2	38

Tabelle 7: Zusammenfassung der massenspektrometrischen Ergebnisse zu den Kernfaktoren, die nur in der VCI-Fraktion nachgewiesen werden konnten. Verweise auf die zur Auswertung herangezogenen Datenbanken im Internet: für die IPI (International Protein Index): http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html. Für Swiss-Prot/TreMBL: http://www.expasy.org/sprot/. Für NCBI (+): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez

5 Diskussion

5.1 Die H1- und H2-Region der VP16-Aktivierungsdomäne stimulieren die Transkription über unterschiedliche molekulare Mechanismen

VP16:H1 und VP16:H2 unterscheiden sich in ihrer Bindungsspezifität gegenüber CBP: Der Aktivator VP16 des Herpes simplex Virus dient seit mehr als zwei Jahrzehnten als Modell für Transkriptionskontrolle. VP16 funktioniert von der Hefe bis zu menschlichen Zellen über seine kompakte Aktivierungsdomäne mit 79 Aminosäuren (Triezenberg et al., 1988; Cress und Triezenberg, 1991; Triezenberg, 1995). Diese läßt sich weiter in die zwei Subdomänen VP16:H1 (Aminosäuren 411–452) und VP16:H2 (Aminosäuren 453–490) unterteilen (Abb. 3). Beide können für sich als eigenständige Aktivierungsdomänen *in vivo* und *in vitro* wirken (Walker et al., 1993; Ikeda et al., 2002). Die Charakterisierung von Cofaktoren, ihrer Interaktionen und Funktionen für die Transkriptionsaktivierung von VP16, ist eine Strategie, um das Verständnis zur Wirkungsweise von Aktivatoren zu erweitern.

Hier wurde das Bindungsverhalten von Cofaktoren und Cofaktor-Komplexen an die Subdomänen VP16:H1 und VP16:H2 untersucht (s. auch Abschn. 1.4.2). Zur Spezifitätskontrolle kamen Mutanten in beiden Subdomänen zum Einsatz (Abschn. 4.1). Es konnte aufgeklärt werden, daß die Histon-Acetyltransferase CBP direkt an die H2-Region, nicht aber an die H1-Region der VP16-Aktivierungsdomäne bindet (Abb. 7).

Weiterhin wurde gezeigt, daß humane Mediator-Komplexe im Kontext von Kernextrakten spezifisch an beide VP16-Subdomänen binden (Abb. 9 und 12). Dabei konnte in den Eluaten stellvertretend für das “head“-Modul des Mediators MED6, für das “middle“-Modul MED7 und MED21 sowie für das “tail“-Modul MED14 und MED15 nachgewiesen werden. Darüberhinaus waren in den Eluaten auch die Mediator-Untereinheiten MED1, MED23, MED24 und CDK8 anwesend. Für die letzten vier Untereinheiten sind verschiedene Mediator-Zustandsformen bekannt, in denen diese Proteine fehlen (Liu et al., 2001b; Stevens et al., 2002; Ito et al., 2002; Samuelsen et al., 2003; Taatjes und Tjian, 2004). Ebenso zeigte sich, daß MED25 direkt an die H1- und H2-Region der VP16-Aktivierungsdomäne bindet (Abb. 12). MED25 ist eine

neue Mediator-Untereinheit, die als solche im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert wurde (Abschn. 4.4.1). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß an VP16:H1 und VP16:H2 jeweils ein “großer“ Mediator-Komplex, wie er auch für TRAP oder ARC/CRSP anzunehmen ist, bindet. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß an VP16:H1 und VP16:H2 jeweils mehrere Mediator-Zustandsformen gebunden vorliegen.

Weiterhin erlauben die Befunde dieser Arbeit auch Aussagen zum Bindungsverhalten von Mediator an die H1- und H2-Region der VP16-Aktivierungsdomäne. Roeder und Kollegen hatten beobachtet, daß die Kern-Mediator-Untereinheit MED17 direkt an VP16:H2 nicht aber an VP16:H1 bindet (Ito et al., 1999). Eigene Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher aufgeführt sind, konnten dies bestätigten. Es ist keine andere Mediator-Untereinheit bekannt, die direkt an VP16:H1 bindet. Mediator könnte also über MED25 und MED17 mit VP16 interagieren. Allerdings zeigen die vorliegenden Daten, daß NTD dominant negativ auf die Aktivierung von VP16 in Zellen wirkt (Abb. 14). Auch kann MED25-depletierter Mediator nicht mehr an VP16 binden und dessen Aktivierung vermitteln (Abb. 18). Dies deutet eher auf eine schwache Wechselwirkung von MED17 mit VP16 hin.

Abbildung 23 veranschaulicht die Wechselwirkungen von CBP und MED25 mit VP16 sowie die Rolle von MED25 als zusätzlicher Adapter für den Mediator-Komplex; Dargestellt sind auch die anderen bisher bekannten direkten Interaktionspartner von VP16:H1 und VP16:H2.

Die Aminosäuresequenzen der VP16:H1- und VP16:H2-Domäne weisen signifikante Ähnlichkeiten auf, unterscheiden sich aber in zentralen Positionen: CBP und MED25 unterscheiden sich im Bindungsverhalten gegenüber VP16:H1 und VP16:H2. Unterschiedliche Bindungsselektivität für VP16:H1 bzw. VP16:H2 wurde in der Literatur auch bei anderen Interaktoren beobachtet (s. dazu Abb. 23). Dies wirft die Frage auf, wie diese Bindungsspezifität zustande kommt.

Mutationsstudien weisen darauf hin, daß bestimmte saure und hydrophobe Aminosäuren in den beiden VP16-Subdomänen eine Schlüsselrolle übernehmen (Cress und Triezenberg, 1991; Regier et al., 1993; Sullivan, 1998). Schlüsselfunktionen kommen Phenylalanin, Leucin und Glutaminsäure zu, und zwar in den Positionen L439, L444 und F442 (VP16:H1) und F473, F475, F476 und E479 (VP16:H2) (s. auch Abb. 3).

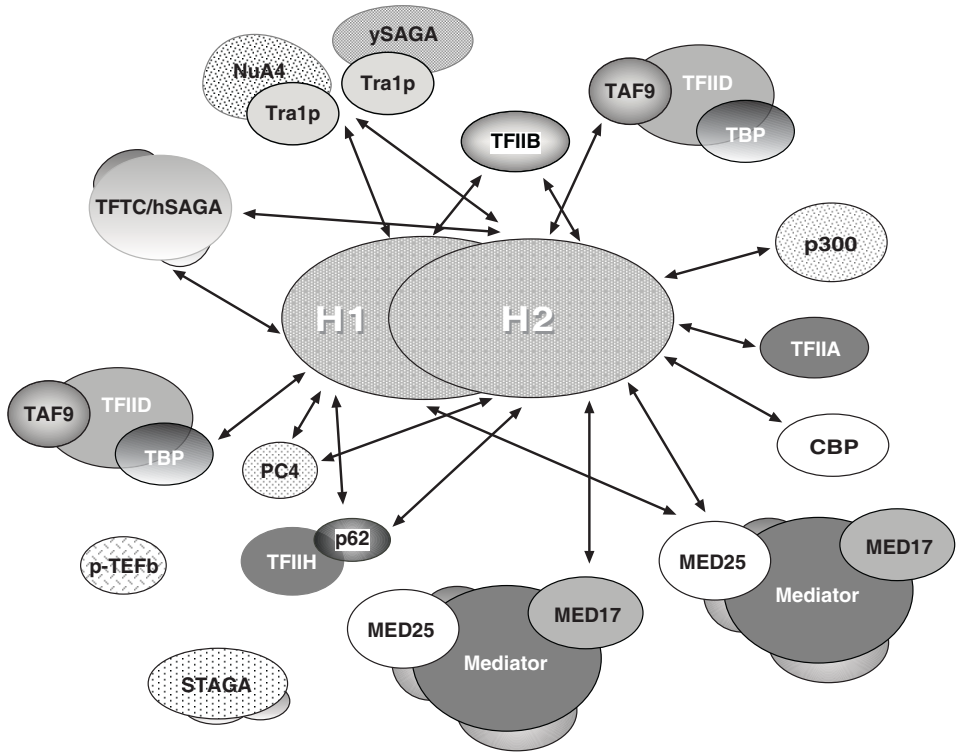


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Interaktoren von VP16 durch die Subdomänen H1 und H2. Direkte Wechselwirkungen der Interaktoren mit den beiden Subdomänen sind durch Doppelpfeile gekennzeichnet. Die Interaktionen beruhen auf Daten, die im Säugersystem und in der Bäckerhefe erstellt wurden. TFIIA (Kobayashi et al., 1995); TFIIB (Jonker et al., 2005); p62/TFIIH (Xiao et al., 1994); TFIID (Uesugi et al., 1997; Klemm et al., 1995); TAF9 (Uesugi et al., 1997); TBP (Nedialkov und Triezenberg, 2004); PC4 (Kretzschmar et al., 1994a); p300 (Kraus et al., 1999); TFTC-Komplex (Hardy et al., 2002); SAGA (Utley et al., 1998); Tra-1 (Brown et al., 2001); MED17 (Ito et al., 1999); Für STAGA (Martinez et al., 2001) und p-TEFb (Kurosu und Peterlin, 2004) ist die Interaktion mit VP16:AD nachgewiesen, ihre Bindung an die beiden Subdomänen jedoch nicht weiter präzisiert.

Unsere Untersuchungen bestätigten die Bedeutung der hydrophoben Phenylalanine. Sowohl die Mutation F442P in der VP16:H1-Region, als auch die Dreifachmutation F473A, F475A, F479A in der VP16:H2-Region heben die Bindung von CBP und MED25 mit den beiden VP16-Subdomänen auf (Abschn. 4) und erweisen sich für deren Funktion als essentiell.

Berücksichtigt man weitere Literaturdaten, wird eine noch differenziertere Betrachtung der Bedeutung der Phenylalanine für die jeweilige Funktion der beiden

VP16-Subdomänen möglich. So stimulierte nach Seipel ein Konstrukt, das zwei Kopien eines 11-Aminosäure-Fragments aus VP16:H1 in Tandem-Anordnung (DALDDFDLDML, Aminosäuren 437–447) enthält, die Transkription in Säugerzellen nahezu mit der gleichen Effizienz wie VP16:AD (Seipel et al., 1992). Auch die artifiziellen Multimere der Sequenzen DDFDL und DDLDL erwiesen sich als sehr aktiv. Andererseits war das artifizielle Multimer von DDL inaktiv (Seipel et al., 1994). Diese Befunde verdeutlichen, daß das aliphatische Leucin das hydrophobe Phenylalanin in der Aktivierungsdomäne ersetzen kann. Andererseits führt Austausch von Phenylalanin gegen Leucin in Position 442 (VP16:H1) zu einer dramatischen Verminderung der Aktivität (Regier et al., 1993). Phenylalanin 442 muß daher eine wichtige strukturelle Funktion zukommen. Weiterhin ist auch erkennbar, daß bestimmte Muster aus sauren oder polaren und hydrophoben Aminosäuren eine wesentliche Rolle spielen.
Der Vergleich der Primärsequenz von VP16:H1 und VP16:H2 (Abb. 24) weist Gemeinsamkeiten in dem diskutierten DALDDFDLDML-Muster auf. Ihm entspricht die Region LDMADFEFEQMF in VP16:H2. Auch in VP16:H2 kommen den Phenylalaninen Schlüsselpositionen zu. So befinden sich Phenylalanin F473 in der Position von F442 und F475 in der Position von L444. Andererseits fallen Unterschiede zwischen den beiden Domänen auf. So besitzt VP16:H1 in zentralen Positionen zwei Leucine (L444 und L447) und VP16:H2 andererseits zwei Phenylalanine (F475 und F479).

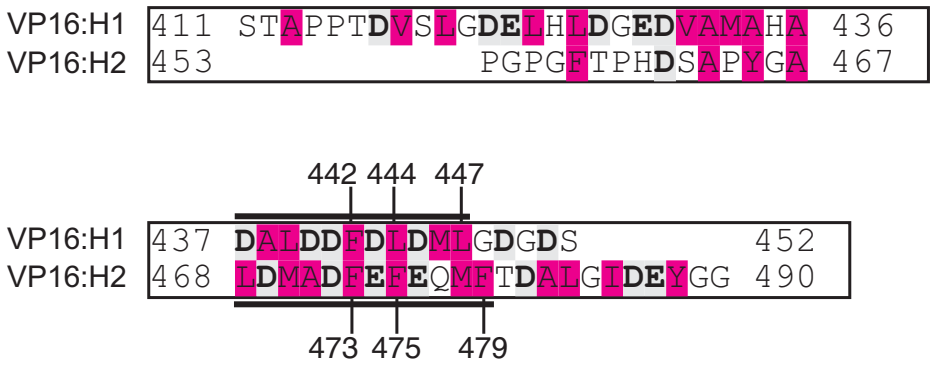


Abbildung 24: Vergleich der Aminosäuresequenzen von VP16:H1 und VP16:H2; Hydrophobe Aminosäuren sind dunkel markiert und saure Aminosäuren fett gedruckt. Die Positionen der für die Funktion der jeweiligen Domänen wichtigen Aminosäuren Phenylalanin und Leucin sind angegeben.

Dieser Vergleich der Position von Phenylalanin und Leucin in den beiden Subdomänen erlaubt auch Aussagen zum Interaktionsverhalten der beiden Subdomänen mit CBP. Die hier beobachtete Spezifität von CBP für VP16:H2 könnte zum Beispiel durch die Phenylalanine in Position F475 oder in Position F479 vermittelt werden. Diese Annahmen könnten durchaus auch für MED17 zutreffen, da dessen Bindung an VP16:H2 ebenfalls durch die Dreifachmutation F473A, F475A, F479A aufgehoben wird (Daten nicht gezeigt). Die Domänen unterscheiden sich aber weiter in flankierenden Regionen, wobei deren Beteiligung zur Zeit offen ist (vgl. Abb 24).

