

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

**Molekularbiologische Analysen
zur Regulation
des T-Zell-Rezeptor- β -Lokus**

von
Andreas Herbst
aus Halle/Saale
2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Michael Meisterernst betreut und zwischen November 2002 und Juli 2006 am Hämatologikum der GSF München angefertigt.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 07.10.2007

Andreas Herbst

Dissertation eingereicht am 11.10.2007

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Meisterernst
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Förstemann

Mündliche Prüfung am 17.12.2007

DANKSAGUNGEN

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Meisterernst sehr herzlich für die Betreuung meiner Arbeit und die vielen fachlichen Anregungen in dieser Zeit. Die hohe wissenschaftliche Kreativität und die ausgezeichnete materielle Ausstattung der Arbeitsgruppe haben diese Arbeit wesentlich erleichtert.

Herrn Prof. Dr. Klaus Förstemann danke ich für die Bereitschaft die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Albert der mich nicht nur in wissenschaftlichen Fragestellungen wiederholt unterstützt hat, sondern mir auch bei der Lösung technischer Fragen Hilfestellung gab.

Ebenso danke ich Frau Gertraud Stelzer für viele wissenschaftlich anregende Gespräche und so manchen Hinweis technischer Natur. Auch die Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit mit Frau Christine Göbel hat mir sehr geholfen.

Den gesamten Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Meisterernst danke ich für ein sehr angenehmes Arbeitsklima, für die Unterstützung bei Experimenten und so manchen lustigen Abend.

Meinen Eltern danke ich für ihre jahrelange Unterstützung und ihr Vertrauen in mich. Ihr Lebensweg und das Glück solche Eltern zu haben waren mir immer Ansporn mich weiterzuentwickeln. Meiner Frau danke ich besonders für ihr Verständnis und ihre Unterstützung auch in schwierigen Phasen der Arbeit.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Transkription in Eukaryoten	1
1.2	Transkription und Chromatin	2
1.2.1	Posttranskriptionale Histon-Modifikationen	2
1.2.1.1	Histon-Methyltransferasen	3
1.2.1.2	Histon-Acetyltransferasen	4
1.3	Die Struktur proteinkodierender Gene	5
1.4	Enhancer-Elemente	6
1.4.1	Funktionsweise distaler Enhancer	7
1.5	Die RNA-Polymerase II	8
1.6	Die Initiation der Transkription	9
1.7	Die Elongation der Transkription	10
1.8	Generelle Transkriptionscofaktoren	11
1.9	Die Prozessierung der RNA	12
1.9.1	Das Capping	12
1.9.2	Das Spleißen	13
1.9.3	Die Polyadenylierung	14
1.9.4	Kombinatorische Interaktionen	15
1.9.5	Transkription und mRNA-Prozessierung	16
1.10	mRNA Qualitäts-Kontrollmechanismen	17
1.11	Nichtkodierende RNA	18
1.11.1	<i>Antisense</i> Transkripte	19
1.12	Der T-Zell-Rezeptor	20
1.12.1	Die Rekombination des T-Zell-Rezeptor- β -Lokus	21
1.12.2	Der T-Zell-Rezeptor- β -Lokus	23
1.13	Ausgangssituation und Fragestellung	25
2	Material	26
2.1	Geräte und Hilfsmittel	26
2.2	Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	28

2.3	Chemikalien	29
2.4	Enzyme	32
2.5	Oligodesoxyribonukleotide	33
2.5.1	Oligodesoxyribonukleotide der Transkriptanalysen	34
2.5.2	Oligodesoxyribonukleotide der CHIP-Analysen	35
2.6	BAC Klone	35
2.7	Antikörper	36
2.8	Plasmid-Vektoren	37
2.9	Eß Fragment Sequenzen	37
2.10	Eukaryotische Zelllinien	37
2.11	DNA-Längenstandards	38
3	Methoden	39
3.1	Prokaryotische Zellkultur	39
3.2	Prokaryotische Dauerkulturen	39
3.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i>	39
3.4	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i>	40
3.5	Eukaryotische Zellkultur	41
3.5.1	Kultivierung humaner Zelllinien	41
3.5.2	Elektroporation	41
3.5.3	Auswertung der Transfektion	42
3.5.4	Herstellung stabiler Zelllinien mittels episomaler Vektoren	43
3.6	DNA- und RNA-Arbeitstechniken	44
3.6.1	RNA- und Plasmid-DNA-Präparation	44
3.6.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	45
3.6.3	Reverse Transkription	45
3.6.4	Quantitative PCR	46
3.6.5	Amplifikation von DNA mittels PCR	48
3.6.6	Kolonie-PCR	49
3.6.7	Restriktionsspaltung	49
3.6.8	Phenolchloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren	49
3.6.9	Ligation von DNA	50
3.6.10	Agarose-Gelelektrophorese	50

3.6.11	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	51
3.6.12	DNase Behandlung von RNA	51
3.7	Chromatin-Immunopräzipitation	52
4	Ergebnisse	60
4.1	Vergleichende Transkriptanalysen am TCR β -Lokus	60
4.1.1	Ungespleißte Transkripte sind sowohl an V β 12-3, als auch an V β 11-3 detektierbar	62
4.1.2	Ausschließlich V β 12-3 Transkripte werden gespleißt	64
4.2	Analysen zur Stabilität von Transkripten	67
4.2.1	V β 11-3 Transkripte werden nicht durch NMD bzw. <i>non-stop decay</i> abgebaut	68
4.2.2	V β 11-3 und V β 12-3 Primärtranskripte sind vergleichbar stabil	69
4.3	Analysen zu Transkripten des oberen und unteren DNA-Stranges	70
4.3.1	An den Gensegmenten V β 11-3, V β 12-3 und V β 30 können <i>antisense</i> Transkripte detektiert werden	72
4.3.2	Intergenische Transkripte des Enhancers E β	74
4.4	Intergenische und Allel-spezifische Transkriptanalysen	76
4.5	Insulator-Analysen	77
4.5.1	Das Insulator-Testsystem	79
4.5.2	Der Bereich zwischen V β 11-3 und V β 12-3 zeigt keine Insulatorfunktion, bewirkt jedoch starke Transkriptionsaktivierung	81
4.6	Histon-Besetzung und Histon-Modifikationen am TCR β -Lokus	84
4.7	Besetzung der RNA-Polymerase II am TCR β -Lokus	85
4.8	Der Einfluß des 3'-Bereichs der V β -Transkripte auf die Genregulation	86
4.8.1	Funktionelle Analyse der polyA-Stellen	87
4.8.1.1	Identifizierung hoch konservierter Elemente der TCR β -Polyadenylierungsstellen	88
4.9	Analysen zur Interaktion von E β mit dem V β 12-3 Promoter	92
4.9.1	E β enthält sowohl aktivierende als auch reprimierende Elemente	93
5	Diskussion	95
5.1	Die V β 12-3 Transkripte werden effizient prozessiert	95
5.2	Vergleichbare Stabilität der V β 11-3 und V β 12-3 Primärtranskripte	96

5.3	V β 12-3 Transkripte innerhalb des ORFs zeigen unterschiedliche Abundanz	96
5.4	Am TCR β -Lokus sind <i>sense</i> und <i>antisense</i> Transkripte nachweisbar	97
5.4.1	E β als Promotor von <i>antisense</i> Transkripten	98
5.4.2	Die Funktion von <i>antisense</i> Transkripten am TCR β -Lokus	99
5.5	Die Besetzung der RNA Polymerase II an V β 11-3, V β 12-3 und V β 30 spiegelt die Transkript-Fließgleichgewichte	100
5.6	Die Histon H3 Besetzung und H3 Methylierung am TCR β -Lokus	102
5.6.1	Die Histon H3 Besetzung	102
5.6.2	Die H3K4 Dimethylierung	103
5.6.3	Die H3K4 Trimethylierung	104
5.7	Insulator-Elemente begrenzen nicht das funktionale Gensegment	105
5.8	Funktionelle Analyse konservierter Elemente der TCR β -Polyadenylierungsstellen	107
5.8.1	Episomale Transkripte werden nur ineffizient gespleißt	108
5.9	Analysen zur Interaktion von E β mit dem V β 12-3 Corepromoter	110
5.10	Der TCR β -Lokus wird auf der Ebene der Transkription und der Prozessierung reguliert	111
6	Zusammenfassung	114
7	Literatur-Verzeichnis	116
8	Anhang	131

1 Einleitung

1.1 Transkription in Eukaryoten

Die genetische Information ist in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Zellkern gespeichert. Dabei kodiert die DNA in Form von Genen die Gesamtheit der Proteine eines Lebewesens. Der Fluß der genetischen Information, ausgehend von den Genen bis zum Protein, wird durch Ribonukleinsäure (RNA) vermittelt. Dabei wird zunächst die Information der Gene in RNA umgeschrieben (transkribiert). Anschließend erfolgt die Modifikation der gebildeten RNA. Durch verschiedene Prozesse wird dabei aus der heterogenen nukleären RNA (hnRNA) Boten- oder auch *messenger* RNA (mRNA). Der Vorgang der RNA-Reifung wird auch als Prozessierung bezeichnet. Durch die Prozessierung der mRNA werden sowohl nicht kodierende Bereiche des Moleküls entfernt, als auch die Enden der mRNA modifiziert. Im Gegensatz zur DNA, die in ihrer Kopienzahl pro Zelle festgelegt ist, kann die Abundanz der mRNA in Abhängigkeit von Umweltbedingungen, Entwicklungsstadien und Gewebetypen mehrzelliger Organismen erheblich variieren. Somit kann auf unterschiedliche Anforderungen schnell durch die Regulation wichtiger Proteine reagiert werden (Berg, 2003). Nach der Prozessierung werden die mRNA-Moleküle von dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert, wo die Translation stattfindet. Die Translation übersetzt die Information der mRNA mit Hilfe der Ribosomen in die Primärstruktur der Proteine.

Die Regulation der eukaryotischen Transkription ist sehr präzise kontrolliert und stellt die Grundlage für die hohe Komplexität mehrzelliger Organismen dar. Von der Transkription der DNA (Zellkern) bis zu der Translation der RNA (Zytoplasma) sind mehrere tausend Proteine beteiligt, die Teil eines komplexen, regulatorischen Netzwerkes sind. Dabei können die beteiligten Proteine die Art und Anzahl der Modifikationen sowie die Stabilität der RNA-Moleküle beeinflussen. Aufgrund dieser posttranskriptionalen Regulation besteht auch nur eine schwache Korrelation zwischen der mRNA- und der Proteinmenge (Anderson und Seilhamer, 1997).

1.2 Transkription und Chromatin

Die DNA liegt im Zellkern eukaryotischer Zellen in Nukleoproteinkomplexen, den Chromosomen, verpackt vor. Die DNA eines Chromosoms erreicht in ausgestreckter Form eine Länge von mehreren Zentimetern. Da eukaryotische Zellen jedoch um mehrere Größenordnungen kleiner sind, ist die DNA im Zellkern hochgradig verpackt. Die kleinste Verpackungseinheit bildet dabei das Nukleosom, wobei 146 Basenpaare (bp) um ein Oktamer aus Histon-Molekülen gewickelt sind. Das Histon-Oktamer ist zylindrisch und besteht aus einem Histon H3/H4-Tetramer und zwei H2A/H2B-Dimeren. Die DNA beschreift um diesen Histon-Kern 1,65 Windungen. Zwischen den Nukleosomen bindet das Linker-Histon H1 an die 10-60 bp lange DNA, was zu einer weiteren Komprimierung beiträgt. Die DNA stellt in kondensierter Form eine 30 nm Fibrille dar, die an im Zickzack-Muster angeordnete Nukleosomen gebunden ist. Somit wird die DNA um den Faktor 40 komprimiert. Eine weitere Verdichtung der DNA auf den Faktor 250 wird durch weitere Strukturanordnungen erreicht. Eine dieser Strukturen ist die Chromatinschleife, welche zu Chromatindomänen angeordnet ist. Die Chromatindomänen werden mit Hilfe von Proteinen des Chromosomengerüsts zu Chromosomen verpackt (Naar, Lemon et al., 2001). Eine Hauptkomponente des Chromosomengerüsts ist das Enzym Topoisomerase II, welches auch zur Verdrillung der DNA beiträgt. Darüber hinaus sind auch HMG- und SIR-Proteine in der Lage weitere DNA-Strukturen zu bilden. Alle DNA-gebundenen Prozesse, wie Replikation und Transkription, finden eingebettet in einer Chromatinumgebung statt. Unter ATP-Verbrauch verändern dabei verschiedene Chromatin-Umformungskomplexe die Chromatinstrukturen und öffnen somit auch das Chromatin für die Bindung der Transkriptionsmaschine.

Die Histone sind aus einer globulären Domäne und einem Histon-Schwanz aufgebaut. Dieser Histon-Schwanz ist dabei das Ziel posttranslationaler Modifikationen. Die Art der chromosomalen Histon-Modifikationen tragen zu der Bildung lokaler Chromatindomänen bei, welche in Euchromatin (transkriptionsaktiv) und Heterochromatin (transkriptionsinaktiv) eingeteilt werden können.

1.2.1 Posttranskriptionale Histon-Modifikationen

Histone können auf unterschiedliche Weise posttranskriptional modifiziert werden. Die Modifikationen beziehen sich in erster Linie auf das unstrukturierte N-terminale Ende der

Histone. Dieser Histon-Schwanz kann an Lysin- und Argininresten methyliert oder acetyliert, an Serin- und Threoninresten phosphoryliert sowie an Lysinresten ubiquitiniert, sumoyliert und ribosyliert werden. Die Methylierung von Lysinen kommt dabei als Mono-, Di- oder Trimethylierung vor. Auch an Argininresten sind Mono- und Dimethylierung beschrieben worden (Peterson und Laniel, 2004). Der Zusammenhang zwischen bestimmten Histon-Modifikationen und unterschiedlichen Transkriptionsaktivitäten führte zu der Theorie des Histon-Codes (Jenuwein und Allis, 2001; Strahl und Allis, 2000). Der Histon-Code ist nicht universell und wird von Enzymen gebildet die bemerkenswerte Substratspezifität aufweisen. Die Acetylierung von Lysin K9 und K14 des Histons H3 ist ein Marker für regulative Bereiche der Transkription und besonders an Promotoren beobachtet wurden (Liang, Lin et al., 2004). Die Acetylierung von H3K14 steht im Zusammenhang mit der Plattformbildung von Transkriptions-Initiationskomplexen. Damit ist die H3K14 Acetylierung ebenfalls ein positiver Marker der Transkription (Agalioti, Chen et al., 2002). Die Kombination aus H4K8 und H3K14 Acetylierung sowie H3S10 Phosphorylierung ist ebenfalls mit aktiver Transkription korreliert. Die H3K4 Methylierung charakterisiert hingegen Bereiche im Genom die für aktive Transkription bereit stehen (Santos-Rosa, Schneider et al., 2002; Schneider, Bannister et al., 2004). Die H3K4 Trimethylierung wurde vor allem im 5'-Bereich transkribierter Gene beschrieben (Ng, Robert et al., 2003). Die Methylierung an K36 ist typischerweise stromabwärts kodierender Sequenzen beobachtet wurden (Bender, Byron et al., 2006). Transkriptionell kompetentes Chromatin ist durch die Monomethylierung von H3K4, K9 und K36 gekennzeichnet (Kim, Kiefer et al., 2006). Ein Marker für repressives Chromatin ist die H3K9 Trimethylierung und das Fehlen von H3 und H4 Acetylierung (Peterson und Laniel, 2004).

1.2.1.1 Histon-Methyltransferasen

Die Methylierung der Histon-N-Termini erfolgt durch die Enzymklasse der Histon-Methyltransferasen (HMTs). Dabei unterscheidet man zwei Klassen von Histon-Methyltransferasen, die SET- und die PRMT-Familie. Lysin methylierende Histon-Methyltransferasen der SET-Familie tragen eine SET-Domäne (Lachner und Jenuwein, 2002) und können Heterochromatin etablieren und expandieren (Lachner, O'Carroll et al., 2001). Der Name SET leitet sich dabei von drei Proteinen der Transkriptionsaktivierung bzw. -reprimierung ab: Su(var), E(z) und trithorax. Die SET-Domänen-Proteine SUV39H1,

ASH1 und G9A methylieren das Histon H3 am Lysinrest 9 (H3K9). Dabei kann SUV39H1 als Teil eines HP1-Komplexes in euchromatischen Regionen zur Repremierung von Genen rekrutiert werden (Nielsen, Schneider et al., 2001). Das Enzym ASH1 kann neben der Methylierung von H3K9 auch auf H3K4 und H4K20 Methylreste übertragen, während G9A auch H3K27 methyliert (Beisel, Imhof et al., 2002; Tachibana, Sugimoto et al., 2001). Beim Menschen methylieren die Proteine SET7, SET9 sowie MLL1 Histon K4 (Nishioka, Chuikov et al., 2002). Außerdem kennt man in Säugerzellen die Histon-Methyltransferasen SET8, PR-SET7 und Dot1, welche keine SET-Domänen enthalten (Feng, Wang et al., 2002). Die Histon-Methyltransferasen der PRMT-Familie methylieren Arginin-Reste und umfassen sechs verschiedene Säugerproteine (Frankel, Yadav et al., 2002). Das Enzym PRMT1 methyliert Histon H4 am Lysin-Rest 3 (H4R3) und erleichtert dadurch vermutlich die nachfolgende Acetylierung durch p300 (Wang, Huang et al., 2001). Die funktionalen Gegenspieler der Histon-Methyltransferasen sind die Histon-Demethylasen, die wie das Enzym LSD1 spezifische Lysin-Reste demethylieren (Shi, Lan et al., 2004).

1.2.1.2 Histon-Acetyltransferasen

Histone können nicht nur methyliert, sondern auch acetyliert werden. Die unterschiedlichen HATs (**H**iston-**A**cetyl**t**ransferasen) werden mehreren Familien auf Grund ihrer Funktion im Nukleus (Typ A) bzw. im Zytoplasma (Typ B) zugeordnet (Marmorstein, 2001). HATs vom Typ B acetylieren die Histone bevor sie zu Nukleosomen assembliert werden. Vertreter der Typ A-Familie sind Gcn5 und PCAF. Sie wirken als Transkriptions-Coaktivator spezieller Aktivatoren und besitzen neben der HAT- auch eine Bromo-Domäne, welche acetyliertes Lysin binden kann (Dhalluin, Carlson et al., 1999). Auch CBP (**C**REB-**b**inding **p**rotein) und sein Paralog p300 gehören zur Gruppe der nukleären HATs. CBP/p300 sind generelle Coaktivatoren die verschiedene Transkriptionsprozesse regulieren können. Sie binden und acetylieren verschiedene Transkriptionsfaktoren und Histone. CBP und CREB sind in der Lage als Brückenmoleküle eine Plattform für andere Cofaktoren zu bilden (Chan und La Thangue, 2001). Die Brückenfunktion von CBP wurde auch bei der Funktion distaler Enhancer beschrieben. So wurde CBP am Enhancer E β des TCR β -Lokus (TCR; *t-cell-receptor*) nachgewiesen (Spicuglia, Kumar et al., 2002).