Die VP16:H1- und VP16:H2-Domänen funktionieren über verschiedene Aktivierungswege: Auch funktionelle Studien liefern Hinweise auf unterschiedliche Aktivierungswege der VP16-Subdomänen. Während VP16:H1 die Transkription in einem "groben" *in vitro*-Kernextrakt-System auf "nackten" DNA-Templaten stark aktiviert, ist VP16:H2 in diesem System nur in Kombination mit einem Chromatin-Reporter und Acetyl-CoA voll aktiv (Ikeda et al., 2002). Dies könnte durch p300 vermittelt werden, welches die Aktivierung von VP16:H2 auf Chromatin-Templaten in *in vitro*-Transkriptionssystemen fördert (Kraus et al., 1999; Kundu et al., 2000).
Weiterführende Ergebnisse werden aus systematischen Gründen im Zusammenhang mit CBP (Abschn. 5.2), MED25 (Abschn. 5.4) bzw. dem MED25-Mediator-Komplex (A-Med) (Abschn. 5.5) erst im folgenden Teil der Arbeit näher diskutiert. Aus diesen ergeben sich zusätzliche Gesichtspunkte, welche die unterschiedliche Funktionsweise von VP16:H1 und VP16:H2 bestätigen.

5.2 CBP ist ein bedeutender Cofaktor für die Aktivierung von VP16:H2

Spezifisches Interaktionsverhalten von CBP mit VP16:H2: Die Histon-Acetyltransferase CBP besitzt mehrere konservierte Domänen. Dabei handelt es sich um eine "CREB binding domain" (KIX) (Lundblad et al., 1995; Radhakrishnan et al., 1999), eine "nuclear receptor interacting domain" (RID) (Chakravarti et al., 1996; Kamei et al., 1996), eine Glutamin-Prolin-reiche-Domäne (QD) (Fontes et al., 1999), eine Bromo-Domäne und drei Cystein-Histidin-reiche Domänen (CH1, CH2 und CH3)

(Eckner et al., 1994)(s. auch Abb. 7A). Die Domänen vermitteln Cofaktorfunktion von CBP und steuern die Acetylierung von Histonen (Übersichtsartikel: Yuan und Giordano, 2002). Verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. Ets-1 binden CBP-Domänen und rekrutieren dieses an DNA (Übersichtsartikel: Yuan und Giordano, 2002).
Mittels Deletionsstudien konnte die Bindung an VP16:H2 charakterisiert werden. Die Bindung erfolgt über zwei voneinander unabhängige Regionen in der aminoterminalen- (aa 100–461) und in der carboxyterminalen-Region (aa 1758–1892) (s. Abb. 7), welche die CH1- (aa 362–429) und CH3-Domäne (aa 1676–1849) einschließen. Die beiden Domänen besitzen homologe Strukturen (Yu et al., 2001). Sie zeigen triangulare Geometrie, die aus vier α-Helices aufgebaut ist und drei Koordinationszentren für Zn^{2+} enthält. Möglicherweise erfolgt die Bindung ähnlich zu HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1α), das die CH1-Domäne des zu CBP paralogen Proteins p300 bindet. NMR-Strukturuntersuchungen zeigen, daß CH1 als Gerüst für die Faltung der *C*-terminalen Aktivierungsdomäne von HIF-1 dient (Freedman et al., 2002; Dames et al., 2002). Diese bindet ähnlich einer Klammer, wobei die Bindung überwiegend durch hydrophobe, aber auch durch polare Interaktionen stabilisiert wird. Es bleibt allerdings unklar, ob beide Bindungsregionen in CBP gleichzeitig an VP16:H2 binden können. Dies ist nicht auszuschließen. Für p53 konnte gezeigt werden, daß dieses gleichzeitig an vier unterschiedliche Domänen von p300 (CH1, CH2, KIX und IBiD) binden kann (Teufel et al., 2007).

Die Rolle von CBP bei der Aktivierung von VP16:H2: Für den molekularen Ablauf der Aktivierung von VP16:AD sind im Hinblick auf die Interaktion mit CBP verschiedene Mechanismen denkbar. Im Einklang mit der Transkriptionsaktivierung auf Chromatin-Templaten (Kraus et al., 1999; Ikeda et al., 2002) steht die Histon-Acetyltransferaseaktivität von CBP und p300 (Bannister und Kouzarides, 1995; Ogryzko et al., 1996). Die Acetylierung von Nukleosomen in der Promotorregion eines Gens korreliert generell mit einer gesteigerten Transkriptionsrate (Martinez-Balbas et al., 1998; Brown et al., 2000; Sterner und Berger, 2000; Iizuka und Iizuka, 2003). Trotz der auffälligen überlappenden Funktion von CBP und p300 sprechen Gendeletionsexperimente dafür, daß beide Cofaktoren nicht redundant sind (Kawasaki et al., 1998; Yao et al., 1998; Tanaka et al., 2000; Rebel et al., 2002). Dies läßt vermuten, daß VP16:H2 in der Zelle genspezifisch entweder über CBP oder alternativ über p300 wirkt.

Einige Befunde aus der Literatur sprechen dafür, daß CBP nach der Rekrutierung durch VP16:H2 neben der Acetylierung von Chromatin auch andere Funktionen übernimmt. Hinweise darauf liefern *in vivo*-Daten zu verschiedenen “immediate early“-Genen von HSV-1. CBP wird mit GTFs und den Chromatin-Remodelling-Komponenten BRG1 und hBRM durch VP16:AD auf die jeweiligen viralen Promotoren rekrutiert (Herrera und Triezenberg, 2004). Diese Rekrutierung wird bereits in einer sehr frühen Phase nach der Infektion beobachtet. Dies geschieht, bevor diese Promotoren in Chromatin verpackt werden.
CBP kann sich selbst, Histone und auch andere Transkriptionsfaktoren acetylieren. Letzteres gilt für ACTR, EKLF, HMG I(Y), HNF4, Importin-α, p53, MyoD, Stat3, Tat, T-cell factor und mehrere Mitglieder der Smad- und SREBP-Familie (Gu und Roeder, 1997; Munshi et al., 1998; Naar et al., 1998a; Waltzer und Bienz, 1998; Zhang und Bieker, 1998; Chen et al., 1999; Bannister et al., 2000; Deng et al., 2000; Polesskaya et al., 2000; Soutoglou et al., 2000; Gronroos et al., 2002; Giandomenico et al., 2003; Wang et al., 2005b; Inoue, et al., 2006; Simonsson et al., 2006). Die Acetylierung dieser Transkriptionsfaktoren hat unterschiedliche funktionelle Konsequenzen, wie Förderung bzw. Inhibition der DNA-Bindung, Inhibierung des Kernexports, erhöhte Stabilität oder Veränderungen in Protein-Protein-Wechselwirkungen.
CBP dient auch als Gerüstkomponente in Multiprotein-Komplexen. In diesem Zusammenhang ist bekannt, daß CBP oftmals zusammen mit anderen Cofaktoren wie pCAF, SRC-1 und ACTR assoziiert vorliegt (Übersichtsartikel: Yuan und Giordano, 2002).
CBP übernimmt sehr wahrscheinlich auch Brückenfunktion zwischen Aktivatoren und der basalen Transkriptionsmaschine; Über den direkten Kontakt von CBP mit TFIIB wurde berichtet (Kwok et al., 1994).

5.3 CBP bzw. p300 interagieren mit Mediator

In Übereinstimmung mit der hier beobachteten Bindung von CBP und p300 an Mediator (Abb. 22) konnte in einem gereinigten *in vitro*-Transkriptionssystem auf Chromatin-Templaten die direkte Interaktion von p300 mit Mediator im Verlauf des Aktivierungsprozesses von GAL4-VP16 beobachtet werden (Black et al., 2006). Die Studie weist darauf hin, daß p300, gesteuert durch einen Autoacetylierungsschritt, nach der Acetylierung des Chromatins vom Mediator-Komplex abdissoziiert. Dieser Schritt bewirkt

eine verstärkte Bindung von TFIID an Mediator und fördert anschließend den Zusammenbau des PIC. In einer anderen Studie wurde über eine direkte Bindung von CBP an die ACID-Domäne von MED25 berichtet (Lee et al., 2007). Die Autoren schlagen vor, daß MED25 eine Rolle bei der Chromatin-Umwandlung und beim Zusammenbau des PIC spielt, indem es CBP und Mediator zu RAR/RXR-reagierenden Promotoren rekrutiert.

5.4 Charakterisierung von MED25 als Cofaktor für den Aktivator VP16

MED25 enthält zwei eigenständige Domänen. Die *N*-terminale Domäne (VWA, aa 16–226) ist homolog zur A-Domäne des “Von Willebrand Faktors“. Die ACID-Domäne (aa 389–543) enthält ein nicht beschriebenes Strukturmotiv (Mittler et al., 2003). Deletionsstudien zeigten, daß die ACID-Domäne an VP16 bindet (Abb. 12), während die VWA-Domäne mit Mediator interagiert (Abb. 13). Abbildung 25 faßt diese Befunde in einem vereinfachten Modell zusammen.

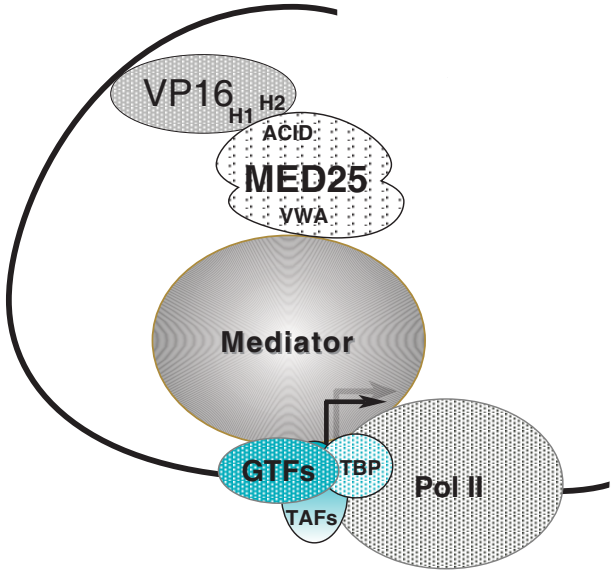


Abbildung 25: Vereinfachtes Modell zum Bindungsverhalten von MED25. MED25 bindet den Mediator-Komplex über die VWA-Domäne und die VP16-Aktivierungsdomäne über die ACID-Domäne.

Funktionelle Studien untermauerten die Bedeutung von MED25 für die Aktivierung von VP16. Die Depletion von A-Med aus Kernextrakten reduzierte die Aktivierung von VP16 in einem Kernextrakt-Transkriptionssystem (Abb. 18). Damit rekonstitutierte A-Med die früher im Arbeitskreis postulierte Aktivität PC6 (Meisterernst, 1999). Die Überexpression der VWA-Domäne in humanen Zellen resultierte in Inhibierung von VP16 und seiner Subregionen (Abb. 14). Dies ist bemerkenswert, weil VP16 andere Faktoren bindet, von denen anzunehmen war, daß sie unabhängig auf die Aktivität der RNA-Polymerase II wirken können (vgl. Abb. 23).

Neben MED25 sind aus der Literatur auch noch andere Mediator-Untereinheiten bekannt, die ebenfalls Aktivierungsdomänen direkt binden. Nachgewiesen wurde dies für MED1 (Yuan et al., 1998), MED12 (Kim et al. 2006; Zhou et al. 2006), MED14 (Lau et al., 2003), MED15 (Kato et al., 2002; Yang et al., 2006) und MED23 (Boyer et al., 1999; Stevens et al., 2002; Wang und Berk, 2002; Bourbon et al., 2004). Es läßt sich vermuten, daß bestimmte Mediator-Untereinheiten genspezifische Funktionen bei der Transkriptionsaktivierung übernehmen. Dies zeigt sich beispielsweise darin, daß die Depletion von MED1 (Ito et al., 2000) aus Säugerzellen die Aktivierungswege des Thyroid-Hormon-Rezeptors stark beeinträchtigt. Parallel dazu wurde die Aktivierung von VP16 offensichtlich nicht beeinflußt.

Dies führt zu der Frage, welche zellulären Aktivatoren und Gene MED25 reguliert. Bei der Auswahl der in Frage kommenden Aktivatoren wurde zuerst der saure Charakter der VP16-Aktivierungsdomäne berücksichtigt. Beispiele für saure Aktivatoren sind p53 und die TA1-Domäne von NFκB. Diese wurden als Fusionsproteine mit GAL4 exprimiert und in einem Kernextrakt-Transkriptionssystem getestet. Depletion von A-Med aus dem Extrakt zeigte keine Beeinträchtigung der Funktion von p53 und TA1 (Abb. 19). Als nächstes wurde die Abhängigkeit anderer Aktivatoren und Gene von MED25 *in vivo* getestet. Dazu wurde die VWA-Domäne, die VP16 dominant negativ reguliert, mit verschiedenen Aktivatoren und Genen in humanen Zellen exprimiert. Das TCRβ-Gen und SV40 erwiesen sich als unabhängig von MED25. Unbeeinflußt zeigten sich auch der Estrogen-Rezeptor α und der prolinreiche Aktivator CTF (Abb. 17). Von CTF und ER ist bekannt, daß sie den Mediator-Komplex über die MED1-Untereinheit binden (Kang et al., 2002).

Der glutaminreiche Aktivator SP1 wurde schwach stimuliert. Diese Beobachtung konnte in weiteren Untersuchungen bestätigt werden. Auch der synthetische Aktivator AH

wurde durch A-Med stimuliert (Mittler et al., 2003). Erklärungsansätze liefert die Literatur (Kretzschmar et al., 1994b; Ryu et al., 1999; Malik und Roeder, 2000). Darin ist gezeigt worden, daß SP1 und AH durch die PC2/CRSP-Form des Mediator-Komplexes reguliert wird. Eventuell unterscheidet sich diese Mediatorform von A-Med. Es ist aber auch denkbar, daß AH und SP1 durch alle Mediatorformen wirken können, auch solche, die durch MED25 nicht (oder nur teilweise) depletiert werden.

In *Drosophila* konnte die Bindung von dMED25 an die Aktivierungsdomänen von “differentiation inducing factor“ (DIF) und “heat-shock factor“ (HSF)“ nachgewiesen werden (Kim et al., 2004). Diese Studie zeigte auch eine funktionelle Abhängigkeit der beiden Aktivatoren von dMED25. Die Interaktionsregionen mit MED25 wurden allerdings nicht näher charakterisiert. Die Aktivierungsdomänen von DIF und HSF sind reich an sauren Aminosäureresten. Es ist also möglich, daß MED25 eine Präferenz für saure Aktivierungsdomänen hat. Allerdings scheint auch MED17 mit diesen Aktivierungsdomänen zu interagieren (Park et al., 2003). Darüberhinaus wurde über die Bindung von MED25 an die AF-2-Domäne des Retinsäure-Rezeptors (RAR) über ein LXXLL-Motiv berichtet (Lee et al., 2007). Zusammenfassend weisen die vorliegenden Befunde klar darauf hin, daß MED25 kritisch für die Aktivierung von VP16 ist. Der zelluläre Faktor MED25 kann schlechterdings ausschließlich als Cofaktor für VP16 dienen. Es bleibt daher interessant, nach weiteren Aktivatoren oder Zielgenen von MED25 zu suchen.