Die funktionalen Gegenspieler der HATs sind die Histon-Deacetylasen (HDACs), die Acetylreste wieder entfernen können. Die wachsende Anzahl verschiedener Säugetier-HATs

werden entsprechend ihrer strukturellen Homologie zu bereits bekannten HDACs der Bäcker-Hefe in drei Klassen eingeteilt. HDACs der Klasse 1 weisen Homologie zu dem Rpd3-Enzym aus Hefe auf und umfassen HDAC 1, 2, 3 und 8. Die Klasse 2 beinhaltet HDAC 4, 5, 6, 7, 8 und 10, aufgrund der starken Homologie zu Hda1 aus Hefe. Mitglieder der Klasse 3 sind zu Sir3 homolog und im Gegensatz zu den Klasse 1 und 2 HDACs nicht durch Trychostatin A (TSA) inhibierbar (Marks, Miller et al., 2003).

Die Funktion der HDACs bei der Regulation der Genaktivierung ist sehr vielfältig. So existieren Proteinkomplexe mit mehreren enzymatischen Aktivitäten, wie z.B. der Sin3-Komplex. Dieser enthält sowohl HDAC1, als auch HDAC2 (Ng und Bird, 2000). Außerdem kennt man Komplexe in denen HDACs gemeinsam mit HAT-Aktivität-Proteinen vorkommen (Yamagoe, Kanno et al., 2003).

1.3 Die Struktur proteinkodierender Gene

Die Struktur proteinkodierender Gene ist komplex und kann große Unterschiede aufweisen. Dabei beginnt die Transkription in der Nähe von Promotorstellen und endet an Terminationsstellen der Gene. In Eukaryoten ist die RNA-Polymerase II (Pol II) Teil eines großen Proteinkomplexes und verantwortlich für die gesamte mRNA-Synthese. Die Pol II bindet mit Hilfe zusätzlicher Transkriptionsfaktoren an Promotoren, welche stromaufwärts der zu transkribierenden Sequenz liegen. Der Corepromotor (Minimalpromotor) dient dabei als Verankerungsstelle für den Präinitiationskomplex (PIC). Er besteht meist aus einer TATA-Box, welche ca. 30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts liegt. Darüber hinaus ist der Corepromotor durch eine Bindestelle des Transkriptionsfaktors TFIIB (BRE) und des *Initiator*-Elementes (Inr) gekennzeichnet. Bei vielen Genen befindet sich auch ein *Downstream*-Promotor-Element (DPE) ungefähr 30 bp unterhalb des Transkriptionsstarts (Butler und Kadonaga, 2002). Nur wenige Promotoren weisen alle Elemente auf. In den Haushaltsgenen der Zelle können zum Beispiel die TATA-Boxen durch GC-Boxen ersetzt sein.

Neben den Elementen der basalen Transkription gibt es regulatorische Promotorelemente, die sowohl die Intensität, als auch den zeitlichen Rahmen der Transkription beeinflussen können. Sie enthalten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren die als Aktivatoren oder Repressoren wirken. Diese Bindungsstellen können von der Konsensussequenz abweichen und dadurch unterschiedlich hohe Bindungseffizienzen zeigen. Regulatorischen Elemente

können auch viele tausend bp vom Promotor entfernt liegen. Häufig haben sie Bindungsstellen für Aktivatoren und Repressoren, welche durch Rekrutierung weiterer Elemente die Transkription regulieren (Ludwig, 2002; Muller und Schaffner, 1990). Solche distalen Elemente sind Enhancer, Silencer, Insulatoren sowie MAR-Elemente (*matrix-attachment-region*).

Enhancer-Elemente erhöhen die Transkriptionsrate ihrer Zielpromotoren unabhängig von ihrer Position und ihrer Orientierung. Sie sind zwischen 100 und 300 bp lang und besitzen verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Muller und Schaffner, 1990; Szutorisz, Dillon et al., 2005). Silencer sind strukturell mit den Enhancern vergleichbar, jedoch reprimieren sie die Transkriptionsrate ihren Zielpromotoren. Sie besitzen wie Enhancer Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren und wirken ebenfalls orientierungs- und positionsunabhängig (Geyer und Clark, 2002). Insulatoren sind DNA-Sequenzen die unabhängige Transkriptionseinheiten im eukaryotischen Chromatin etablieren können. Außerdem sind sie in der Lage die Aktivität von Enhancern zu reduzieren, wenn sie zwischen Promotor und Enhancer lokalisiert sind. Auch können sie die Ausbreitung repressiven Chromatins verhindern und somit Silencern entgegenwirken (Kuhn und Geyer, 2003).

In eukaryotischen Genomen gibt es Regionen die der Verankerung der DNA mit dem Kerngerüst dienen. Diese distalen Elemente bezeichnet man als MARs oder als SARs (*scaffold attachment region*). Eukaryotische Gene sind durch eine Exon-Intron-Struktur gekennzeichnet, die je nach Gen unterschiedliche Komplexität aufweisen kann. Im 3'-Bereich der meisten Gene liegt die Polyadenylierungsstelle. In allen Eukaryoten, außer in Hefe, befindet sich 10 bis 35 bp stromaufwärts dieser Polyadenylierungsstelle die Konsensussequenz AATAAA, das Polyadenylierungssignal. Weitere DNA-Elemente sind für die Funktionalität der Polyadenylierungsstelle notwendig. Diese sind jedoch meist weniger stark konserviert (Hu, Lutz et al., 2005).

1.4 Enhancer-Elemente

Die eukaryotische Genexpression ist durch ein zelluläres Netzwerk verschiedener Elemente reguliert, wobei die Elemente zeitlich und räumlich definiert miteinander wechselwirken. Generell unterscheidet man regulative Elemente danach, ob sie in *cis* (durch ihren direkten Kontakt) oder in *trans* (über große Entfernungen) wirken. Distale Enhancer sind Elemente

die in *trans* wirken. Sie verstärken die Aktivität von Zielpromotoren und wirken orts- und orientierungsunabhängig (Huang, Cabaud et al., 2003; Khoury und Gruss, 1983).

1.4.1 Funktionsweise distaler Enhancer

Verschiedene distale Enhancer wurden bisher beschrieben. Ihre Wirkungsweise ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass verschiedene Aktivatoren Enhancer-Elemente binden und somit die Transkription des Zielpromotors erhöhen. Eine Möglichkeit der Wirkweise ist die Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschine an den Corepromotor. Ebenfalls wird die Rolle von Enhancern auf die Neupositionierung von Nukleosomen und die Rekrutierung von Histon-modifizierenden Enzymen diskutiert (Szutorisz, Dillon et al., 2005).

An dem Gen PSA (*androgen responsive prostate-specific antigen*) wurde gezeigt, dass infolge Hormoninduzierung die Pol II und eine Histon-Acetyltransferase zunächst an den Enhancer rekrutiert werden, unabhängig vom proximalen Promotor (Louie, Yang et al., 2003). Ähnliche Analysen am TCR β -Lokus legen die Rekrutierung der Pol II an Enhancer-Elemente als generelle Eigenschaft von Enhancern nahe (Spicuglia, Kumar et al., 2002). Untersuchungen am Enhancer des Maus $\lambda 5$ -VpreB1-Lokus haben gezeigt, dass einige GTFs und die Pol II zuerst an den Enhancer rekrutieren werden, bevor sie am Zielpromotor detektiert werden konnten (Szutorisz, Canzonetta et al., 2005). Es existieren verschiedene Modelle die beschreiben wie distale Enhancer und deren rekrutierte GTFs an die Zielpromotoren gelangen. *Looping*-Modellen zufolge interagieren Enhancer mit den Zielpromotoren durch dreidimensionale Strukturen des Chromatins, die die Form einer Schleife aufweisen (Bulger und Groudine, 1999). Die Existenz Protein-vermittelnder Interaktionen in *trans* wurden durch Studien zum Transkriptionsfaktors GATA belegt, der durch Bildung von Homodimeren separate DNA-Stücke miteinander verbinden kann (Mahmoudi, Katsani et al., 2002). Bei der Interaktion des Enhancers HS2 mit dem β -Globin Promotor, wurde *Looping* der DNA durch verschiedene Analysen demonstriert (Carter, Chakalova et al., 2002; de Laat und Grosveld, 2003). Eine weitere Möglichkeit der Vermittlung von Promotor-Enhancer-Wechselwirkungen über große Distanzen hinweg, ist das Gleiten des Enhancers entlang des DNA-Stranges bis zum Zielpromotor. Dieses beschreiben *Tracking*-Modelle. Zeitabhängige CHIP-Analysen an der regulatorischen Region des HNF-4 α Gens stützen dieses Modell (Hatzis und Talianidis, 2002).

Eine weitere Funktion distaler Enhancer ist die weiträumige Chromatinöffnung für Transkriptionsfaktoren und Aktivatoren. Die Öffnung des Chromatins durch Enhancer-Elemente wird durch die gerichtete Modifikation von Histonen erklärt. Am β -Globin-Lokus wurde gezeigt, dass eine Lokus-Kontrollregion (LCR; *locus control region*) auch ektopisch offenes Chromatin induzieren kann (Grosveld, van Assendelft et al., 1987). Außerdem wurde mit Hilfe von Enhancer *knockout* Maus-Modellen am T-Zell-Rezeptor- β -Lokus gezeigt, dass durch den Enhancer hervorgerufene Chromatinveränderungen auch einen Einfluß auf die Regulation der Gen-Umlagerung haben (Mathieu, Hempel et al., 2000). Verschiedene Publikationen beschreiben, dass intergenische Transkripte an Enhancer-Elementen starten. So wurden am β -Globin-Lokus mehrere Startstellen intergenischer Transkripte in der LCR identifiziert (Routledge und Proudfoot, 2002). Auch am Enhancer des Maus $\lambda 5$ -VpreB1-Lokus wurden bidirektionale Transkripte detektiert (Szutorisz, Canzonetta et al., 2005). Unklar ist, ob die intergenischen Transkripte Ursache oder Folge der PIC-Assemblierung an Enhancer-Elementen sind.

1.5 Die RNA-Polymerase II

Die Transkription wird durch die Enzymklasse der RNA-Polymerasen katalysiert. Dabei wird der DNA-Doppelstrang der Matrize entwunden und ein komplementärer RNA-Strang synthetisiert. Im Gegensatz zu Prokaryoten besitzen Eukaryoten drei verschiedene RNA-Polymerasen. Entsprechend der chromatographischen Auftrennung ihrer Entdeckung wurden sie mit den römischen Ziffern I bis III nummeriert. Die Polymerasen I und III transkribieren die RNA-Komponenten des Translationsapparates, die ribosomalen RNAs (rRNA) und die Transfer-RNAs (tRNA). Die kleinen RNAs (snRNA) des Zellkerns, welche Bestandteile des Spleißosoms sind, werden hingegen von der Pol II und III transkribiert. Eine herausragende Stellung hat die Pol II, indem sie die Gesamtheit der Transkripte proteinkodierender Gene synthetisiert. Dementsprechend ist sie das Herz einer aus vielen Proteinen aufgebauten Polymerasemaschinerie, die komplex reguliert wird. Die RNA-Polymerase II ist aus mindestens 12 Untereinheiten aufgebaut, welche entsprechend ihrer Größe als Rpb 1 bis 12 bezeichnet werden. Die größte Untereinheit Rpb1 enthält die carboxy-terminale Domaine (CTD), die in humanen Zellen aus 52 Heptapeptidwiederholungen der Sequenz Serin-Prolin-Threonin-Serin-Prolin-Serin besteht. Die Anzahl

der tandemartigen Wiederholungen der Heptapeptidsequenz ist speziesabhängig (Corden, 1990). Die CTD ist für Hefen und Metazoa essentiell (Allison, Wong et al., 1988; Meininghaus und Eick, 1999). Sie wird im Verlauf der Transkription phosphoryliert und dient auch als Bindestelle für Proteine, wie dem Mediator-Komplex und RNA-prozessierende Enzyme.

Die CTD liegt zunächst unphosphoryliert in Transkriptionsinitiations-Komplexen vor (Chesnut, Stephens et al., 1992). Anschließend wird die elongierende Pol II an dem Serin 5 der CTD durch den Transkriptionsfaktor TFIIF phosphoryliert (Feaver, Gileadi et al., 1991). Danach phosphorylieren die Faktoren Cdk9/CyclinT (P-TEFb) *in vitro* Serin 2, was zu einer Stimulierung des Pol II Elongationsmodus führt (Zhou, Halanski et al., 2000). Auch die Untereinheiten des Mediator-Komplexes Srb10/Cdk8 sind in der Lage die CTD zu phosphorylieren. Dies geschieht jedoch im Rahmen einer negativen Regulation (Hengartner, Myer et al., 1998). Außerdem können die Proteine CDK1, ERK1/2 und c-Abl die CTD phosphorylieren (Oelgeschlager, 2002). Die hyperphosphorylierte Pol II wird am Ende der Transkription durch die Phosphatase Fcp1 wieder dephosphoryliert, sodass eine neue Transkriptionsrunde beginnen kann (Cho, Kim et al., 1999).

Nicht zuletzt durch die Auflösung der Pol II Kristallstruktur mittels Röntgenstrukturanalyse, konnten den Pol II Untereinheiten Funktionen zugeordnet werden. Das hat zu einem besseren Verständnis der Pol II beigetragen (Cramer, Bushnell et al., 2001). Die beiden Untereinheiten Rpb1 und 2 bilden das enzymatische Zentrum, wo zur Bindung der Matrizen-DNA ein Mg^{2+} -Ion und der positiv geladene Spalt liegen. Die Untereinheiten Rpb1, 5 und 9 bilden das *jaw* aus, welches die unterhalb des aktiven Zentrums gelegene Matrizen-DNA fixiert. Dabei hält eine Art Klammer aus Rpb1, 2 und 6, die bereits transkribierte DNA und die neu entstandene RNA zusammen (Cramer, 2004; Cramer, Bushnell et al., 2001).

1.6 Die Initiation der Transkription

Die Pol II alleine ist nicht in der Lage Promotoren zu erkennen und zu binden. Dazu benötigt sie weitere Proteine, die Transkriptionsfaktoren. Dabei werden generelle und spezifische Transkriptionsfaktoren unterschieden. Generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs) sind grundsätzlich notwendig und ermöglichen die basale Transkription. Spezielle Transkriptionsfaktoren vermitteln die spezifisch aktivierte Transkription (Martinez, 2002;

Roeder, 1996). Die Klasse der GTFs umfassen sechs Proteinkomplexe, welche aus über 30 Polypeptiden bestehen (Orphanides, Lagrange et al., 1996). Für die Erkennung der Transkriptionsstartstellen der Promotoren ist die Bildung des Präinitiationskomplexes essentiell. Hierbei bindet in einem ersten Schritt der Transkriptionsfaktor TFIID an die TATA-Box. Das TATA-Bindeprotein TBP, welches Bestandteil von TFIID ist, spielt dabei eine Schlüsselrolle. Es bindet die TATA-Sequenz und induziert eine Verbiegung der DNA mit Hilfe der TBP assoziierten Faktoren, den TAFs (Burley und Roeder, 1996). Promotorgebundenes TFIID ermöglicht die Bindung weiterer GTFs an entgegengesetzten Enden von TFIID. Dabei handelt es sich um TFIIA und TFIIB, welche die Bindung von TFIID an den Promotor stabilisieren und eventuell vorhandene negative Faktoren verdrängen (Coleman, Taggart et al., 1999). TFIIB und TFIIF sind für die Promotorbindung und die Aktivierung der Pol II wichtig. Dabei formt TFIIF mit Pol II einen stabilen Komplex und rekrutiert die Polymerase zum Promotor. Außerdem verhindert TFIIF unspezifische DNA-Bindung und stabilisiert den PIC (Conaway und Conaway, 1993). Der PIC wird vervollständigt durch die Bindung von TFIIE und TFIIH, die in ihrer Funktion eng miteinander verknüpft sind. Sie sind für die Trennung der doppelsträngigen DNA am Promotor unter ATP-Verbrauch notwendig. Dieses Promotor-*melting* findet in der Promotorregion -9 bis +2 statt (Holstege, Fiedler et al., 1997). Außerdem stimuliert TFIIE die ATPase und Kinaseaktivität von TFIIH (Lu, Zawel et al., 1992; Ohkuma und Roeder, 1994). Der multifunktionelle Transkriptionsfaktor TFIIH spielt eine wichtige Rolle bei dem Übergang von der Initiations- in die Elongationsphase. Dabei phosphoryliert die TFIIH Untereinheit CDK7, mittels ihrer Kinaseaktivität, Serin 5 der CTD. Das hat die Dissoziation einiger genereller GTFs zur Folge. Dadurch wird es der Pol II ermöglicht, sich von der Promotorplattform zu lösen (*promotor escape*) und die Phase der Elongation zu beginnen (Gerber, Hagmann et al., 1995).

1.7 Die Elongation der Transkription

Während die Initiation der Transkription relativ langsam abläuft, ist die Elongationsphase der Transkription durch eine sehr hohe Prozessivität gekennzeichnet. Dabei schreitet die Transkription mit einer Geschwindigkeit von 1.000-2.000 Nukleotiden pro Minute voran. Die Pol II pausiert jedoch an spezifischen Stellen des offenen Leserahmens (*open reading frame*; ORF) häufiger und wird anschließend durch Elongationsfaktoren wie Elongin oder

TFIIS wieder in Gang gesetzt (Conaway, Shilatifard et al., 2000). Andere Elongationsfaktoren, wie das Protein CBS, bewirken die bevorzugte Reparatur von DNA-Schäden (Troelstra, van Gool et al., 1992). Im Rahmen der Elongation finden viele Prozesse statt, die zur Modifikation naszierenden Transkripte führen. Diese Mechanismen sind stark miteinander gekoppelt und umfassen die Prozessierungsmechanismen Capping, Polyadenylierung und Spleißen.