Von zwei anderen Arbeitskreisen wurden offensichtlich nahezu parallel zu dieser Arbeit Spleißvarianten von MED25 untersucht. Diese unterscheiden sich am 3’-Ende (s. dazu die vergleichende Darstellung der Sequenzen in Abb. 27 im Anhang). Die eine Spleißvariante p78 (NCBI accession number AF261072) wurde von Wang als ein neues Protein beschrieben. Sie zeigte Überexpression in Prostata-Krebszellen (Wang et al., 2002). Die zweite Spleißvariante wurde zeitgleich mit der Veröffentlichung der Daten dieser Arbeit (Mittler et al., 2003) als ARC92 publiziert (NCBI accession number AY533507, Yang et al., 2004). Darin wurde das Interaktionsverhalten von ARC92 mit VP16 ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die dortigen Untersuchungsergebnisse decken sich weitgehend mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

5.5 Der A-Med-Komplex

Um die Zusammensetzung des A-Med-Komplexes zu analysieren, wurde dieser aus Kernextrakt humaner Zellen mit dem VCI-Antikörper immunoaffinitätsgereinigt. Zu Vergleichszwecken erfolgte parallel dazu die Reinigung eines MED15-assoziierten Mediator-Komplexes mit dem monoklonalen Antikörper 6C9. Von letzterem Antikörper war durch frühere Studien aus dem Arbeitskreis bekannt, daß dieser humane Mediator-Komplexe präzipitiert (Mittler et al., 2001).
Der Vergleich von A-Med mit dem MED15-assoziierten Mediator-Komplex zeigt große Ähnlichkeit (Abb. 21). Dies belegt zunächst, daß es sich bei A-Med um einen “bona fide“-Mediator-Komplex handelt. Die 28 nachgewiesenen A-Med-Untereinheiten und die 30 nachgewiesenen Mediator-Untereinheiten des MED15-assoziierten Mediator-Komplexes sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Der A-Med-Komplex enthält damit fast alle der 30 (Bourbon et al., 2004) bisher bekannten humanen Mediator-Untereinheiten. Nicht gefunden werden konnten die drei Kern-Mediator-Untereinheiten MED10, MED11 und MED22. Zumindest MED10 konnte in einer unabhängigen Massenspektroskopieanalyse detektiert werden (Blazek, 2005).
Weiterhin stellt sich die Frage nach der Zusammensetzung des A-Med-Komplexes *in vivo*. Der A-Med-Komplex wurde nach der Rekrutierung durch VP16 auf Modellpromotoren mittels ChIP-Analyse (“chromatin immunoprecipitation“) charakterisiert. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß MED25 bei der Rekrutierung zum Promotor mit einem “großen“ Mediator-Komplex (beispielsweise TRAP oder TRAP-ähnlich) assoziiert vorliegt. Die Rekrutierung eines “großen“ Mediator-Komplexes deckt sich auch mit den *in vitro*-Befunden zur Zusammensetzung des A-Med-Komplexes in dieser Arbeit. Die inzwischen veröffentlichten Ergebnisse von Uhlmann deuten auch darauf hin, daß sich dieser “große“ Mediator-Komplex im Verlauf des Aktivierungsprozesses in einen aktiven A-Med-Komplex umwandelt. Dieser enthält dann allerdings nicht das CDK8-Modul (Uhlmann et al., 2007). Die bisherigen Daten insgesamt lassen ein dynamisches Mediator-Modell vermuten. Darin verändert der Mediator-Komplex in Abhängigkeit vom Aktivator die Zusammensetzung seiner Untereinheiten.
Die Analyse der stöchiometrischen Verhältnisse von MED25 im Vergleich zu den Kern-Mediator-Untereinheiten MED7 und MED15 deutet darauf hin, daß zudem MED25 eine substöchiometrische Mediator-Komponente darstellt (Abb. 20). Dieser Befund läßt

Raum für verschiedene Interpretationen. Zum einen könnte es sein, daß freies MED25 unabhängig von Mediator durch VP16 rekrutiert wird und anschließend Bindung an Mediator unter Bildung von A-Med erfolgt. Diese Annahme steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen dieser Arbeit. In Zellen war die überexprimierte VWA-Domäne mit humanem Mediator (stellvertretend nachgewiesen durch MED7) assoziiert (Abb. 15). Ein analoges Ergebnis wurde im Arbeitskreis auch mit flag-MED25 gefunden (Mittler et al., 2003). Bei den beiden Beobachtungen läßt sich aber nicht ausschließen, daß Austausch zwischen den überexprimierten MED25-Konstrukten und endogenem MED25 erfolgt. Auch deuten andere biochemische Studien darauf hin, daß MED25 in Kernextrakten vollständig mit Mediator assoziiert ist und sprechen damit eher gegen die Existenz größerer Mengen von freiem MED25 in der Zelle (Sato et al., 2004; Uhlmann et al., 2007). Eine plausible Erklärung zur substöchiometrischen Assoziation von MED25 liefert eine neuere Studie aus diesem Arbeitskreis. Demnach gibt es einen zweiten MED25-Mediator-Komplex (Uhlmann et al., 2007). Dieser Subkomplex ist allerdings nicht in der Lage die Aktivierung von VP16 zu vermitteln. Es wird davon ausgegangen, daß dieser MED15, aber nicht MED7 und MED1 enthält.

Eine andere interessante Frage ist, wo MED25 im Mediator-Komplex bindet. Denkbar ist, daß MED25 mit den Untereinheiten MED16, MED23 und MED24 aus der “tail“-Region des Mediator-Komplexes assoziiert ist. Diese Untereinheiten waren, wie Uhlmann zeigen konnte, im aktiven A-Med-Komplex anwesend. Von diesen ist ferner bekannt, daß sie variabel an Mediator binden und sehr wahrscheinlich ein eigenständiges Submodul formen. In “knock out“-Mauszellen, in denen MED23 (Stevens et al., 2002) bzw. MED24 eliminiert wurden (Ito et al., 2002), fehlen auch jeweils alle anderen Untereinheiten dieses Submoduls. Darüberhinaus wird die Aktivierung von VP16 beeinträchtigt. Die Bindung von MED25 an die “tail“-Region des Mediators erscheint auch deshalb plausibel, da sich diese in anderen Studien als wichtig für die Integration von Signalen verschiedener Aktivatoren in den Mediator-Komplex erwiesen hat (Übersichtsartikel: Blazek et al., 2005; Malik und Roeder, 2005). Die hier diskutierten Überlegungen zur Position von MED25 im Mediator-Komplex werden auch durch Ergebnisse dieser Arbeit gestützt (s. Abschn. 4.4). Die Mediator-bindende VWA-Domäne bewirkt eine dominant-negative Inhibierung der VP16-Funktion (Abb. 14). Die überexprimierte VWA-Domäne könnte deshalb mit endogenem MED25 kompetetieren und damit die Interaktion des diskutierten Submoduls mit VP16 aufheben. Da VP16, wie in dieser

Arbeit gezeigt, direkt an MED25 bindet, würde dies erklären, daß durch die Überexpression der VWA-Domäne spezifisch die Aktivierung von VP16 beeinträchtigt wird.
Faßt man die vorgenannten Überlegungen zusammen, spricht vieles dafür, daß zunächst ein “großer“ Mediator-Komplex, der MED25 enthält, durch VP16 zum Promotor rekrutiert wird. Dieser sollte sich im Laufe des Aktivierungs-Prozesses unter Verlust des CDK8-Moduls in einen aktiven A-Med-Komplex umwandeln. Andererseits ist aber auch die Annahme plausibel, daß MED25 mit dem im aktiven A-Med-Komplex anwesenden variablen Submodul, bestehend aus MED24, MED23 und MED16, assoziiert vorliegt. Das Modell in Abbildung 26 zeigt gemäß den vorgenannten Überlegungen ein vereinfachtes Modell der Aktivierung des A-Med-Komplexes.

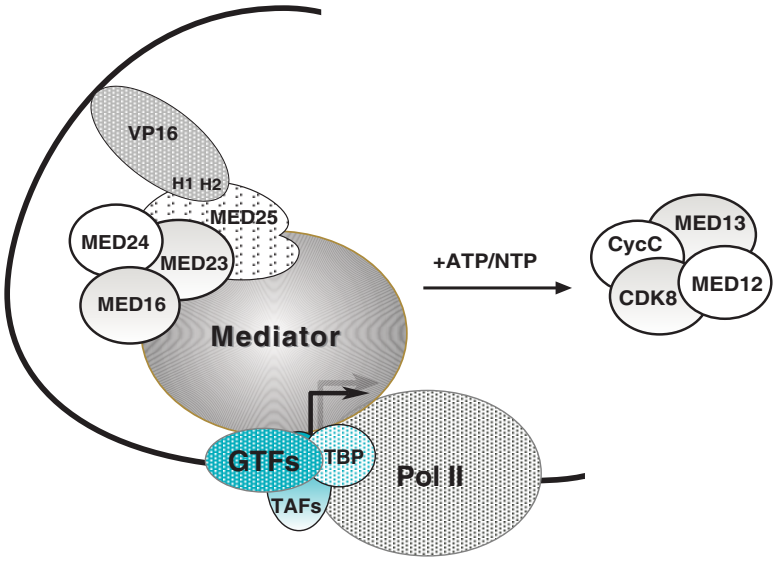


Abbildung 26: Hypothetisches Modell der VP16-Aktivierung durch den A-Med-Komplex. VP16 rekrutiert A-Med durch die ACID-Domäne von MED25. MED25 ist durch seine VWA-Domäne mit dem MED16/MED23/MED24-Submodul eines großen TRAP oder TRAP-ähnlichen Mediator-Komplexes assoziiert. In Folge des Aktivierungsprozesses wandelt sich der Mediator-Komplex unter Verlust des CDK8-Moduls in den aktiven A-Med-Komplex um.

5.6 Hinweise auf eine Beteiligung des humanen Mediators an Signalprozessen bei der Chromatin-Umwandlung und RNA-Prozessierung

Die massenspektrometrische Analyse der Eluate des MED15- (6C9) und MED25-Antikörpers (VCI) ergab, neben den Mediator-Untereinheiten, eine Vielzahl von weiteren Kernfaktoren. Einige Polypeptide konnten in beiden Eluaten (Tab. 5), andere hingegen nur im Eluat des 6C9- (Tab. 6) oder des VCI-Antikörpers (Tab. 7) nachgewiesen werden. Diese könnten in Verbindung mit Mediator an verschiedenen Transkriptionsprozessen oder bei der RNA-Prozessierung beteiligt sein.

Darunter befanden sich Mitglieder der Familie der hnRNP-Proteine ("heterogenous nuclear ribonucleoprotein") wie z.B. hnRNP A/B, A1, A2B1, D-like, K und M (Tab. 5). Die hnRNP-Proteine können, abhängig von ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften, in Subgruppen unterteilt werden. Ein Beispiel für eine Subgruppe sind hnRNP-Polypeptide des A/B-Typs (A1, A2, B1 und B2) (Übersichtsartikel: Dreyfuss et al, 1993). hnRNP-Proteine spielen eine Rolle bei der Reifung und Prozessierung von mRNA. Sie sind an den Vorgängen des Spleißens, Transports und der Polyadenylierung von mRNA beteiligt. Weiterhin regulieren sie die Stabilität und Lokalisation der mRNA (Übersichtsartikel: Krecic und Swanson, 1999). Über die Interaktion von hnRNP-Proteinen mit Mediator ist bisher noch nicht berichtet worden. Es gibt jedoch eine Reihe von Studien, die auf eine Verknüpfung des Spleißens, der Anheftung der 5'-Kappe, der Polyadenylierung und der Termination mit der Transkription der RNA-Polymerase II hinweisen (Hirose und Manley, 2000; Singh, 2001; Proudfoot et al., 2002).

In den Eluaten beider Antikörper finden sich darüberhinaus auch noch die meisten bekannten Untereinheiten humaner Swi/Snf-Komplexe. Nachgewiesen werden konnte in beiden Eluaten jeweils Actin, Brg-1, Brm, BAF47, BAF53a, BAF57, BAF60A, BAF155, BAF170, BAF250a und BAF250b (Tab. 5). Weiterhin wurden noch BAF200, BAF180 und BAF60C im Eluat des VCI-Antikörpers (Abb. 7) und BAF60B im Eluat des 6C9-Antikörpers gefunden (Abb. 6). Es gibt mindestens drei ähnliche humane Swi/Snf-Komplexe, die sich bei der Aktivierung bestimmter Gene nicht austauschen lassen (Wang et al, 2003). Die Komplexe, die als Swi/Snf bzw. BAF bezeichnet werden, besitzen mindestens 10 Untereinheiten und basieren auf den paralogen ATPasen hBRM

bzw. BRG1. Der Komplex PBAF enthält BRG1 und statt der BAF250-Untereinheit das BAF180/Polybromo-Protein. Swi/Snf-Komplexe sind an der Umformung des Chromatins beteiligt. Sie können Nukleosomen entfernen, zwischen verschiedenen DNA-Doppelsträngen transferieren oder sie durch Mobilisierung entlang der DNA verschieben. (Übersichtsartikel: Sudarsanam und Winston, 2000). Biochemische Studien im Arbeitskreis bestätigten die Copräzipitation von Mediator mit Swi/Snf-Komplexen. In der 2D-Gelelektrophorese waren keine weiteren Faktoren zu erkennen, die als Bindeglied bei einer indirekten Interaktion beider Komplexe hätten dienen können (Blazek, 2005). In der Literatur finden sich weiterhin funktionelle Studien, die Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Mediators und der Rekrutierung von Swi/Snf-Komplexen schließen lassen. In Hefe konnte für einige Gene beispielsweise gezeigt werden, daß bei der Aktivierung von Gcn4p die Rekrutierung von Swi/Snf durch die Mediator-Untereinheiten MED2, MED15 und MED19 gefördert wird (Yoon et al., 2003). Bekannt ist beispielsweise auch noch, daß die Rekrutierung des Swi/Snf-Komplexes in Hefe zum Galactose-induzierbaren Gen GAL1 nur in Verbindung mit TAFIIs, RNA-Polymerase II und Mediator effizient funktioniert (Lemieux und Gaudreau, 2004). Auf Grund der vorliegenden Befunde erscheint eine direkte Bindung von Swi/Snf an Mediator naheliegend.