1.8 Generelle Transkriptionscofaktoren

Die Rekrutierung der Polymerase II und der GTFs an den Promotor führt nur zu basalen Transkriptionsraten. In eukaryotischen Zellen wird die Transkription jedoch auch in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen mittels verschiedener Faktoren reguliert. Damit ist es der Zelle möglich auf äußere Einflüsse zu reagieren. Eukaryotische Gene sind dadurch gekennzeichnet Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zu besitzen. Unter den mehr als tausend Transkriptionsfaktoren gibt es sowohl reprimierende, als auch aktivierende (Kadonaga, 2004) und welche, die den Aufbau des PIC beeinflussen. Teilweise vermitteln Aktivierungs- oder Repressordomänen diese Wechselwirkungen. Auch sind häufig Cofaktoren beteiligt. Diese Coaktivatoren bzw. Corepressoren sind in der Lage über einen Multiprotein-Cofaktor-Komplex die Initiation der Transkription zu beeinflussen.

Eine Reihe genereller Transkriptionscofaktoren wurden zuerst durch Meisterernst und Kollegen aus einer Fraktion menschlicher Kernextrakte isoliert: USA (*upstream factor stimulatory activity*) (Meisterernst, Roy et al., 1991). Dabei wurde beobachtet, dass die aktivatorabhängige Transkription gereinigter *in vitro* Transkriptionssysteme durch die Zugabe der USA-Fraktion stark aktiviert wurde. Man unterscheidet zwischen positiven (PC) und negativen (NC) Cofaktoren. Diese historische Nomenklatur wird den neueren Erkenntnissen jedoch nicht immer gerecht. Denn Cofaktoren können sowohl positive, als auch negative Funktionen haben. Sechs positive (PC1-PC6) und zwei negative Cofaktoren (NC1 und NC2) wurden im folgenden aus der USA-Fraktion isoliert (Kaiser und Meisterernst, 1996). PC2 wurde später in die Gruppe der Mediator-Komplexe eingeordnet. (Malik, Gu et al., 2000). Die Mediator-Komplexe funktionieren als Bindeglied zwischen einem sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor und der Pol II Transkriptionsmaschine.

1.9 Die Prozessierung der RNA

Mit der Initiation der Transkription beginnt die Synthese eines prä-mRNA-Moleküls, welches während der Elongationsphase hoch prozessiv gebildet wird. Im folgenden durchläuft diese prä-mRNA mehrere komplexe Prozesse, sodass reife, prozessierte mRNA entsteht. Zu Beginn erhält das naszierende Transkript eine 7-Methylguanosin-Modifikation am 5'-Ende (Capping). Am 3'-Ende der mRNA erfolgt die Polyadenylierung, wobei zunächst die mRNA geschnitten und eine polyA-Kette angehängt wird. Durch RNA-Editing können im Folgenden die RNA-Moleküle in ihrer Primärstruktur verändert werden. Das heißt, durch Deaminierung bzw. Uridin-Insertion wird die Nukleotidabfolge der mRNA posttranskriptional modifiziert. Aufgrund der Exon-Intron-Struktur eukaryotischer Gene erfolgt schließlich das Herausschneiden von Intron-Bereichen durch den Prozess des Spleißens. Danach wird die mRNA durch verschiedene Proteine gebunden, sodass ein heteronukleäres mRNA-Molekül entsteht (hnRNP). Im letzten Schritt erfolgt der Export der hnRNPs in das Zytoplasma. All diese Prozesse laufen nicht sequentiell ab, sondern wirken teilweise parallel und bedingen einander infolge starker Kopplung. Jeder dieser Prozesse kann Ziel oder Mittel von Genregulationsmechanismen sein.

1.9.1 Das Capping

Die erste posttranskriptionale Modifikation naszierender mRNA ist das Capping. Zunächst synthetisiert die initiierte Pol II die ersten 20-30 Nukleotide und pausiert anschließend, wobei die RNA mit dem 5'-Ende aus dem Ausgangskanal der Polymerase austritt (Shuman, 1997). In einer nun folgenden Dreischrittreaktion wird ein N⁷-methyl-Guanosin-Monophosphat durch eine 5'-5'-Triphosphat-Bindung angehängt (Cho, Takagi et al., 1997). Dafür sind die Enzyme RNA-Triphosphatase, Guanylyltransferase und 7-Methyltransferase notwendig. Die Funktionalität dieser drei Enzyme ist auf die Anwesenheit der Kinaseaktivität des generellen Transkriptionsfaktors TFIIF angewiesen (Schroeder, Schwer et al., 2000). An die Cap-Struktur angrenzende Nukleotide werden häufig Ribose-methyliert. Die Cap-Struktur ist für den Schutz der RNA vor 5'-3'-Exonukleasen wichtig (Beelman und Parker, 1995). Außerdem wird durch die Cap-Struktur das Spleißen des ersten Introns stimuliert (Lewis, Izaurralde et al., 1996). Dabei konnte gezeigt werden, dass im Zytoplasma der Translations-Initiationsfaktor eIF-4E an das 5'-Cap bindet und die Assoziation ribosomaler Untereinheiten mit der RNA fördert (Sachs, Sarnow et al., 1997).

1.9.2 Das Spleißen

Fast alle eukaryotischen Gene enthalten Introne, welche bei der Reifung der mRNA herausgeschnitten werden. Die meisten Gene enthalten mehrere Introne, die im Durchschnitt 10-20 mal länger als die dazugehörigen Exone sind (Ast, 2004). Dabei generieren mindestens 50-75 % der humanen Gene alternativ gespleißte Transkripte (Soares, Zanier et al., 2006). Das Herausschneiden der Introne durch Spleißen erfolgt durch zwei Umesterungen, welche zu einer gespleißten RNA und der Lariat-Struktur führen. Voraussetzung für das Spleißen ist die Erkennung der Intron-Exon-Struktur durch die am Spleißvorgang beteiligten Proteine. Verschiedene DNA-Sequenzelemente sind für die Erkennung der Exon-Intron-Strukturen von Bedeutung: das 5'-Spleißsignal, eine sogenannte Verzweigungsstelle (*branchpoint*), eine Pyrimidin-reiche Sequenz sowie das 3'-Spleißsignal (Abb. 1.1) (Izquierdo und Valcarcel, 2006; Soller, 2006).

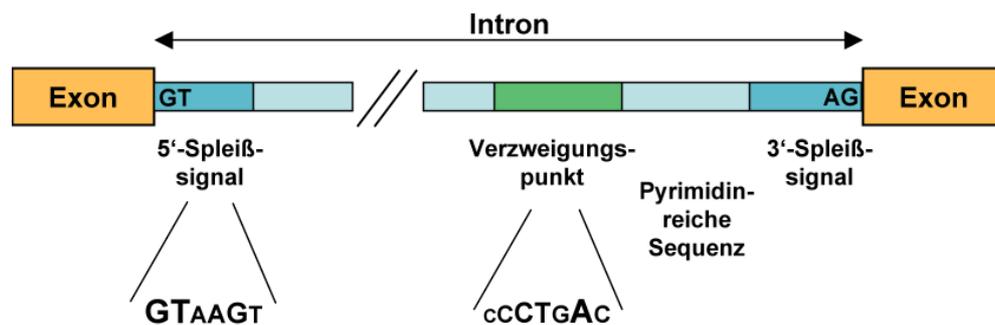


Abbildung 1.1: Humane DNA-Sequenzelemente des Spleißens.

Die ersten zwei (GT) und die letzten zwei Nucleotide (AG) des Introns sind hoch konserviert. Ebenfalls konservierte Nucleotide des 5'-Spleißsignals und des Verzweigungspunktes sind durch hervorgehobene Basen gekennzeichnet. Das Verzweigungspunkt-Adenosin ist unterstrichen.

Im ersten Schritt greift die 2'-Hydroxylgruppe des Verzweigungspunkt-Adenosins, welches ca. 100 bp stromaufwärts des 3'-Spleißsignals liegt, die Phosphodiesterbindung des 5'-Spleißsignals an. Das führt zu einer 3'-Hydroxylgruppe am Ende des ersten Exons. Im zweiten Schritt greift diese Hydroxylgruppe die Phosphodiesterbindung des 3'-Spleißsignals an und verbindet die beiden Exone. Dabei wird die Lariat-Struktur des Introns freigesetzt. Am Spleißvorgang sind kleine Ribonukleoproteinpartikel (snRNPs) beteiligt, die mit weiteren Faktoren das Spleißosoms bilden.

Die fünf Ribonukleoproteine wurden U1, U2, U4, U5 und U6 benannt. Das U1 snRNP ist dabei für den initialen Schritt der 5'-Spleißsignalerkennung und der Spleißosomen-

Assemblierung notwendig. Danach bindet U2 den Verzweigungspunkt, wobei durch die weitere Bindung von U4/U6 und U5 das funktionale Spleißosom gebildet wird (Staley und Guthrie, 1998). Für die Identifizierung des Verzweigungspunktes durch BBP/SF1 ist sowohl die Pyrimidin-reiche Sequenz, als auch das 3'-Spleißsignal notwendig. Der Hilfsfaktor U2AF erkennt dabei das 3'-Spleißsignal und die Pyrimidin-reiche Sequenz (Moore, Schwartzfarb et al., 2006). Die Interaktionen zwischen BBP/SF1 und U2AF ermöglichen die kooperative Bindung des Verzweigungspunktes, der Pyrimidin-reichen Sequenz sowie des 3'-AGs (Selenko, Gregorovic et al., 2003).

Für die Erkennung der Spleißsignale höherer Eukaryoten sind aufgrund hoher Sequenzvariabilität weitere intronische bzw. exonische Sequenzelemente notwendig. Diese Sequenzelemente können als Spleiß-Enhancer wirken und werden von Serin-Arginin-reichen Proteinen (SR-Proteine) gebunden. SR-Proteine bilden eine Familie unterschiedlicher Spleißfaktoren, die eine Arginin-Serin-reiche Domäne (RS) besitzen (Shen und Green, 2004).