Weiterhin wurden in den Eluaten auch Untereinheiten von CPSF und CstF (“cleavage stimulatory factor“) (“cleavage and polyadenylation specificity factor“) gefunden. Anwesend waren jeweils in beiden Eluaten CPSF1 und CPSF5 (Tab. 5). Zusätzlich ließen sich CPSF2, CPSF3 und CstF-64 im Eluat des VCI-Antikörpers finden (Tab. 7). Bekannt ist, daß CPSF und CstF zusammen einen stabilen Komplex mit der prä-mRNA bilden und die Spezifität für die Spleiß- und Polyadenylierungsreaktion der prä-mRNA vermitteln (Übersichtsartikel: Hirose und Manley, 2000; Proudfoot et al., 2002). Weiterhin konnte für CPSF und CstF kürzlich in diesem Labor mit Hilfe von ChIP-Analyse die gleichzeitige Anwesenheit mit dem A-Med-Komplex auf einem Modellpromotor nachgewiesen werden (Uhlmann et al., 2007).

Diese hnRNP-Proteine, Untereinheiten des Swi/Snf-Komplexes, Untereinheiten von CPSF und CstF könnten einzeln oder in Proteinkomplexen direkt Mediator kontaktieren. In beiden Eluaten wurden massenspektrometrisch noch etwa 100 weitere Proteine nachgewiesen. Darunter sind auch bekannte Vertreter von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise TAF9, DOT1L, HDAC1 und HDAC2 (Tab. 7). Diese kommen ebenfalls als Kandidaten für Bindung an Mediator in Frage.

6 Zusammenfassung

Die Transkription von proteincodierenden Genen in Eukaryonten erfolgt durch die RNA-Polymerase II. Diese bildet zusammen mit den generellen Transkriptionsfaktoren einen molekularen RNA-Syntheseapparat an den Promotoren von Klasse-II-Genen. Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivität dieser basalen Transkriptionsmaschine spielen Aktivatorproteine. Diese binden meist sequenzspezifisch an regulatorische DNA-Sequenzen in der Nähe der zu transkribierenden Gene. Aktivatoren ihrerseits benötigen weiterhin zusätzliche akzessorische Proteine, die Cofaktoren. Letztere wirken als Vermittler von Signalen zwischen der regulatorischen Oberfläche des Aktivators und der basalen Transkriptionsmaschine oder binden Faktoren, die eine Änderung der Chromatinstruktur bewirken.

Ziel dieser Arbeit war es, durch differenzierte Untersuchung von Cofaktoren des viralen Aktivators VP16 des Herpes simplex Virus (HSV-1) zu einem besseren Verständnis der Transkriptionsregulation beizutragen. Die Aktivierungsdomäne von VP16 (VP16:AD) zeichnet sich durch ihre starke Wirkung in Eukaryonten aus und läßt sich strukturell und funktionell in zwei Subdomänen VP16:H1 und VP16:H2 unterteilen. Im Rahmen der Untersuchungen wurde ein biochemisches Affinitätssystem gewählt, in dem VP16:AD selbst sowie VP16:H1 und VP16:H2 getrennt als Liganden zum Einsatz kamen. Als Kontrolle für eine spezifische Wechselwirkung wurden Punktmutationen in der H1- und H2-Region von VP16 herangezogen, die erfahrungsgemäß die Aktivierung der jeweiligen Domänen in Säugerzellen ausschalten.

Mit Hilfe dieses Affinitätssystems konnte erstmals gezeigt werden, daß die Histon-Acetyltransferase CBP spezifisch an die VP16:H2-Region, nicht aber an die VP16:H1-Region bindet. Die Interaktionsregionen mit VP16:H2 wurden durch Deletionsstudien von CBP näher bestimmt. Diese befinden sich in der *C*- und in der *N*-terminalen Region von CBP. Darüberhinaus ergaben funktionelle *in vivo*-Untersuchungen, daß CBP kritisch für die Funktion von VP16:H2 in Säugerzellen ist. Diese Ergebnisse legen zusammen mit weiteren Beobachtungen in diesem Arbeitskreis nahe, daß CBP die Aktivierung von VP16:H2 im Kontext des Chromatins vermittelt.

Weitere Untersuchungen galten dem humanen Mediator. Aufbauend auf frühere Ergebnisse wurde das Interaktionsverhalten von humanen Mediator-Komplexen an VP16:H1 und VP16:H2 untersucht. Die durchgeführten *in vitro*-Bindungsstudien

zeigten, daß beide VP16-Subdomänen spezifisch humane Mediator-Komplexe rekrutieren. Es gab keine Evidenz dafür, daß die beiden Subdomänen unterschiedliche Mediator-Zustandsformen binden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung eines neuen Proteins mit einem Molekulargewicht von 103 kDA (p103) (synonym mit ACID1, ARC92 und MED25). Dieses war zuvor im Arbeitskreis über Affinitätschromatographie an VP16:H1 isoliert und kloniert worden. Es ist evolutionär nur in höheren Eukaryonten zu finden und enthält zwei strukturierte Domänen. Die eine Domäne am *N*-Terminus ist homolog zur Protein-Protein-Interaktionsdomäne des “Von-Willebrand-Faktor“ A. Die andere Domäne am *C*-Terminus zeigt ein vorher noch nicht beschriebenes Strukturmotiv und wurde ACID benannt. Mit Hilfe von biochemischen Experimenten gelang es im Rahmen dieser Arbeit zu zeigen, daß das neue Protein eine substöchiometrische Komponente des humanen Mediators darstellt. Im Lauf der Fortentwicklung dieser Arbeit wurde p103 im Arbeitskreis zunächst in ARC92/ACID1 und schließlich nach der Einführung einer einheitlichen Nomenklatur für Mediator-Untereinheiten in MED25 umbenannt. Mit Hilfe eines α-MED25-Antikörpers wurde der MED25-assoziierte Mediator-Komplex (A-Med) aus Kernextrakten isoliert. A-Med enthielt in seiner Zusammensetzung nahezu alle bekannten humanen Mediator-Untereinheiten. Durch *in vitro*-Bindungsstudien mit MED25-Deletionskonstrukten konnte nachgewiesen werden, daß einerseits die ACID-Domäne spezifisch und direkt VP16:H1 und VP16:H2 bindet. Andererseits interagiert die *N*-terminale-Region, die die VWA-Domäne enthält, mit humanen Mediator-Komplexen. Für MED25 konnte weiterhin durch biochemische Studien *in vivo* nachgewiesen werden, daß diese Mediator-Untereinheit kritisch für die Aktivierung von VP16 in Säugerzellen ist. Neben VP16 wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine Reihe weiterer Aktivatoren und Gene auf ihre funktionelle Abhängigkeit von MED25 überprüft. Ergebnis war, daß die Aktivatoren p53, TA1, Estrogen-Rezeptor α und CTF, weiterhin auch die Gene TCRβ und SV40 in ihrer Funktion nicht durch MED25 beeinflußt werden. Eine schwache Abhängigkeit von MED25 zeigten hingegen die Aktivatoren SP1 und AH.

Schließlich wurden biochemische Studien zum Interaktionsverhalten von humanen Mediator-Komplexen mit zellulären Kernfaktoren begonnen. Dabei konnte eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, bei denen eine Interaktion mit Mediator plausibel erscheint. Im einzelnen handelt es sich um Untereinheiten von CPSF, CstF und Swi/Snf

sowie CBP, p300, hnRNP-Proteine und etwa 100 weitere Proteine. Letztere interagieren möglicherweise einzeln oder als Proteinkomplexe mit Mediator. Diese Daten insgesamt können Anlaß für weiterführende experimentelle Studien sein.
Bezüglich des viralen Aktivators VP16 läßt sich zusammenfassend feststellen: In dieser Arbeit konnten zwei neue Aktivierungswege von VP16 beschrieben werden: Zum einen vermittelt MED25, eine evolutionär nicht konservierte substöchiometrische Komponente des Mediators, die Aktivierung von VP16:H1 und VP16:H2. Zum anderen wirkt die Histon-Acetyltransferase CBP im Kontext des Chromatins über VP16:H2.

7 Literaturverzeichnis

Akoulitchev, S., Chuikov, S., und Reinberg, D. (2000). TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature*, 407(6800):102–106.

Albright, S. R. und Tjian, R. (2000). TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene*, 242(1-2):1–13.

Andrau, J.-C., van de Pasch, L., Lijnzaad, P., Bijma, T., Koerkamp, M. G., van de Peppel, J., Werner, M., und Holstege, F. C. P. (2006). Genome-wide location of the coactivator mediator: Binding without activation and transient Cdk8 interaction on DNA. *Mol Cell*, 22(2):179–192.

Armache, K.-J., Kettenberger, H., und Cramer, P. (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(12):6964–6968.

Armache, K.-J., Mitterweger, S., Meinhart, A., und Cramer, P. (2005). Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem*, 280(8):7131–7134.

Asturias, F. J. und Kornberg, R. D. (1999). Protein crystallization on lipid layers and structure determination of the RNA polymerase II transcription initiation complex. *J Biol Chem*, 274(11):6813–6816.

Babb, R., Huang, C. C., Aufiero, D. J., und Herr, W. (2001). DNA recognition by the herpes simplex virus transactivator VP16: a novel DNA-binding structure. *Mol Cell Biol*, 21(14):4700–4712.

Baek, YK, K., und RG, R. (2006). Human Mediator enhances basal transcription by facilitating recruitment of TFIIB during preinitiation complex assembly. *J Biol Chem*.

Baek, H. J., Malik, S., Qin, J., und Roeder, R. G. (2002). Requirement of TRAP/mediator for both activator-independent and activator-dependent transcription in conjunction with TFIID-associated TAF(II)s. *Mol Cell Biol*, 22(8):2842–2852.

Baidoobonso, SMa nd Guidi, B. und Myers, L. (2007). Med19(Rox3) regulates Intermodule interactions in the Saccharomyces cerevisiae mediator complex. *J Biol Chem*, 282(8):5551–5559.

Bannister, A. J. und Kouzarides, T. (1995). CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *EMBO J*, 14(19):4758–4762.

Bannister, A. J. und Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, 384(6610):641–643.

Bannister, A. J., Miska, E. A., Gorlich, D., und Kouzarides, T. (2000). Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol*, 10(8):467–470.

Bartfai, R., Balduf, C., Hilton, T., Rathmann, Y., Hadzhiev, Y., Tora, L., Orban, L., und Muller, F. (2004). TBP2, a vertebrate-specific member of the TBP family, is required in embryonic development of zebrafish. *Curr Biol*, 14(7):593–598.

Baumli, S., Hoeppner, S., und Cramer, P. (2005). A conserved mediator hinge revealed in the structure of the MED7.MED21 (Med7.Srb7) heterodimer. *J Biol Chem*, 280(18):18171–18178.

Belakavadi, M. und Fondell, J. D. (2006). Role of the mediator complex in nuclear hormone receptor signaling. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 156:23–43.

Bentley, D. R., Deloukas, P., Dunham, A., French, L., Gregory, S. G., Humphray, S. J., Mungall, A. J., Ross, M. T., Carter, N. P., Dunham, I., Scott, C. E., Ashcroft, K. J., Atkinson, A. L., Aubin, K., Beare, D. M., Bethel, G., Brady, N., Brook, J. C., Burford, D. C., Burrill, W. D., Burrows, C., Butler, A. P., Carder, C., Catanese, J. J., Clee, C. M., Clegg, S. M., Cobley, V., Coffey, A. J., Cole, C. G., Collins, J. E., Conquer, J. S., Cooper, R. A., Culley, K. M., Dawson, E., Dearden, F. L., Durbin, R. M., de Jong., P. J., Dhami, P. D., Earthrowl, M. E., Edwards, C. A., Evans, R. S., Gillson, C. J., Ghori, J., Green, L., Gwilliam, R., Halls, K. S., Hammond, S., Harper, G. L., Heathcott, R. W., Holden, J. L., Holloway, E., Hopkins, B. L., Howard, P. J., Howell, G. R., Huckle, E. J., Hughes, J., Hunt, P. J., Hunt, S. E., Izmajlowicz, M., Jones, C. A., Joseph, S. S., Laird, G., Langford, C. F., Lehvaslaiho, M. H., Leversha, M. A., McCann, O. T., McDonald, L. M., McDowall, J., Maslen, G. L., Mistry, D., Moschonas, N. K., Neocleous, V., Pearson, D. M., Phillips, K. J., Porter, K. M., Prathalingam, S. R., Ramsey, Y. H., Ranby, S. A., Rice, C. M., Rogers, J., Rogers, L. J., Sarafidou, T., Scott, D. J., Sharp, G. J., Shaw-Smith, C. J., Smink, L. J., Soderlund, C., Sotheran, E. C., Steingruber, H. E., Sulston, J. E., Taylor, A., Taylor, R. G., Thorpe, A. A., Tinsley, E., Warry, G. L., Whittaker, A., Whittaker, P., Williams, S. H., Wilmer, T. E., Wooster, R., und Wright, C. L. (2001). The physical maps for sequencing human chromosomes 1, 6, 9, 10, 13, 20 and X. *Nature*, 409(6822):942–943.

Berger, S. L., Cress, W. D., Cress, A., Triezenberg, S. J., und Guarente, L. (1990). Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell*, 61(7):1199–1208.

Berk, A. J. (2000). TBP-like factors come into focus. *Cell*, 103(1):5–8.

Black, J. C., Choi, J. E., Lombardo, S. R., und Carey, M. (2006). A mechanism for coordinating chromatin modification and preinitiation complex assembly. *Mol Cell*, 23(6):809–818.

Blazek, E. (2005). Biochemische Darstellung funktionaler Proteome und großer Proteinkomplexe. *PhD thesis*.

Blazek, E., Mittler, G., und Meisterernst, M. (2005). The Mediator of RNA polymerase II. *Chromosoma*, 113(8):399–408.

Bourbon, H.-M., Aguilera, A., Ansari, A. Z., Asturias, F. J., Berk, A. J., Bjorklund, S., Blackwell, T. K., Borggrefe, T., Carey, M., Carlson, M., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Emmons, S. W., Fondell, J. D., Freedman, L. P., Fukasawa, T., Gustafsson, C. M., Han, M., He, X., Herman, P. K., Hinnebusch, A. G., Holmberg, S., Holstege, F. C., Jaehning, J. A., Kim, Y.-J., Kuras, L., Leutz, A., Lis, J. T., Meisterernest, M., Naar, A. M., Nasmyth, K., Parvin, J. D., Ptashne, M., Reinberg, D., Ronne, H., Sadowski, I., Sakurai, H., Sipiczki, M., Sternberg, P. W., Stillman, D. J., Strich, R., Struhl, K., Svejstrup, J. Q., Tuck, S., Winston, F., Roeder, R. G., und Kornberg, R. D. (2004). A unified nomenclature for protein subunits of mediator

complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell*, 14(5):553–557. Letter.