1.9.3 Die Polyadenylierung

Mit Ausnahme von Histon RNAs und kleinen Kern RNAs (snRNAs) werden alle Pol II Transkripte am 3'-Ende gespalten. Anschließend wird diesen Transkripten eine polyA-Kette von ungefähr 200 bp Länge angehängt. Wichtige Konsensussequenz-Elemente sind das AAUAAA-Hexamer, das CA-Dinukleotid nach welchem die Spaltung stattfindet und eine stromabwärts gelegene U- oder GU-reiche Sequenz (*downstream sequence element*; DSE). Schwache polyA-Signale besitzen darüber hinaus noch ein stromaufwärts liegendes USE-Element (*upstream sequence element*) (Venkataraman, Brown et al., 2005). Die Erkennung des 3'-Spleißsignals erfolgt durch die kooperative Bindung der beiden Multiproteinkomplexe CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*) an das AAUAAA-Hexamer und CstF (*cleavage stimulatory factor*) an das DSE. Die Spaltung erfolgt nach der Rekrutierung der Multiproteinkomplexe CF I und II (*cleavage factor I/II*) unter Beteiligung der polyA-Polymerase PAP. Danach werden durch die Proteine PAP, CPSF und durch das polyA-bindende Protein die polyA-Ketten angehängt (Wahle und Ruegsegger, 1999).

1.9.4 Kombinatorische Interaktionen

Die Prozessierung der prä-mRNA erfolgt mit hoher Genauigkeit, obwohl die Prozessierungssignale häufig degeneriert sind. Dabei werden die Prozessierungssignale mittels kombinatorischer Interaktion zwischen regulatorischen Faktoren und der Prozessierungsmaschine der prä-mRNA definiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein 5'-Spleißsignal ein schwaches stromabwärts liegendes 3'-Spleißsignal stimulieren kann (Berget, 1995). Außerdem können verschiedene Sequenzelemente die Effizienz des Spleißens beeinflussen. Exonische Elemente werden zwischen Spleiß-Enhancern (ESE; *exonic splice enhancer*) und Spleiß-Silencern (ESS; *exonic splice silencer*) unterschieden. Dabei werden exonische Spleiß-Enhancer durch SR-Proteine gebunden. Spleiß-Silencer wirken der Exon-Definition durch Bindung negativer Spleißregulatoren entgegen (Pozzoli und Sironi, 2005). Intronische Sequenzelemente können ebenfalls das Spleißen verstärken oder dem Spleißen entgegenwirken. Sie werden entsprechend als intronische Spleiß-Enhancer bzw. -Silencer bezeichnet. Analysen an humanen TPI-Transkripten (*triosephosphate isomerase*) haben gezeigt, dass das zweite und das letzte von mehreren Intronen besondere Bedeutung für die RNA-Prozessierung hat. Besonders das letzte Intron ist für die 3'-Prozessierung naszierender Transkripte wichtig (Nesic, Cheng et al., 1993).

Weitere Interaktionen zwischen den unterschiedlichen mRNA-Prozessierungsmechanismen wurden beschrieben. Das 5'-Cap eines Transkriptes kann mit dem ersten 5'-Spleißsignal interagieren und dadurch Spleißen stimulieren (Izaurralde, Lewis et al., 1994). Auch die Polyadenylierung und das Spleißen von Transkripten beeinflussen sich gegenseitig. Die Mutation der Pyrimidin-reichen Sequenz und des 3'-Spleißsignals führen zu einer Reduktion der Polyadenylierungseffizienz, während Mutationen des AAUAAA-Hexamers und des DSEs zu einem Absinken der Spleißeffizienz führen (Cooke, Hans et al., 1999). *In vivo* Studien haben gezeigt, dass Introne die 3'-Prozessierung von Transkripten beeinflussen können und dass die Polyadenylierung Einfluss auf die Auswahl von Spleißsignalen hat (Scott und Imperiale, 1996); (Tsai, Wu et al., 1998). Es wurden auch direkte Interaktionen zwischen CPSF und U2 snRNP sowie zwischen CPSF und SF3b-Untereinheiten nachgewiesen, welche das Spleißen und die 3'-Prozessierung von Transkripten *in vitro* koppeln (Kyburz, Friedlein et al., 2006). Auch wurde gezeigt, dass die Interaktion von U2AF65 mit der polyA-Polymerase die 3'-Prozessierung von Transkripten stimuliert (Vagner, Vagner et al., 2000).

1.9.5 Transkription und mRNA-Prozessierung

Die starke Kopplung der Transkription mit der mRNA-Prozessierung ist durch verschiedene Beobachtungen belegt. So können zum Beispiel Faktoren der 3'-Prozessierung mit Promotoren assoziieren (Calvo und Manley, 2003). Eine Schlüsselfunktion hat die Pol II bei der Prozessierung, da sie mit der CTD mit vielen RNA-Prozessierungsfaktoren interagiert (McCracken, Fong et al., 1997; Misteli und Spector, 1999). Die CTD unterliegt differentieller, regulatorischer Phosphorylierung, wobei eine verkürzte CTD zu Prozessierungsdefekten führt (Proudfoot, Furger et al., 2002). Der N-Terminus der CTD unterstützt nur das Capping naszierender Transkripte, während der C-Terminus alle Prozessierungsreaktionen unterstützt (Chapman, Palancade et al., 2004). Neueren Modellen zufolge werden an die CTD geladene Prozessierungsfaktoren auf naszierende Transkripte übertragen. Demzufolge haben auch Promotoren Einfluß auf die Prozessierung der prä-mRNA (Cramer, Pesce et al., 1997).

Auch das Ablösen naszierenden RNA von der DNA-Matrize hat Einfluß auf das Spleißen. So können nicht vollständig 3'-prozessierte Transkripte den Transkriptionsort nicht verlassen und werden somit auch nicht weiter prozessiert (Bird, Fong et al., 2005). Während der Transkription wird prä-mRNA cotranskriptional mit RNA-bindenden Proteinen beladen. Die meisten dieser Proteine sind ubiquitäre hnRNP-Typ Proteine, welche für die Regulation der mRNA-Prozessierung wichtig sind und die Bildung exportfähiger mRNP-Partikel beeinflussen können (Aguilera, 2005; Dreyfuss, Matunis et al., 1993). Die cotranskriptionelle Beladung naszierender Transkripte mit dem THO/TREX-Exportfaktor-Komplex (Hefe) bzw. mit dem SR-Protein ASF/SF2 (Mammalia) ist hingegen zur Vermeidung der Hyperrekombination transkribierter Gene wichtig. Die Hyperrekombination kann nämlich zu einer vorzeitigen Termination der Transkription führen (Li und Manley, 2005; Luna, Jimeno et al., 2005). Mit der Transkription sind auch Mechanismen verknüpft, die die Qualität von Transkripten kontrollieren. Vorzeitige Stop-Kodons (PTC; *premature stop codons*) führen in Mammalia zu der Bildung nicht exportfähiger RNPs. Solche RNPs sind Ziel von mRNA-Abbau durch NMD (*nonsense mediated decay*) (Ishigaki, Li et al., 2001).

Die Erkennung des polyA-Signals ist assoziiert mit der Reduktion der Elongationsrate der Pol II (Ahn, Kim et al., 2004). Dabei werden Pausierungsstellen der Pol II stromabwärts des polyA-Signals mit der Termination der Transkription in Verbindung gebracht (Enriquez-Harris, Levitt et al., 1991).

1.10 mRNA Qualitäts-Kontrollmechanismen

Mehrere Kontrollmechanismen stellen sicher, dass ausschließlich korrekt prozessierte mRNAs zu Proteinen translatiert werden. Diese Mechanismen laufen im Zellkern und im Zytoplasma ab. Dabei findet in der Zelle ein Wettbewerb zwischen der Prozessierung und dem Abbau von RNA statt. Eine bedeutende Prozessierungsmaschine ist der Exosomen-Komplex. Dieser besteht aus zehn Proteinen, wobei neun eine 3'-5'-Riboexonukleaseaktivität aufweisen (Butler, 2002). Der Exosomen-Komplex ist notwendig für die Prozessierung von rRNA, snoRNA und snRNA. Er kann sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma mRNA abbauen (Fasken und Corbett, 2005). Einen weiteren Qualitäts-Kontrollpunkt stellt der Kernporen-Komplex (NPC; *nuclear pore complex*) dar. Export-Faktoren binden mRNA, um sie durch den NPC in das Zytoplasma zu transportieren. Die Assemblierung verschiedener Proteine an die RNA und die Bildung eines mRNP (*messenger ribonucleoprotein partikel*) ist ein wichtiger Schritt, denn nur vollständig und richtig prozessierte mRNA-Moleküle sind Teil eines mRNPs der exportfähig ist. Andere mRNAs werden im Zellkern zurückgehalten und abgebaut (Dimaano und Ullman, 2004). Transkripte mit einem Stop-Kodon innerhalb der Exon-Intron-Struktur (PTC; *pretermination codon*) können, wenn sie translatiert werden, zu verkürzten und nicht funktionalen Proteinen führen. Der NMD (*nonsense mediated decay*) ist ein eukaryotischer Mechanismus der diese Transkripte erkennt und abbaut. Dabei werden auch unvollständig gespleißte Transkripte, Moleküle mit überlangen 3'-UTRs (*untranslated regions*) und offenem Leserahmen erkannt und abgebaut (Fasken und Corbett, 2005). Die Klasse der Upf-Proteine spielt dabei eine zentrale Rolle. In Säugerzellen werden Transkripte für den Abbau durch NMD durch den EJC (*exon-junction-complex*) markiert. Ein Terminationskodon, welches mehr als 50-55 Nukleotide stromaufwärts einer Exon-Exon-Verbindung liegt, wird als PTC erkannt. Diese Erkennung erfolgt in einer Pionier-Runde (*pioneer round*) der Translation. Anschließend werden die erkannten Transkripte abgebaut (Maquat, 2004).