Boyer, T. G., Martin, M. E., Lees, E., Ricciardi, R. P., und Berk, A. J. (1999). Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature*, 399(6733):276–279.

Brou, C., Kuhn, A., Staub, A., Chaudhary, S., Grummt, I., Davidson, I., und Tora, L. (1993). Sequence-specific transactivators counteract topoisomerase II-mediated inhibition of in vitro transcription by RNA polymerases I and II. *Nucleic Acids Res*, 21(17):4011–4018.

Brown, C. E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S. C., Carrozza, M. J., Tan, S., und Workman, J. L. (2001). Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*, 292(5525):2333–2337.

Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L., und Workman, J. L. (2000). The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci*, 25(1):15–19.

Burke, T. W., Willy, P. J., Kutach, A. K., Butler, J. E., und Kadonaga, J. T. (1998). The DPE, a conserved downstream core promoter element that is functionally analogous to the TATA box. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 63:75–82.

Burley, S. K. und Roeder, R. G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem*, 65:769–799.

Bushnell, D. A., Cramer, P., und Kornberg, R. D. (2002). Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(3):1218–1222.

Bushnell, D. A. und Kornberg, R. D. (2003). Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-A resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(12):6969–6973.

Bushnell, D. A., Westover, K. D., Davis, R. E., und Kornberg, R. D. (2004). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Angstroms. *Science*, 303(5660):983–988.

Butler, J. E. F. und Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev*, 16(20):2583–2592.

Carlson, M. (1997). Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13:1–23.

Carpenter, A. E., Memedula, S., Plutz, M. J., und Belmont, A. S. (2005). Common effects of acidic activators on large-scale chromatin structure and transcription. *Mol Cell Biol*, 25(3):958–968.

Casadaban, M.J. und Cohen, S. (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.*, 138:179–207.

Chadick, J. Z. und Asturias, F. J. (2005). Structure of eukaryotic Mediator complexes. *Trends Biochem Sci*, 30(5):264–271.

Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M., und Evans, R. M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*, 383(6595):99–103.

Chan, H. M. und La Thangue, N. B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci*, 114(Pt 13):2363–2373.

Chen, H., Lin, R. J., Xie, W., Wilpitz, D., und Evans, R. M. (1999). Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell*, 98(5):675–686.

Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G., Sementchenko, V., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Bailey, D., Ganesh, M., Ghosh, S., Bell, I., Gerhard, D., und Gingeras, T. (2005). Transcriptional Maps of 10 Human Chromosomes at 5-Nucleotide Resolution. *Science*. JOURNAL ARTICLE.

Chi, T., Lieberman, P., Ellwood, K., und Carey, M. (1995). A general mechanism for transcriptional synergy by eukaryotic activators. *Nature*, 377(6546):254–257.

Choy, B. und Green, M. R. (1993). Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly. *Nature*, 366(6455):531–536.

Corden, J. L. (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, 15(10):383–387.

Cosma, M. P., Panizza, S., und Nasmyth, K. (2001). Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. *Mol Cell*, 7(6):1213–1220.

Cousens, D. J., Greaves, R., Goding, C. R., und O'Hare, P. (1989). The C-terminal 79 amino acids of the herpes simplex virus regulatory protein, Vmw65, efficiently activate transcription in yeast and mammalian cells in chimeric DNA-binding proteins. *EMBO J*, 8(8):2337–2342.

Cramer, P. (2002). Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol*, 12(1):89–97.

Cramer, P. (2004). RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Curr Opin Genet Dev*, 14(2):218–226.

Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M., David, P. R., und Kornberg, R. D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*, 288(5466):640–649.

Cramer, P., Bushnell, D. A., und Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, 292(5523):1863–1876.

Cress, W. D. und Triezenberg, S. J. (1991). Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. *Science*, 251(4989):87–90.

Crowley, T. E., Hoey, T., Liu, J. K., Jan, Y. N., Jan, L. Y., und Tjian, R. (1993). A new factor related to TATA-binding protein has highly restricted expression patterns in Drosophila. *Nature*, 361(6412):557–561.

Dahmus, M. E. (1995). Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta*, 1261(2):171–182.

Dames, S. A., Martinez-Yamout, M., De Guzman, R. N., Dyson, H. J., und Wright, P. E. (2002). Structural basis for Hif-1 alpha /CBP recognition in the cellular hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8):5271–5276.

Dantonel, J. C., Quintin, S., Lakatos, L., Labouesse, M., und Tora, L. (2000). TBP-like factor is required for embryonic RNA polymerase II transcription in C. elegans. *Mol Cell*, 6(3):715–722.

Dantonel, J. C., Wurtz, J. M., Poch, O., Moras, D., und Tora, L. (1999). The TBP-like factor: an alternative transcription factor in metazoa. *Trends Biochem Sci*, 24(9):335–339.

Davis, J. A., Takagi, Y., Kornberg, R. D., und Asturias, F. A. (2002). Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol Cell*, 10(2):409–415.

Del Sal., G., Manfioletti, G., und Schneider, C. (1988). A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res*, 16(20):9878.

Deng, L., de la Fuente, C., Fu, P., Wang, L., Donnelly, R., Wade, J. D., Lambert, P., Li, H., Lee, C. G., und Kashanchi, F. (2000). Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. *Virology*, 277(2):278–295.

Deng, W. und Roberts, S. G. E. (2005). A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes Dev*, 19(20):2418–2423.

Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., und Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 11(5):1475–1489.

Dotson, M. R., Yuan, C. X., Roeder, R. G., Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Jiang, Y. W., Li, Y., Kornberg, R. D., und Asturias, F. J. (2000). Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26):14307–14310.

Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Pinol-Roma, S., und Burd, C. G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem*, 62:289–321.

Dynan, W. S. und Tjian, R. (1983). Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell*, 32(3):669–680.

Dynlacht, B. D., Hoey, T., und Tjian, R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*, 66(3):563–576.

Eckner, R., Arany, Z., Ewen, M., Sellers, W., und Livingston, D. M. (1994). The adenovirus E1A-associated 300-kD protein exhibits properties of a transcriptional coactivator and belongs to an evolutionarily conserved family. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 59:85–95.

Edwards, A. M., Kane, C. M., Young, R. A., und Kornberg, R. D. (1991). Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J Biol Chem*, 266(1):71–75.

Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelsen, C. O., Koeck, P. J. B., Holmberg, S., Hebert, H., und Gustafsson, C. M. (2006). The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(43):15788–15793.

Flanagan, P. M., Kelleher, R. J. r., Sayre, M. H., Tschochner, H., und Kornberg, R. D. (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature*, 350(6317):436–438.

Fontes, J. D., Kanazawa, S., Jean, D., und Peterlin, B. M. (1999). Interactions between the class II transactivator and CREB binding protein increase transcription of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol*, 19(1):941–947.

Formstecher, E., Aresta, S., Collura, V., Hamburger, A., Meil, A., Trehin, A., Reverdy, C., Betin, V., Maire, S., Brun, C., Jacq, B., Arpin, M., Bellaiche, Y., Bellusci, S., Benaroch, P., Bornens, M., Chanet, R., Chavrier, P., Delattre, O., Doye, V., Fehon, R., Faye, G., Galli, T., Girault, J.-A., Goud, B., de Gunzburg, J., Johannes, L., Junier, M.-P., Mirouse, V., Mukherjee, A., Papadopoulo, D., Perez, F., Plessis, A., Rosse, C., Saule, S., Stoppa-Lyonnet, D., Vincent, A., White, M., Legrain, P., Wojcik, J., Camonis, J., und Daviet, L. (2005). Protein interaction mapping: a Drosophila case study. *Genome Res*, 15(3):376–384.

Freedman, S. J., Sun, Z.-Y. J., Poy, F., Kung, A. L., Livingston, D. M., Wagner, G., und Eck, M. J. (2002). Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8):5367–5372.

Furumoto, T., Tanaka, A., Ito, M., Malik, S., Hirose, Y., Hanaoka, F., und Ohkuma, Y. (2007). A kinase subunit of the human mediator complex, CDK8, positively regulates transcriptional activation. *Genes Cells*, 12(1):119–132.

Gadal, O., Mariotte-Labarre, S., Chedin, S., Quemeneur, E., Carles, C., Sentenac, A., und Thuriaux, P. (1997). A34.5, a nonessential component of yeast RNA polymerase I, cooperates with subunit A14 and DNA topoisomerase I to produce a functional rRNA synthesis machine. *Mol Cell Biol*, 17(4):1787–1795.

Ge, H. und Roeder, R. G. (1994a). Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes. *Cell*, 78(3):513–523.

Ge, H. und Roeder, R. G. (1994b). The high mobility group protein HMG1 can reversibly inhibit class II gene transcription by interaction with the TATA-binding protein. *J Biol Chem*, 269(25):17136–17140.

Ge, H., Si, Y., und Roeder, R. G. (1998). Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *EMBO J*, 17(22):6723–6729.

Ghosh, S., Toth, C., Peterlin, B. M., und Seto, E. (1996). Synergistic activation of transcription by the mutant and wild-type minimal transcriptional activation domain of VP16. *J Biol Chem*, 271(17):9911–9918.

Giandomenico, V., Simonsson, M., Gronroos, E., und Ericsson, J. (2003). Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol Cell Biol*, 23(7):2587–2599.

Giordano, A. und Avantaggiati, M. L. (1999). p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol*, 181(2):218–230.

Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., und Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 A resolution. *Science*, 292(5523):1876–1882.

Goodman, R. H. und Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev*, 14(13):1553–1577.

Goodrich, J. A., Hoey, T., Thut, C. J., Admon, A., und Tjian, R. (1993). Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell*, 75(3):519–530.

Goppelt, A. und Meisterernst, M. (1996). Characterization of the basal inhibitor of class II transcription NC2 from Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res*, 24(22):4450–4455.

Grapes, M. und O'Hare, P. (2000). Differences in determinants required for complex formation and transactivation in related VP16 proteins. *J Virol*, 74(21):10112–10121.

Greaves, R. und O'Hare, P. (1989). Separation of requirements for protein-DNA complex assembly from those for functional activity in the herpes simplex virus regulatory protein Vmw65. *J Virol*, 63(4):1641–1650.

Gronroos, E., Hellman, U., Heldin, C.-H., und Ericsson, J. (2002). Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell*, 10(3):483–493.

Gu, W., Malik, S., Ito, M., Yuan, C. X., Fondell, J. D., Zhang, X., Martinez, E., Qin, J., und Roeder, R. G. (1999). A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Mol Cell*, 3(1):97–108.

Gu, W. und Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 90(4):595–606.

Guglielmi, B., van Berkum, N. L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H.-M., Holstege, F. C. P., und Werner, M. (2004). A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. *Nucleic Acids Res*, 32(18):5379–5391.

Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol*, 11(5):394–403.

Hallberg, M., Hu, G.-Z., Tronnersjo, S., Shaikhibrahim, Z., Balciunas, D., Bjorklund, S., und Ronne, H. (2006). Functional and physical interactions within the middle domain of the yeast mediator. *Mol Genet Genomics*, 276(2):197–210.

Hallberg, M., Polozkov, G. V., Hu, G.-Z., Beve, J., Gustafsson, C. M., Ronne, H., und Bjorklund, S. (2004). Site-specific Srb10-dependent phosphorylation of the yeast Mediator subunit Med2 regulates gene expression from the 2-microm plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10):3370–3375.

Halle, J. P., Haus-Seuffert, P., Woltering, C., Stelzer, G., und Meisterernst, M. (1997). A conserved tissue-specific structure at a human T-cell receptor beta-chain core promoter. *Mol Cell Biol*, 17(8):4220–4229.

Halle, J. P., Stelzer, G., Goppelt, A., und Meisterernst, M. (1995). Activation of transcription by recombinant upstream stimulatory factor 1 is mediated by a novel positive cofactor. *J Biol Chem*, 270(36):21307–21311.

Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2):465–503.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of E. coli. *IRL press at Oxford University press, Oxford, U.K.*

Hansen, S. K., Takada, S., Jacobson, R. H., Lis, J. T., und Tjian, R. (1997). Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF. *Cell*, 91(1):71–83.

Hardy, S., Brand, M., Mittler, G., Yanagisawa, J., Kato, S., Meisterernst, M., und Tora, L. (2002). TATA-binding protein-free TAF-containing complex (TFTC) and p300 are both required for efficient transcriptional activation. *J Biol Chem*, 277(36):32875–32882.

Harrison, S. C. (1991). A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature*, 353(6346):715–719.

Hatzis, P. und Talianidis, I. (2002). Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol Cell*, 10(6):1467–1477.

Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S., und Young, R. A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell*, 2(1):43–53.

Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor. *Genes Dev*, 7(7B):1291–1308.

Herrera, F. J. und Triezenberg, S. J. (2004). VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection. *J Virol*, 78(18):9689–9696.

Hirose, Y. und Manley, J. L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev*, 14(12):1415–1429.

Hochuli, E., Dobeli, H., und Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr*, 411:177–184.

Holmes, M. C. und Tjian, R. (2000). Promoter-selective properties of the TBP-related factor TRF1. *Science*, 288(5467):867–870.

Hope, I. A. und Struhl, K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, 46(6):885–894.

Hu, X., Malik, S., Negroiu, C. C., Hubbard, K., Velalar, C. N., Hampton, B., Grosu, D., Catalano, J., Roeder, R. G., und Gnatt, A. (2006). A Mediator-responsive form of metazoan RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(25):9506–9511.

Iizuka, M. und Smith, M. I. (2003). Functional consequences of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev*, 13(2):154–160.

Ikeda, K., Steger, D. J., Eberharter, A., und Workman, J. L. (1999). Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol*, 19(1):855–863.

Ikeda, K., Stuehler, T., und Meisterernst, M. (2002). The H1 and H2 regions of the activation domain of herpes simplex virion protein 16 stimulate transcription through distinct molecular mechanisms. *Genes Cells*, 7(1):49–58.

Ingles, C. J., Shales, M., Cress, W. D., Triezenberg, S. J., und Greenblatt, J. (1991). Reduced binding of TFIID to transcriptionally compromised mutants of VP16. *Nature*, 351(6327):588–590.