Der *non-stop decay* funktioniert ähnlich dem NMD. Fehlerhafte Transkripte werden durch eine initiale Translationsrunde der Ribosomen erkannt. Dabei translatieren Ribosomen in Anwesenheit eines Stop-Kodons die 3'-UTRs und die polyA-Ketten der Transkripte. Das führt zur Ablösung an der RNA gebundener Proteine und zerstört den mRNP. Eventuell vorhandene polyA-Ketten werden deadenyliert und das Transkript wird durch Exonukleasen abgebaut (van Hoof, Frischmeyer et al., 2002). Der SMD (*Staufen1-mediated mRNA*

decay) stellt einen weiteren mRNA-Abbauprozess dar. Im Unterschied zum NMD ist für den SMD sowohl das Spleißen, als auch der EJC nicht notwendig. Abnormal lange Transkripte ohne Terminations-Kodon werden durch den *nonstop decay* abgebaut. Der *nonstop decay* benötigt im Gegensatz zum NMD und zum SMD kein Upf1 Protein (Furic und Desgroseillers, 2005).

1.11 Nichtkodierende RNA

Nur etwa ein bis zwei Prozent des humanen Genoms bestehen aus kodierenden Sequenzen (Venter, Adams et al., 2001). Dieser kodierende Teil bildet schätzungsweise 20.000 bis 25.000 proteinkodierende Gene. Daneben gibt es viele nicht-proteinkodierende Gene für rRNAs, tRNAs, snoRNAs (*small nucleolar RNAs*) und miRNAs (*micro RNAs*). In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl neuer Transkripte mittels cDNA-Sequenzierung (*complementary DNA*) und *Micro-Array*-Analysen ganzer Chromosomen beschrieben. Schätzungen gehen davon aus, dass ca. 50 % des humanen Genoms transkribiert werden (Semon und Duret, 2004). *Micro-Array*-Analysen der humanen Chromosomen 21 und 22 haben eine ungefähr zehn mal höhere Transkription ergeben, als im Bezug auf öffentliche Datenbanken erwartet wurde (Kapranov, Cawley et al., 2002). Erste genomweite Transkriptionsanalysen mit dieser Methode ergaben bei *E.coli*, dass neben den rund 4.000 bekannten ORFs rund 3.000 weitere im DNA-Gegenstrang (*antisense*) vorliegen (Selinger, Cheung et al., 2000). Analysen humaner Zellen ergaben außerdem, dass ungefähr zwei mal mehr Nukleotide in polyadenylierten Transkripten repräsentiert sind, als durch Annotierungen öffentlicher Datenbanken zu erwarten war (Kampa, Cheng et al., 2004; Rinn, Euskirchen et al., 2003; Schadt, Edwards et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass nur ein sehr geringer Teil der neu beschriebenen Transkripte von neuen proteinkodierenden Genen bzw. von Pseudogenen abstammt. Auch der Versuch die neuen Transkripte durch alternatives Spleißen oder durch die Verlängerung bekannter Gene zu erklären war nur im einstelligen Prozentbereich möglich (Johnson, Edwards et al., 2005). Ein Teil der neu identifizierten Transkripte zeigt geringe Abundanz und kann nur schwer durch RT-PCR und Northern Hybridisierung nachgewiesen werden (Kampa, Cheng et al., 2004; Rinn, Euskirchen et al., 2003). Außerdem sind nur 7-20 % der neuen Transkripte der humanen Chromosomen 21 und 22 in Maus konserviert, im Gegensatz zu ca. 44 % Konservierung transkribierter Regionen bekannter Gene.

Nichtkodierende RNA (ncRNA; non-coding RNA) liegt sowohl in polyadenylierter, als auch in nicht polyadenylierter Form im Zellkern und im Zytoplasma vor (Johnson, Edwards et al., 2005). Mehr als 40 % von 33.000 Maus cDNAs sind aufgrund nicht vorhandener ORFs offensichtlich nichtkodierend (Okazaki, Furuno et al., 2002). Auch ein Großteil der neuen humanen cDNAs haben keinen ORF. Somit ist ein großer Teil der neu detektierten Transkripte nicht proteinkodierend (Ota, Suzuki et al., 2004). *Micro-Array*-Analysen an 10 humanen Chromosomen wurden mit Hilfe von 25-mer Oligodesoxyribonukleotiden, welche mit 20 Basenpaaren überlappen, in acht verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Die Kombination dieser Analysen mit 5'- und 3'-*Race*-Reaktionen führte zur Detektion unzähliger Transkripte des Gegenstranges bekannter ORFs. Gut 50 % der detektierten Transkripte zeigen dabei überlappende Transkripte des Gegenstranges der selben Sequenz (Cheng, Kapranov et al., 2005).

1.11.1 *Antisense* Transkripte

Antisense Transkription in Bakterien bzw. *E.coli* scheint regulative Funktion zu haben. Dafür spricht, dass an den meisten *E.coli* Genen *antisense* Transkripte gebildet werden (Selinger, Cheung et al., 2000). Auch bei Analysen zu *Arabidopsis thaliana* wurden 30 % der Transkripte der *antisense* Orientierung zugeordnet (Yamada, Lim et al., 2003). Bei der Untersuchung von EST- (expressed sequence tags; terminal sequenzierte Transkripte) und cDNA-Datenbanken konnten mehr als 5.800 humane Transkript-*Cluster* identifiziert werden, die überlappende *antisense* Transkription aufweisen (Chen, Sun et al., 2004). Durch strangspezifische *Micro-Array*-Analysen wurde gezeigt, dass 11 % der Sonden, welche mit Exonen überlappen, vom *antisense* Strang stammen (Kampa, Cheng et al., 2004). Das Riken cDNA Maus-Projekt untersuchte 102.801 Maus-Transkripte. Dabei stellte sich heraus, dass über die Hälfte der Transkripte, egal ob innerhalb oder außerhalb annotierter Gene, vom DNA-Gegenstrang abstammen (Carninci, Kasukawa et al., 2005; Katayama, Tomaru et al., 2005). Diese Daten werden gestützt durch Chromatin-Immunopräzipitations-Experimente (ChIP) zur Identifikation von Transkriptionsfaktorbindestellen. Diese zeigen die statistisch signifikante Nähe dieser Bindestellen zu den 5'-Termini der *antisense* RNAs (Cawley, Bekiranov et al., 2004).

1.12 Der T-Zell-Rezeptor

Der T-Zell-Rezeptor ist ein membrangebundener Rezeptor, der aus mehreren Untereinheiten zusammensetzt ist. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors wird aus einer α -Kette ($T\alpha$) und einer β -Kette ($T\beta$), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, gebildet (Abb. 1.2). Beide Ketten durchspannen die Plasmamembran und haben eine kurze carboxyterminale Region auf der cytoplasmatischen Seite. Ein kleiner Teil der T-Zellen bildet einen Rezeptor aus, der aus γ - und δ -Ketten, statt aus α - und β -Ketten besteht. Ähnlich den L- und H-Ketten der Immunglobuline haben $T\alpha$ und $T\beta$ konstante und variable Regionen. Die Domänen des T-Zell-Rezeptors sind den V- und C-Domänen der Immunglobuline in der Sequenz und in der dreidimensionalen Struktur homolog. Außerdem existieren in den V-Regionen von $T\alpha$ und $T\beta$ hypervariable Sequenzen, welche die Bindungsstellen für das Epitop bilden (Berg, 2003). Fast alle Wirbeltierzellen präsentieren eine Zusammenstellung von Peptiden auf ihrer Oberfläche, die aus dem Abbau von Proteinen im Zytoplasma stammen. Diese Peptide werden von integralen Membranproteinen dargeboten, die von dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC; *major histocompatibility complex*) kodiert werden. Dabei unterscheidet man zwischen den MHC-Klassen I und II. Es werden je nachdem ob neben dem TCR-Komplex die Oberflächenmoleküle CD4 oder CD8 exprimiert werden, MHC I- oder MHC II- gebundene Moleküle erkannt.

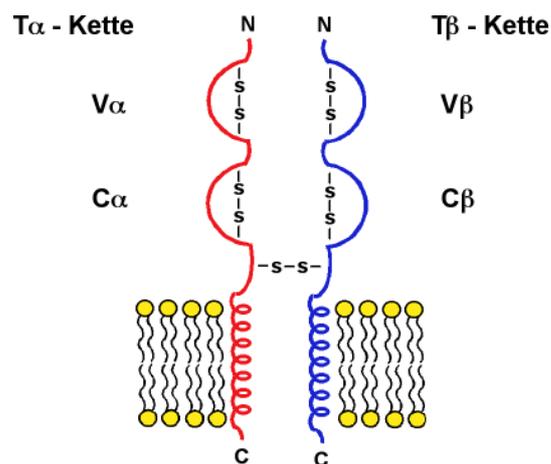


Abbildung 1.2: Der T-Zell-Rezeptor.