Inoue, Y., Itoh, Y., Abe, K., Okamoto, T., Daitoku, H., Fukamizu, A., Onozaki, K., und H, H. (2006). Smad3 is acetylated by p300/CBP to regulate its transactivation activity. *Oncogene*. JOURNAL ARTICLE.

Ito, M., Okano, H. J., Darnell, R. B., und Roeder, R. G. (2002). The TRAP100 component of the TRAP/Mediator complex is essential in broad transcriptional events and development. *EMBO J*, 21(13):3464–3475.

Ito, M., Yuan, C. X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J. D., Yamamura, S., Fu, Z. Y., Zhang, X., Qin, J., und Roeder, R. G. (1999). Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell*, 3(3):361–370.

Ito, M., Yuan, C. X., Okano, H. J., Darnell, R. B., und Roeder, R. G. (2000). Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell*, 5(4):683–693.

Janknecht, R., Wells, N. J., und Hunter, T. (1998). TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev*, 12(14):2114–2119.

Jiang, Y., Triezenberg, S. J., und Gralla, J. D. (1994). Defective transcriptional activation by diverse VP16 mutants associated with a common inability to form open promoter complexes. *J Biol Chem*, 269(8):5505–5508.

Johnson, K. M., Wang, J., Smallwood, A., Arayata, C., und Carey, M. (2002). TFIID and human mediator coactivator complexes assemble cooperatively on promoter DNA. *Genes Dev*, 16(14):1852–1863.

Jonker, H. R. A., Wechselberger, R. W., Boelens, R., Folkers, G. E., und Kaptein, R. (2005). Structural properties of the promiscuous VP16 activation domain. *Biochemistry*, 44(3):827–839.

Juven-Gershon, T., Hsu, J.-Y., und Kadonaga, J. T. (2006). Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 6):1047–1050.

Kaiser, K. und Meisterernst, M. (1996). The human general co-factors. *Trends Biochem Sci*, 21(9):342–345.

Kaltenbach, L., Horner, M. A., Rothman, J. H., und Mango, S. E. (2000). The TBP-like factor CeTLF is required to activate RNA polymerase II transcription during C. elegans embryogenesis. *Mol Cell*, 6(3):705–713.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzel, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K., und Rosenfeld, M. G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 85(3):403–414.

Kang, Y. K., Guermah, M., Yuan, C.-X., und Roeder, R. G. (2002). The TRAP/Mediator coactivator complex interacts directly with estrogen receptors alpha and beta through the TRAP220 subunit and directly enhances estrogen receptor function in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5):2642–2647.

Kato, Y., Habas, R., Katsuyama, Y., Naar, A. M., und He, X. (2002). A component of the ARC/Mediator complex required for TGF beta/Nodal signalling. *Nature*, 418(6898):641–646.

Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, T. P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M., und Yokoyama, K. K. (1998). Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature*, 393(6682):284–289.

Kelleher, R. J. r., Flanagan, P. M., und Kornberg, R. D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell*, 61(7):1209–1215.

Kettenberger, H., Armache, K.-J., und Cramer, P. (2003). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell*, 114(3):347–357.

Kettenberger, H., Armache, K.-J., und Cramer, P. (2004). Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Mol Cell*, 16(6):955–965.

Kettenberger, H., Eisenfuhr, A., Brueckner, F., Theis, M., Famulok, M., und Cramer, P. (2006). Structure of an RNA polymerase II-RNA inhibitor complex elucidates transcription regulation by noncoding RNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13(1):44–48.

Kim, S., Xu, X., Hecht, A., und Boyer, T. G. (2006). Mediator is a transducer of Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem*, 281(20):14066–14075.

Kim, T. W., Kwon, Y.-J., Kim, J. M., Song, Y.-H., Kim, S. N., und Kim, Y.-J. (2004). MED16 and MED23 of Mediator are coactivators of lipopolysaccharide- and heat-shock-induced transcriptional activators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(33):12153–12158.

Kim, Y. J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M. H., und Kornberg, R. D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*, 77(4):599–608.

Klemm, R. D., Goodrich, J. A., Zhou, S., und Tjian, R. (1995). Molecular cloning and expression of the 32-kDa subunit of human TFIID reveals interactions with VP16 and TFIIB that mediate transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(13):5788–5792.

Kobayashi, N., Boyer, T. G., und Berk, A. J. (1995). A class of activation domains interacts directly with TFIIA and stimulates TFIIA-TFIID-promoter complex assembly. *Mol Cell Biol*, 15(11):6465–6473.

Koleske, A. J. und Young, R. A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature*, 368(6470):466–469.

Kornberg, R. D. und Lorch, Y. (2002). Chromatin and transcription: where do we go from here. *Curr Opin Genet Dev*, 12(2):249–251.

Kraus, W. L., Manning, E. T., und Kadonaga, J. T. (1999). Biochemical analysis of distinct activation functions in p300 that enhance transcription initiation with chromatin templates. *Mol Cell Biol*, 19(12):8123–8135.

Krecic, A. M. und Swanson, M. S. (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*, 11(3):363–371.

Kretzschmar, M., Kaiser, K., Lottspeich, F., und Meisterernst, M. (1994a). A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators. *Cell*, 78(3):525–534.

Kretzschmar, M., Meisterernst, M., und Roeder, R. G. (1993). Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24):11508–11512.

Kretzschmar, M., Stelzer, G., Roeder, R. G., und Meisterernst, M. (1994b). RNA polymerase II cofactor PC2 facilitates activation of transcription by GAL4-AH in vitro. *Mol Cell Biol*, 14(6):3927–3937.

Kundu, T. K., Palhan, V. B., Wang, Z., An, W., Cole, P. A., und Roeder, R. G. (2000). Activator-dependent transcription from chromatin in vitro involving targeted histone acetylation by p300. *Mol Cell*, 6(3):551–561.

Kuras, L. und Struhl, K. (1999). Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature*, 399(6736):609–613.

Kurosu, T. und Peterlin, B. M. (2004). VP16 and ubiquitin; binding of P-TEFb via its activation domain and ubiquitin facilitates elongation of transcription of target genes. *Curr Biol*, 14(12):1112–1116.

Kwok, R. P., Lundblad, J. R., Chrivia, J. C., Richards, J. P., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G., Green, M. R., und Goodman, R. H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*, 370(6486):223–226.

Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D., und Ebright, R. H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev*, 12(1):34–44.

Lariviere, L., Geiger, S., Hoeppner, S., Rother, S., Strasser, K., und Cramer, P. (2006). Structure and TBP binding of the Mediator head subcomplex Med8-Med18-Med20. *Nat Struct Mol Biol*, 13(10):895–901.

Lau, J. F., Nusinzon, I., Burakov, D., Freedman, L. P., und Horvath, C. M. (2003). Role of metazoan mediator proteins in interferon-responsive transcription. *Mol Cell Biol*, 23(2):620–628.

Lee, H., Park, U., Kim, E., und Um, S. (2007). MED25 is distinct from TRAP220/MED1 in cooperating with CBP for retinoid receptor activation. *EMBO J, advance online publication*.

Lee, T. I. und Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet*, 34:77–137.

Lemieux, K. und Gaudreau, L. (2004). Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UAS G requires the Mediator, TAF IIs, and RNA polymerase II. *EMBO J*, 23(20):4040–4050.

Lewis, B. A., Sims, R. J. r., Lane, W. S., und Reinberg, D. (2005). Functional characterization of core promoter elements: DPE-specific transcription requires the protein kinase CK2 and the PC4 coactivator. *Mol Cell*, 18(4):471–481.

Li, X. Y., Virbasius, A., Zhu, X., und Green, M. R. (1999). Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors. *Nature*, 399(6736):605–609.

Liljelund, P., Mariotte, S., Buhler, J. M., und Sentenac, A. (1992). Characterization and mutagenesis of the gene encoding the A49 subunit of RNA polymerase A in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(19):9302–9305.

Lillie, J. W., Loewenstein, P. M., Green, M. R., und Green, M. (1987). Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins. *Cell*, 50(7):1091–1100.

Lim, C. Y., Santoso, B., Boulay, T., Dong, E., Ohler, U., und Kadonaga, J. T. (2004). The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev*, 18(13):1606–1617.

Lin, Y. S. und Green, M. R. (1991). Mechanism of action of an acidic transcriptional activator in vitro. *Cell*, 64(5):971–981.

Lin, Y. S., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D., und Green, M. R. (1991). Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature*, 353(6344):569–571.

Liu, J., Akoulitchev, S., Weber, A., Ge, H., Chuikov, S., Libutti, D., Wang, X. W., Conaway, J. W., Harris, C. C., Conaway, R. C., Reinberg, D., und Levens, D. (2001a). Defective interplay of activators and repressors with TFIH in xeroderma pigmentosum. *Cell*, 104(3):353–363.

Liu, Y., Gong, W., Huang, C. C., Herr, W., und Cheng, X. (1999). Crystal structure of the conserved core of the herpes simplex virus transcriptional regulatory protein VP16. *Genes Dev*, 13(13):1692–1703.

Liu, Y., Kung, C., Fishburn, J., Ansari, A. Z., Shokat, K. M., und Hahn, S. (2004). Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. *Mol Cell Biol*, 24(4):1721–1735.

Liu, Y., Ranish, J. A., Aebersold, R., und Hahn, S. (2001b). Yeast nuclear extract contains two major forms of RNA polymerase II mediator complexes. *J Biol Chem*, 276(10):7169–7175.

Lundblad, J. R., Kwok, R. P., Laurance, M. E., Harter, M. L., und Goodman, R. H. (1995). Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature*, 374(6517):85–88.

Ma, J. und Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell*, 51(1):113–119.

Maldonado, E., Shiekhattar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C. W., Linn, S., und Reinberg, D. (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature*, 381(6577):86–89.

Malik, S., Baek, H. J., Wu, W., und Roeder, R. G. (2005). Structural and functional characterization of PC2 and RNA polymerase II-associated subpopulations of metazoan Mediator. *Mol Cell Biol*, 25(6):2117–2129.

Malik, S., Barrero, M., und Jones, T. (2007). Identification of a regulator of transcription elongation as an accessory factor for the human Mediator coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(15):6182–6187.

Malik, S., Gu, W., Wu, W., Qin, J., und Roeder, R. G. (2000). The USA-derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol Cell*, 5(4):753–760.

Malik, S. und Roeder, R. G. (2000). Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci*, 25(6):277–283.

Malik, S. und Roeder, R. G. (2005). Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci*, 30(5):256–263.

Marmorstein, R. (2001). Structure of histone acetyltransferases. *J Mol Biol*, 311(3):433–444.

Martinez, E., Palhan, V. B., Tjernberg, A., Lymar, E. S., Gamper, A. M., Kundu, T. K., Chait, B. T., und Roeder, R. G. (2001). Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol*, 21(20):6782–6795.

McManus, K. J. und Hendzel, M. J. (2001). CBP, a transcriptional coactivator and acetyltransferase. *Biochem Cell Biol*, 79(3):253–266.

Meinhart, A., Kamenski, T., Hoeppner, S., Baumli, S., und Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes Dev*, 19(12):1401–1415.

Meisterernst, M. (1999). Structure and function of proteins that modulate RNA polymerase II transcription. In Chambon, P., Fukasawa, T., Coath, C. and Kornberg, R.D. (eds.), Transcription Regulation in Eukaryotes. *Human Frontier Science Program*, VII:131–133.

Meisterernst, M. und Roeder, R. G. (1991). Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. *Cell*, 67(3):557–567.

Meisterernst, M., Stelzer, G., und Roeder, R. G. (1997). Poly(ADP-ribose) polymerase enhances activator-dependent transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(6):2261–2265.

Merino, A., Madden, K. R., Lane, W. S., Champoux, J. J., und Reinberg, D. (1993). DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature*, 365(6443):227–232.

Metivier, R., Penot, G., Hubner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., und Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, 115(6):751–763.

Mitchell, P. J. und Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, 245(4916):371–378.

Mitsiou, D. J. und Stunnenberg, H. G. (2000). TAC, a TBP-sans-TAFs complex containing the unprocessed TFIIAalphabeta precursor and the TFIIAgamma subunit. *Mol Cell*, 6(3):527–537.

Mittler, G., Kremmer, E., Timmers, H. T., und Meisterernst, M. (2001). Novel critical role of a human Mediator complex for basal RNA polymerase II transcription. *EMBO Rep*, 2(9):808–813.

Mittler, G., Stuehler, T., Santolin, L., Uhlmann, T., Kremmer, E., Lottspeich, F., Berti, L., und Meisterernst, M. (2003). A novel docking site on Mediator is critical for activation by VP16 in mammalian cells. *EMBO J*, 22(24):6494–6504.

Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Xu, H., und Leutz, A. (2004). Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta. *Mol Cell*, 13(2):241–250.

Muller, F., Lakatos, L., Dantonel, J., Strahle, U., und Tora, L. (2001). TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in zebrafish. *Curr Biol*, 11(4):282–287.

Munshi, N., Merika, M., Yie, J., Senger, K., Chen, G., und Thanos, D. (1998). Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol Cell*, 2(4):457–467.

Myers, L. C. und Kornberg, R. D. (2000). Mediator of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*, 69:729–749.

Naar, A. M., Beaurang, P. A., Robinson, K. M., Oliner, J. D., Avizonis, D., Scheek, S., Zwicker, J., Kadonaga, J. T., und Tjian, R. (1998a). Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev*, 12(19):3020–3031.

Naar, A. M., Beaurang, P. A., Zhou, S., Abraham, S., Solomon, W., und Tjian, R. (1999). Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature*, 398(6730):828–832.

Naar, A. M., Ryu, S., und Tjian, R. (1998b). Cofactor requirements for transcriptional activation by Sp1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 63:189–199.

Naar, A. M., Taatjes, D. J., Zhai, W., Nogales, E., und Tjian, R. (2002). Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes Dev*, 16(11):1339–1344.

Nedialkov, Y. A. und Triezenberg, S. J. (2004). Quantitative assessment of in vitro interactions implicates TATA-binding protein as a target of the VP16C transcriptional activation region. *Arch Biochem Biophys*, 425(1):77–86.

Neely, K. E., Hassan, A. H., Wallberg, A. E., Steger, D. J., Cairns, B. R., Wright, A. P., und Workman, J. L. (1999). Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Mol Cell*, 4(4):649–655.

Neely, K. E. und Workman, J. L. (2002). Histone acetylation and chromatin remodeling: which comes first. *Mol Genet Metab*, 76(1):1–5.

Nonet, M. L. und Young, R. A. (1989). Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of Saccharomyces cerevisiae RNA polymerase II. *Genetics*, 123(4):715–724.

Offringa, R., Gebel, S., van Dam, H., Timmers, M., Smits, A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J. L., van der Eb, A., und Herrlich, P. (1990). A novel function of the transforming domain of E1a: repression of AP-1 activity. *Cell*, 62(3):527–538.

Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., und Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87(5):953–959.

O'Hare, P. und Williams, G. (1992). Structural studies of the acidic transactivation domain of the Vmw65 protein of herpes simplex virus using 1H NMR. *Biochemistry*, 31(16):4150–4156.

Ohbayashi, T., Kishimoto, T., Makino, Y., Shimada, M., Nakadai, T., Aoki, T., Kawata, T., Niwa, S., und Tamura, T. (1999). Isolation of cDNA, chromosome mapping, and expression of the human TBP-like protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 255(1):137–142.

Ohbayashi, T., Shimada, M., Nakadai, T., Wada, T., Handa, H., und Tamura, T. (2003). Vertebrate TBP-like protein (TLP/TRF2/TLF) stimulates TATA-less terminal deoxynucleotidyl transferase promoters in a transient reporter assay, and TFIIA-binding capacity of TLP is required for this function. *Nucleic Acids Res*, 31(8):2127–2133.

Olivier, M., Aggarwal, A., Allen, J., Almendras, A. A., Bajorek, E. S., Beasley, E. M., Brady, S. D., Bushard, J. M., Bustos, V. I., Chu, A., Chung, T. R., De Witte., A., Denys, M. E., Dominguez, R., Fang, N. Y., Foster, B. D., Freudenberg, R. W., Hadley, D., Hamilton, L. R., Jeffrey, T. J., Kelly, L., Lazzeroni, L., Levy, M. R., Lewis, S. C., Liu, X., Lopez, F. J., Louie, B., Marquis, J. P., Martinez, R. A., Matsuura, M. K., Misherghi, N. S., Norton, J. A., Olshen, A., Perkins, S. M., Perou, A. J., Piercy, C., Piercy, M., Qin, F., Reif, T., Sheppard, K., Shokoohi, V., Smick, G. A., Sun, W. L., Stewart, E. A., Fernando, J., Tran, N. M., Trejo, T., Vo, N. T., Yan, S. C., Zierten, D. L., Zhao, S., Sachidanandam, R., Trask, B. J., Myers, R. M., und Cox, D. R. (2001). A high-resolution radiation hybrid map of the human genome draft sequence. *Science*, 291(5507):1298–1302.

O'Rourke, R. W., Miller, C. W., Kato, G. J., Simon, K. J., Chen, D. L., Dang, C. V., und Koeffler, H. P. (1990). A potential transcriptional activation element in the p53 protein. *Oncogene*, 5(12):1829–1832.

Pabo, C. O. und Sauer, R. T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem*, 61:1053–1095.

Park, J. M., Kim, J. M., Kim, L. K., Kim, S. N., Kim-Ha, J., Kim, J. H., und Kim, Y.-J. (2003). Signal-induced transcriptional activation by Dif requires the dTRAP80 mediator module. *Mol Cell Biol*, 23(4):1358–1367.

Park, J. M., Werner, J., Kim, J. M., Lis, J. T., und Kim, Y. J. (2001). Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock. *Mol Cell*, 8(1):9–19.

Pereira, L. A., van der. Knaap., J. A., van den. Boom., V., van den. Heuvel., F. A., und Timmers, H. T. (2001). TAF(II)170 interacts with the concave surface of TATA-binding protein to inhibit its DNA binding activity. *Mol Cell Biol*, 21(21):7523–7534.

Persengiev, S. P., Zhu, X., Dixit, B. L., Maston, G. A., Kittler, E. L. W., und Green, M. R. (2003). TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25):14887–14891.

Pinhero, R., Liaw, P., Bertens, K., und Yankulov, K. (2004). Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II. *Eur J Biochem*, 271(5):1004–1014.

Polesskaya, A., Duquet, A., Naguibneva, I., Weise, C., Vervisch, A., Bengal, E., Hucho, F., Robin, P., und Harel-Bellan, A. (2000). CREB-binding protein/p300 activates MyoD by acetylation. *J Biol Chem*, 275(44):34359–34364.

Proudfoot, N. J., Furger, A., und Dye, M. J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, 108(4):501–512.

Ptashne, M. und Gann, A. A. (1990). Activators and targets. *Nature*, 346(6282):329–331.

Rabenstein, M. D., Zhou, S., Lis, J. T., und Tjian, R. (1999). TATA box-binding protein (TBP)-related factor 2 (TRF2), a third member of the TBP family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9):4791–4796.

Rachez, C., Lemon, B. D., Suldan, Z., Bromleigh, V., Gamble, M., Naar, A. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., und Freedman, L. P. (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature*, 398(6730):824–828.

Radhakrishnan, I., Perez-Alvarado, G. C., Parker, D., Dyson, H. J., Montminy, M. R., und Wright, P. E. (1999). Structural analyses of CREB-CBP transcriptional activator-coactivator complexes by NMR spectroscopy: implications for mapping the boundaries of structural domains. *J Mol Biol*, 287(5):859–865.

Rani, P. G., Ranish, J. A., und Hahn, S. (2004). RNA polymerase II (Pol II)-TFIIF and Pol II-mediator complexes: the major stable Pol II complexes and their activity in transcription initiation and reinitiation. *Mol Cell Biol*, 24(4):1709–1720.

Ranish, J. A., Yudkovsky, N., und Hahn, S. (1999). Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIB. *Genes Dev*, 13(1):49–63.

Rebel, V. I., Kung, A. L., Tanner, E. A., Yang, H., Bronson, R. T., und Livingston, D. M. (2002). Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23):14789–14794.

Regier, J. L., Shen, F., und Triezenberg, S. J. (1993). Pattern of aromatic and hydrophobic amino acids critical for one of two subdomains of the VP16 transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(3):883–887.

Reinberg, D., Orphanides, G., Ebright, R., Akoulitchev, S., Carcamo, J., Cho, H., Cortes, P., Drapkin, R., Flores, O., Ha, I., Inostroza, J. A., Kim, S., Kim, T. K., Kumar, P., Lagrange, T., LeRoy, G., Lu, H., Ma, D. M., Maldonado, E., Merino, A., Mermelstein, F., Olave, I., Sheldon, M., Shiekhattar, R., und Zawel, L. (1998). The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 63:83–103.

Robinson, K. M. und Schultz, M. C. (2005). Gal4-VP16 directs ATP-independent chromatin reorganization in a yeast chromatin assembly system. *Biochemistry*, 44(11):4551–4561.

Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, 21(9):327–335.

Roeder, R. G. und Rutter, W. J. (1969). Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature*, 224(216):234–237.

Roeder, R. G., Schwartz, L. B., und Sklar, V. E. (1976). Function, structure, and regulation of eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Symp Soc Dev Biol*, (34):29–52.

Ryu, S., Zhou, S., Ladurner, A. G., und Tjian, R. (1999). The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature*, 397(6718):446–450.

Saiki, R. K., Chang, C. A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian, H. H. J., und Erlich, H. A. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med*, 319(9):537–541.

Sakurai, H. und Fukasawa, T. (2000). Functional connections between mediator components and general transcription factors of Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem*, 275(47):37251–37256.

Samuelsen, C. O., Baraznenok, V., Khorosjutina, O., Spahr, H., Kieselbach, T., Holmberg, S., und Gustafsson, C. M. (2003). TRAP230/ARC240 and TRAP240/ARC250 Mediator subunits are functionally conserved through evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11):6422–6427.

Sato, S., Tomomori-Sato, C., Banks, C. A. S., Parmely, T. J., Sorokina, I., Brower, C. S., Conaway, R. C., und Conaway, J. W. (2003a). A mammalian homolog of Drosophila melanogaster transcriptional coactivator intersex is a subunit of the mammalian Mediator complex. *J Biol Chem*, 278(50):49671–49674.

Sato, S., Tomomori-Sato, C., Banks, C. A. S., Sorokina, I., Parmely, T. J., Kong, S. E., Jin, J., Cai, Y., Lane, W. S., Brower, C. S., Conaway, R. C., und Conaway, J. W. (2003b). Identification of mammalian Mediator subunits with similarities to yeast Mediator subunits Srb5, Srb6, Med11, and Rox3. *J Biol Chem*, 278(17):15123–15127.

Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T. J., Florens, L., Zybailov, B., Swanson, S. K., Banks, C. A. S., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M. P., Conaway, J. W., und Conaway, R. C. (2004). A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell*, 14(5):685–691.

Seipel, K., Georgiev, O., und Schaffner, W. (1992). Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions. *EMBO J*, 11(13):4961–4968.

Seipel, K., Georgiev, O., und Schaffner, W. (1994). A minimal transcription activation domain consisting of a specific array of aspartic acid and leucine residues. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375(7):463–470.

Shikama, N., Chan, H. M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Lee, C. W., Cairns, W., und La Thangue, N. B. (2000). Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators. *Mol Cell Biol*, 20(23):8933–8943.

Singh, O. P. (2001). Functional diversity of hnRNP proteins. *Indian J Biochem Biophys*, 38(3):129–134.

Smale, S. T., Schmidt, M. C., Berk, A. J., und Baltimore, D. (1990). Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12):4509–4513.

Soutoglou, E., Katrakili, N., und Talianidis, I. (2000). Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol Cell*, 5(4):745–751.

Soutoglou, E. und Talianidis, I. (2002). Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science*, 295(5561):1901–1904.

Stelzer, G., Goppelt, A., Lottspeich, F., und Meisterernst, M. (1994). Repression of basal transcription by HMG2 is counteracted by TFIIH-associated factors in an ATP-dependent process. *Mol Cell Biol*, 14(7):4712–4721.

Sterner, D. E. und Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(2):435–459.

Stevens, J. L., Cantin, G. T., Wang, G., Shevchenko, A., Shevchenko, A., und Berk, A. J. (2002). Transcription control by E1A and MAP kinase pathway via Sur2 mediator subunit. *Science*, 296(5568):755–758.

Stringer, K. F., Ingles, C. J., und Greenblatt, J. (1990). Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature*, 345(6278):783–786.

Studier, F.W. und Moffatt, B. (1986). CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *J. Mol. Biol.*, 189:113–130.

Sudarsanam, P. und Winston, F. (2000). The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet*, 16(8):345–351.

Sullivan, S. M., Horn, P. J., Olson, V. A., Koop, A. H., Niu, W., Ebright, R. H., und Triezenberg, S. J. (1998). Mutational analysis of a transcriptional activation region of the VP16 protein of herpes simplex virus. *Nucleic Acids Res*, 26(19):4487–4496.

Sun, X., Zhang, Y., Cho, H., Rickert, P., Lees, E., Lane, W., und Reinberg, D. (1998). NAT, a human complex containing Srb polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription. *Mol Cell*, 2(2):213–222.

Taatjes, D. J., Marr, M. T., und Tjian, R. (2004a). Regulatory diversity among metazoan coactivator complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(5):403–410.

Taatjes, D. J., Naar, A. M., Andel, F. r., Nogales, E., und Tjian, R. (2002). Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science*, 295(5557):1058–1062.

Taatjes, D. J., Schneider-Poetsch, T., und Tjian, R. (2004b). Distinct conformational states of nuclear receptor-bound CRSP-Med complexes. *Nat Struct Mol Biol*, 11(7):664–671.

Taatjes, D. J. und Tjian, R. (2004). Structure and function of CRSP/Med2; a promoter-selective transcriptional coactivator complex. *Mol Cell*, 14(5):675–683.

Takagi, Y., Calero, G., Komori, H., Brown, J. A., Ehrensberger, A. H., Hudmon, A., Asturias, F., und Kornberg, R. D. (2006). Head module control of mediator interactions. *Mol Cell*, 23(3):355–364.

Takagi, Y. und Kornberg, R. D. (2006). Mediator as a general transcription factor. *J Biol Chem*, 281(1):80–89.

Tanaka, Y., Naruse, I., Hongo, T., Xu, M., Nakahata, T., Maekawa, T., und Ishii, S. (2000). Extensive brain hemorrhage and embryonic lethality in a mouse null mutant of CREB-binding protein. *Mech Dev*, 95(1-2):133–145.

Teichmann, M., Wang, Z., Martinez, E., Tjernberg, A., Zhang, D., Vollmer, F., Chait, B. T., und Roeder, R. G. (1999). Human TATA-binding protein-related factor-2 (hTRF2) stably associates with hTFIIA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24):13720–13725.

Teufel, D. P., Freund, S. M., Bycroft, M., und Fersht, A. R. (2007). Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(17):7009–7014.

Thomas, M. C. und Chiang, C.-M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 41(3):105–178.

Thompson, C. M., Koleske, A. J., Chao, D. M., und Young, R. A. (1993). A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell*, 73(7):1361–1375.

Titz, B., Thomas, S., Rajagopala, S. V., Chiba, T., Ito, T., und Uetz, P. (2006). Transcriptional activators in yeast. *Nucleic Acids Res*, 34(3):955–967.

Tokusumi, Y., Ma, Y., Song, X., Jacobson, R. H., und Takada, S. (2007). The new core promoter element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters. *Mol Cell Biol*, 27(5):1844–1858.

Triezenberg, S. J. (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev*, 5(2):190–196.

Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C., und McKnight, S. L. (1988). Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev*, 2(6):718–729.

Tumbar, T., Sudlow, G., und Belmont, A. S. (1999). Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J Cell Biol*, 145(7):1341–1354.

Uesugi, M., Nyanguile, O., Lu, H., Levine, A. J., und Verdine, G. L. (1997). Induced alpha helix in the VP16 activation domain upon binding to a human TAF. *Science*, 277(5330):1310–1313.

Uhlmann, T., Boeing, S., Lehmbacher, M., und Meisterernst, M. (2007). The VP16 Activation Domain Establishes an Active Mediator Lacking CDK8 in Vivo. *J Biol Chem*, 282(4):2163–2173.

Utley, R. T., Ikeda, K., Grant, P. A., Cote, J., Steger, D. J., Eberharter, A., John, S., und Workman, J. L. (1998). Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature*, 394(6692):498–502.

van de Peppel, J., Kettelarij, N., van Bakel, H., Kockelkorn, T. T. J. P., van Leenen, D., und Holstege, F. C. P. (2005). Mediator expression profiling epistasis reveals a signal transduction pathway with antagonistic submodules and highly specific downstream targets. *Mol Cell*, 19(4):511–522.

Veenstra, G. J., Weeks, D. L., und Wolffe, A. P. (2000). Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in Xenopus. *Science*, 290(5500):2312–2315.

Verrijzer, C. P. und Tjian, R. (1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem Sci*, 21(9):338–342.

Walker, S., Greaves, R., und O'Hare, P. (1993). Transcriptional activation by the acidic domain of Vmw65 requires the integrity of the domain and involves additional determinants distinct from those necessary for TFIIB binding. *Mol Cell Biol*, 13(9):5233–5244.

Waltzer, L. und Bienz, M. (1998). Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature*, 395(6701):521–525.

Wang, C., McCarty, I. M., Balazs, L., Li, Y., und Steiner, M. S. (2002). A prostate-derived cDNA that is mapped to human chromosome 19 encodes a novel protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 296(2):281–287.

Wang, G., Balamotis, M. A., Stevens, J. L., Yamaguchi, Y., Handa, H., und Berk, A. J. (2005a). Mediator requirement for both recruitment and postrecruitment steps in transcription initiation. *Mol Cell*, 17(5):683–694.

Wang, G. und Berk, A. J. (2002). In vivo association of adenovirus large E1A protein with the human mediator complex in adenovirus-infected and -transformed cells. *J Virol*, 76(18):9186–9193.

Wang, R., Cherukuri, P., und Luo, J. (2005b). Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *J Biol Chem*, 280(12):11528–11534.

Wang, W. (2003). The SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers: similar mechanisms for diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol*, 274:143–169.

Werner, M., Hermann-Le Denmat, S., Treich, I., Sentenac, A., und Thuriaux, P. (1992). Effect of mutations in a zinc-binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association. *Mol Cell Biol*, 12(3):1087–1095.

West, A. G. und Fraser, P. (2005). Remote control of gene transcription. *Hum Mol Genet*, 14 Spec No 1:101–111.

Westover, K. D., Bushnell, D. A., und Kornberg, R. D. (2004a). Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell*, 119(4):481–489.

Westover, K. D., Bushnell, D. A., und Kornberg, R. D. (2004b). Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science*, 303(5660):1014–1016.

Wolffe, A. P. (1994). Transcription: in tune with the histones. *Cell*, 77(1):13–16.

Wong, H. K. und Ziff, E. B. (1994). Complementary functions of E1a conserved region 1 cooperate with conserved region 3 to activate adenovirus serotype 5 early promoters. *J Virol*, 68(8):4910–4920.

Workman, J. L., Abmayr, S. M., Cromlish, W. A., und Roeder, R. G. (1988). Transcriptional regulation by the immediate early protein of pseudorabies virus during in vitro nucleosome assembly. *Cell*, 55(2):211–219.

Woychik, N. A. und Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*, 108(4):453–463.

Wu, S.-Y., Zhou, T., und Chiang, C.-M. (2003). Human mediator enhances activator-facilitated recruitment of RNA polymerase II and promoter recognition by TATA-binding protein (TBP) independently of TBP-associated factors. *Mol Cell Biol*, 23(17):6229–6242.

Wysocka, J. und Herr, W. (2003). The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem Sci*, 28(6):294–304.

Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J. L., Triezenberg, S. J., Reinberg, D., Flores, O., und Ingles, C. J. (1994). Binding of basal transcription factor TFIIH to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol*, 14(10):7013–7024.

Yang, F., DeBeaumont, R., Zhou, S., und Naar, A. M. (2004). The activator-recruited cofactor/Mediator coactivator subunit ARC92 is a functionally important target of the VP16 transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8):2339–2344.

Yang, F., Vought, B. W., Satterlee, J. S., Walker, A. K., Jim Sun, Z.-Y., Watts, J. L., DeBeaumont, R., Saito, R. M., Hyberts, S. G., Yang, S., Macol, C., Iyer, L., Tjian, R., van den Heuvel, S., Hart, A. C., Wagner, G., und Naar, A. M. (2006). An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis. *Nature*, 442(7103):700–704.

Yang, Z., Yik, J. H. N., Chen, R., He, N., Jang, M. K., Ozato, K., und Zhou, Q. (2005). Recruitment of P-TEFb for Stimulation of Transcriptional Elongation by the Bromodomain Protein Brd4. *Mol Cell*, 19(4):535–545.

Yankulov, K., Blau, J., Purton, T., Roberts, S., und Bentley, D. L. (1994). Transcriptional elongation by RNA polymerase II is stimulated by transactivators. *Cell*, 77(5):749–759.

Yao, T. P., Oh, S. P., Fuchs, M., Zhou, N. D., Ch'ng, L. E., Newsome, D., Bronson, R. T., Li, E., Livingston, D. M., und Eckner, R. (1998). Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell*, 93(3):361–372.

Yoon, S., Qiu, H., Swanson, M. J., und Hinnebusch, A. G. (2003). Recruitment of SWI/SNF by Gcn4p does not require Snf2p or Gcn5p but depends strongly on SWI/SNF integrity, SRB mediator, and SAGA. *Mol Cell Biol*, 23(23):8829–8845.

Young, R. A. (1991). RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*, 60:689–715.

Yu, F., White, S. B., Zhao, Q., und Lee, F. S. (2001). HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(17):9630–9635.

Yuan, C. X., Ito, M., Fondell, J. D., Fu, Z. Y., und Roeder, R. G. (1998). The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor- associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(14):7939–7944.

Yuan, L. W. und Giordano, A. (2002). Acetyltransferase machinery conserved in p300/CBP-family proteins. *Oncogene*, 21(14):2253–2260.

Yudkovsky, N., Ranish, J. A., und Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature*, 408(6809):225–229.

Zawel, L. und Reinberg, D. (1995). Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu Rev Biochem*, 64:533–561.

Zhang, W. und Bieker, J. J. (1998). Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(17):9855–9860.

Zhang, X., Krutchinsky, A., Fukuda, A., Chen, W., Yamamura, S., Chait, B. T., und Roeder, R. G. (2005). MED1/TRAP220 exists predominantly in a TRAP/ Mediator subpopulation enriched in RNA polymerase II and is required for ER-mediated transcription. *Mol Cell*, 19(1):89–100.

Zhou, H., Kim, S., Ishii, S., und Boyer, T. G. (2006). Mediator modulates Gli3-dependent Sonic hedgehog signaling. *Mol Cell Biol*, 26(23):8667–8682.

Zhu, H., Joliot, V., und Prywes, R. (1994). Role of transcription factor TFIIF in serum response factor-activated transcription. *J Biol Chem*, 269(5):3489–3497.

Zhu, X., Wiren, M., Sinha, I., Rasmussen, N. N., Linder, T., Holmberg, S., Ekwall, K., und Gustafsson, C. M. (2006). Genome-wide occupancy profile of mediator and the Srb8-11 module reveals interactions with coding regions. *Mol Cell*, 22(2):169–178.

8 Anhang

Homologievergleich von MED25 mit p78 und ARC92:

```
          1                                                   50
MED25      MVPGSEGPAR AGSVVADVVF VIEGTANLGP YFEGLRKHYL LPAIEYFNGG
P78        MVPGSEGPAR AGSVVADVVS VIEGTANLGP YFEGLRKHYL LPAIEYFNGG
ARC92      MVPGSEGPAR AGSVVADVVF VIEGTANLGP YFEGLRKHYL LPAIEYFNGG

          51                                                  100
MED25      PPAETDFGGD YGGTQYSLVV FNTVDCAPES YVQCHAPTSS AYEFVTWLDG
P78        PPAETDFGGD YGGTQYSLVV FNTVDCAPES YVQCHAPTSS AYEFVTWLDG
ARC92      PPAETDFGGD YGGTQYSLVV FNTVDCAPES YVQCHAPTSS AYEFVTWLDG

         101                                                  150
MED25      IKFMGGGGES CSLIAEGLST ALQLFDDFKK MREQIGQTHR VCLLICNSPP
P78        IKFMGGGGES CSLIAEGLST ALQLFDDFKK MREQIGQTHR VCLLICNSPP
ARC92      IKFMGGGGES CSLIAEGLST ALQLFDDFKK MREQIGQTHR VCLLICNSPP

         151                                                  200
MED25      YLLPAVESTT YSGCTTENLV QQIGERGIHF SIVSPRKLPA LRLLFEKAAP
P78        YLLPAVESTT YSGCTTENLV QQIGERGIHF SIVSPRKLPA LRLLFEKAAP
ARC92      YLLPAVESTT YSGCTTENLV QQIGERGIHF SIVSPRKLPA LRLLFEKAAP

         201                                                  250
MED25      PALLEPLQPP TDVSQDPRHM VLVRGLVLPV GGGSALGPLQ SKQPVPLPPA
P78        PALLEPLQPP TDVSQDPRHM VLVRGLVLPV GGGSAPGPLQ SKQPVPLPPA
ARC92      PALLEPLQPP TDVSQDPRHM VLVRGLVLPV GGGSAPGPLQ SKQPVPLPPA

         251                                                  300
MED25      APSGATLSAA PQQPLPPVPP QYQVPGNLSA AQVAAQNAVE AAKNQKAGLG
P78        APSGATLSAA PQQPLPPIPP QYQVPGNLSA AQVAAQNAVE AAKNQKAGLG
ARC92      APSGATLSAA PQQPLPPVPP QYQVPGNLSA AQVAAQNAVE AAKNQKAGLG

         301                                                  350
MED25      PRFSPITPLQ QAAPGVGPPF SQAPAPQLPP GPPGAPKPPP ASQPSLVSTV
P78        PRFSPITPLQ QAAPGVGPPF SQAPAPQLPP GPPGAPKPPP ASQPSLVSTV
ARC92      PRFSPITPLQ QAAPGVGPPF SQAPAPQLPP GPPGAPKPPP ASQPSLVSTV

         351                                                  400
MED25      APGSGLAPTA QPGAPSMAGT VAPGGVSGPS PAQLGAPALG GQQSVSNKLL
P78        APGSGLAPTA QPGAPSMAGT VAPGGVSGPS PAQLGAPALG GQQSVSNKLL
ARC92      APGSGLAPTA QPGAPSMAGT VAPGGVSGPS PAQLGAPALG GQQSVSNKLL

         401                                                  450
MED25      AWSGVLEWQE KPKPASVDAN TKLTRSLPCQ VYVNHGENLK TEQWPQKLIM
P78        AWSGVLEWQE KPKPASVDAN TKLTRSLPCQ VYVNHGENLK TEQWPQKLIM
ARC92      AWSGVLEWQE KPKPASVDAN TKLTRSLPCQ VYVNHGENLK TEQWPQKLIM

         451                                                  500
MED25      QLIPQQLLTT LGPLFRNSRM VQFHFTNKDL ESLKGLYRIM GNGFAGCVHF
P78        QLIPQQLLTT LGPLFRNSRM VQFHFTNKDL ESLKGLYRIM GNGFAGCVHF
ARC92      QLIPQQLLTT LGPLFRNSRM VQFHFTNKDL ESLKGLYRIM GNGFAGCVHF

         501                                                  550
MED25      PHTAPCEVRV LMLLYSSKKK IFMGLIPYDQ SGFVNGIRQV ITNHKQVQQQ
P78        PHTAPCEVRV LMLLYSSKKK IFMGLIPYDQ SGFVNGIROV ITNHKQVQQQ
ARC92      PHTAPCEVRV LMLMYSSKKK IFMGLIPYDQ SGFVNDIRQV ITNHKQVQQQ
```

```
          551                                                       600
MED25      KLEQQQRGMG GQQAPPGLGP ILEDQARPSQ NLLQLRPPQP QPQGTVGASG
P78        KLEQQQRGMG GQQAPPGLGP ILEDQARPSQ NLLQLRPPQP QPQGTVGASG
ARC92      KLEQQQRGMG GQQAPPGLGP ILEDQARPSQ NLLQLRPPQP QPQGTVGASG

          601                                                       650
MED25      ATGQPQPQGT AQPPPGAPQG PPGAASGPPP PGPILRPQNP GANPQLRSLL
P78        ATGQPQPQGT AQPPPGAPQG PPGAASGPPP PGPILRPQNP GANPQLRSLL
ARC92      ATGQPQPQGT AQPPPGAPQG PPGAASGPPP PGPILRPQNP GANPQLRSLL

          651                                                       700
MED25      LNPPPPQTGV PPPQASLHHL PSPGPHNFPL GLHCQVRGPG GGQRSGLSVP
P78        LNPPPPQTGV PPPQASLHHL QPPG...APA LLPPPHQGLG QPQLGPPLLH
ARC92      LNPPPPQTGV PPPQASLHHL QPPG...APA LLPPPHQGLG QPQLGPPLLH

          701                                                       750
ACID1      AAPGLEHQDQ VLLGSKDIGS KNE.GSPSRA CSPASWRTTS SWISSESPTP
P78        PPPAQFWPAQ LPPRAPLPGQ MLLSGGP.RG PVPQPGLQPS ..VMEDDILM
ARC92      PPPPATRGSC AAASAAPGPG AAPVGAPTPA STTCPVLART TSPSGSTASG

          751
ACID1      NKVPF
P78        DLI~~
ARC92      KTKERRRGPC VSRKMGASLF LCGSEEHAYV FNMQTNRVCV ERIQPETPL
```

Abbildung 27: Homologievergleich von MED25 mit den publizierten Spleißvarianten p78 (NCBI accession number AF261072) und ARC92 (NCBI accession number AY533507). Identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

Lebenslauf

Name:	Thomas Manfred Stühler
Geburtsort:	Würzburg
Geburtsdatum:	16.12.1971
Familienstand:	unverheiratet
Nationalität:	deutsch

Dissertation

2000–2007	Anfertigung der Promotionsarbeit im Labor von Herrn Prof. Dr. M. Meisterernst am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München und am Hämatologikum der Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit GmbH (GSF) in München Thema: Die Vermittlung der Transkriptionsregulation des viralen Aktivators VP16 durch Cofaktoren

Studium

1992–2000	Chemiestudium an der Universität Regensburg bis zum Vordiplom und der Ludwig-Maximilians-Universität in München bis zum Hauptdiplom Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. M. Meisterernst am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München Thema: Affinitätsreinigung von humanen Mediatorkomplexen über den viralen Aktivator VP16

Schulbildung

1978–1983	Grundschule in Burgkirchen
1983–1992	Kurfürst-Maximilian-Gymnasium in Burghausen Abschluß: Allgemeine Hochschulreife