Die beiden Ketten des T-Zell-Rezeptors durchspannen die Plasmamembran. Jede Polypeptidkette dieses heterodimeren Rezeptors besteht aus einer variablen und einer konstanten Region. Die variablen ($V\alpha/\beta$) und die konstanten Bereiche ($C\alpha/\beta$) der beiden Ketten des T-Zell-Rezeptors sind gekennzeichnet.

Fremde, an MHC-Klasse-I-Proteine gebundene Peptide kennzeichnen eine Zelle als infiziert und geben sie der Zerstörung durch Killer-T-Zellen frei. Helfer-T-Zellen erkennen hingegen Peptide die an MHC-Proteine der Klasse II gebunden sind. Daraus resultiert die Regulation und die Stimulation der B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (Bommhardt, Beyer et al., 2004). Bei erwachsenen Menschen entwickeln sich T-Zellen ausgehend von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Die eigentliche Reifung der T-Zellen erfolgt erst später im Thymus. Dabei erfahren die lymphoidalen Vorläuferzellen während ihrer Wanderung vom äußeren Cortex bis zur Medulla des Thymus phänotypische, funktionelle und genetische Veränderungen. Diese führen zu den unterschiedlichen Klassen von T-Zellen.

1.12.1 Die Rekombination des T-Zell-Rezeptor- β -Lokus

Der T-Zell-Rezeptor- β -Lokus ist komplex aufgebaut und wird im Laufe der Zellentwicklung rearrangiert. Diese Gen-Umlagerung ist eine Ebene, um die Diversität des T-Zell-Rezeptors zu ermöglichen. Die T-Zell-Entwicklung im Thymus verläuft sequentiell, wobei die sich die T-Zellen von $CD4^-CD8^-$ (CD; *cluster of differentiation*) doppelt negativen (DN) Zellen, zu $CD4^+CD8^-$ bzw. $CD4^-CD8^+$ einzel positiven Zellen entwickeln. Während der frühen α/β -T-Zell-Differenzierung bildet die Umstellung von doppelt negativen zu doppelt positiven (DP) T-Zellen einen wichtigen Kontrollpunkt. Dabei kommt es auf die Expression eines rekombinierten, funktionalen TCR β -Gens an (Fehling und von Boehmer, 1997). Das TCR β -Gen ist aufgebaut aus separaten V- (*variable*), D- (*diversity*), J- (*joining*) und C- (*constant*) Gensegmenten, welche im Verlauf der V(D)J-Rekombination assembliert werden. Innerhalb des ca. 685 kb umfassenden TCR β -Lokus der Keimbahn, befinden sich 64 V-Gensegmente im 5'-Bereich sowie zwei Cluster, bestehend aus der jeweiligen D-, J- und C-Region im 3'-Bereich (Abb. 1.3) (Rowen, Koop et al., 1996).

Eine Ausnahme bildet das Gensegment V β 30, welches das Gen am 3'-Ende begrenzt und in umgekehrter Orientierung zur Transkriptionsrichtung funktionaler Transkripte vorliegt. Zwischen den beiden D β -, J β -, C β - Clustern und V β 30 liegt der TCR β -Enhancer (E β), der eine Schlüsselfunktion bei der Steuerung des Lokus einnimmt.

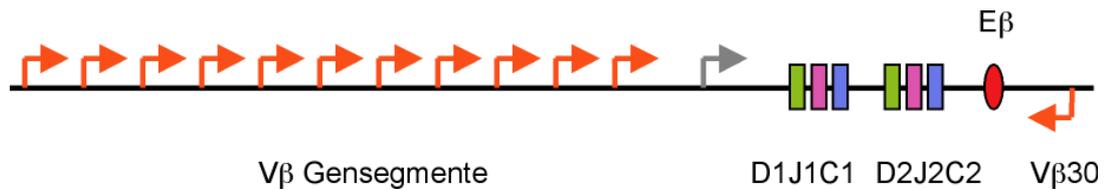


Abbildung 1.3: Der T-Zell-Rezeptor in Keimbahn-Konfiguration.

Schematisch dargestellt sind die V β -, D β -, J β - und C β -Regionen des nichtrekombinierten TCR β -Lokus. Stromaufwärts der zwei D β -/J β -/C β -Cluster befindet sich der Trypsinogen-Lokus (grauer Pfeil) der im Rahmen der spontanen Gen-Umlagerung herausgeschnitten wird. Im 3'-Bereich befindet sich der Enhancer E β und die V-Region V β 30, welche in umgekehrter Richtung zur Transkription funktionaler Transkripte orientiert ist.

Die V(D)J-Rekombination der jeweiligen Lymphoid-Zelllinie ist hochgradig reguliert. Die Vielzahl der kombinierbaren Gensegmente erhöht die Anzahl der möglichen Proteine. Wie auch bei den Immunglobulinen sind mindestens 10^7 verschiedene Spezifitäten durch die Kombination aus diesem Genrepertoire möglich (Sleckman, Bassing et al., 1998). Auf dem Weg zur Synthese eines funktionsfähigen T-Zell-Rezeptors exprimieren doppelt negative Zellen (CD4⁻CD8⁻) im Thymus zunächst einen Prä-T-Zell-Rezeptor, bestehend aus einer einzigen TCR β -Kette. Das geht mit der Umlagerung des Locus einher. Dabei findet zuerst die D β -J β -, gefolgt von der V β -DJ β -Rekombination statt, welche den Gen-Umlagerungsprozess komplettiert (Abb. 1.4). Dabei wird angenommen, dass die D β -J β -Rekombination in einem konkurrierenden Prozess an beiden Allelen im Genom stattfindet. Die V β -DJ β -Rekombination passiert hingegen unabhängig voneinander an beiden Allelen. Sobald ein Allel die zweite Gen-Umlagerung abgeschlossen hat, findet die V β -DJ β -Rekombination am zweiten Allel nur dann statt, wenn das erste Allel nicht funktional ist. Das heißt, wenn zum Beispiel eine Verschiebung des Leserahmens (*frame shift*) der Bildung eines funktionalen Transkriptes entgegensteht. Das Stoppen der V β -Rekombination nach einer korrekt verlaufenen V β -DJ β -Gen-Umlagerung wird Allelischer Ausschluß (*allelic exclusion*) genannt. Dieser ist streng reguliert und stellt sicher, dass T-Zellen nur eine Art der β -Kette exprimieren (Bergman, 1999). Die Grundlage der Gen-Umlagerung sind kurze, aber hoch konservierte Rekombinationssequenzen (RS) in unmittelbarer Nähe der zu rekombinierenden Gensegmente. Diese Sequenzen bestehen aus einem Nukleotid-Nonamer und einem Nukleotid-Heptamer, die entweder durch 12 oder durch 23 Basenpaare voneinander getrennt sind.

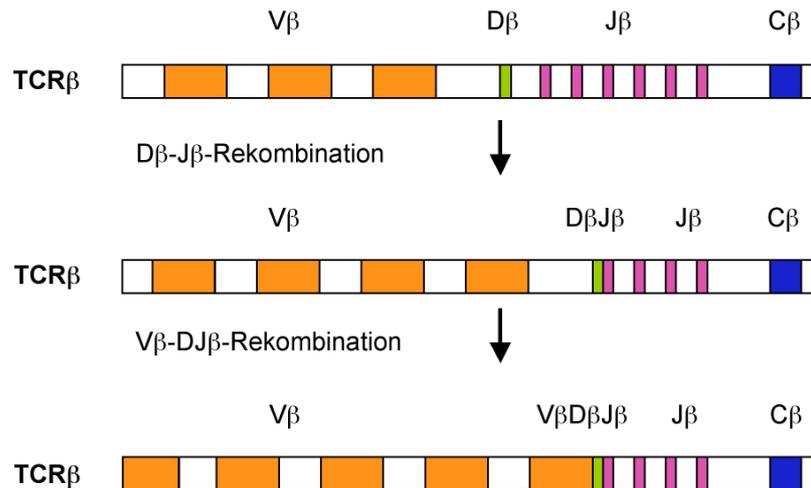


Abbildung 1.4: Die Rekombination des TCRβ-Lokus.

Darstellung des TCRβ-Lokus während seiner Umlagerung. Die Vβ- (orange), Dβ- (grün), Jβ- (lila) und Cβ-Gensegmente (blau) sind gekennzeichnet.

Es gilt die Regel, dass nur Rekombinationssequenzen mit unterschiedlich großen Abständen rekombinieren können (12/23-Kompatibilität) (Tonegawa, 1983). Nach erfolgreicher Rekombination des TCRβ-Lokus findet eine verstärkte Proliferation der T-Zellen statt und der Übergang zu doppelt positiven Zellen ($CD4^+CD8^+$) wird vollzogen. Darüber hinaus wird die Rekombination des TCRα-Lokus eingeleitet (Fehling und von Boehmer, 1997).

1.12.2 Der T-Zell-Rezeptor-β-Lokus

Das komplexe Gen umfaßt 685 kb und besteht aus 65 verschiedenen Gensegmenten. Infolge der Gen-Umlagerung sind die Vβ-, Dβ-, Jβ- und Cβ-Genelemente Teil des ORFs. In Jurkat-Zellen wird dazu das variable Gensegment Vβ12-3, bestehend aus einem Promotor und zweier variabler Exonen, mit den Elementen Dβ1 und Jβ rekombiniert. Dabei wird das zweite Vβ12-3 Exon um diese Elemente verlängert.

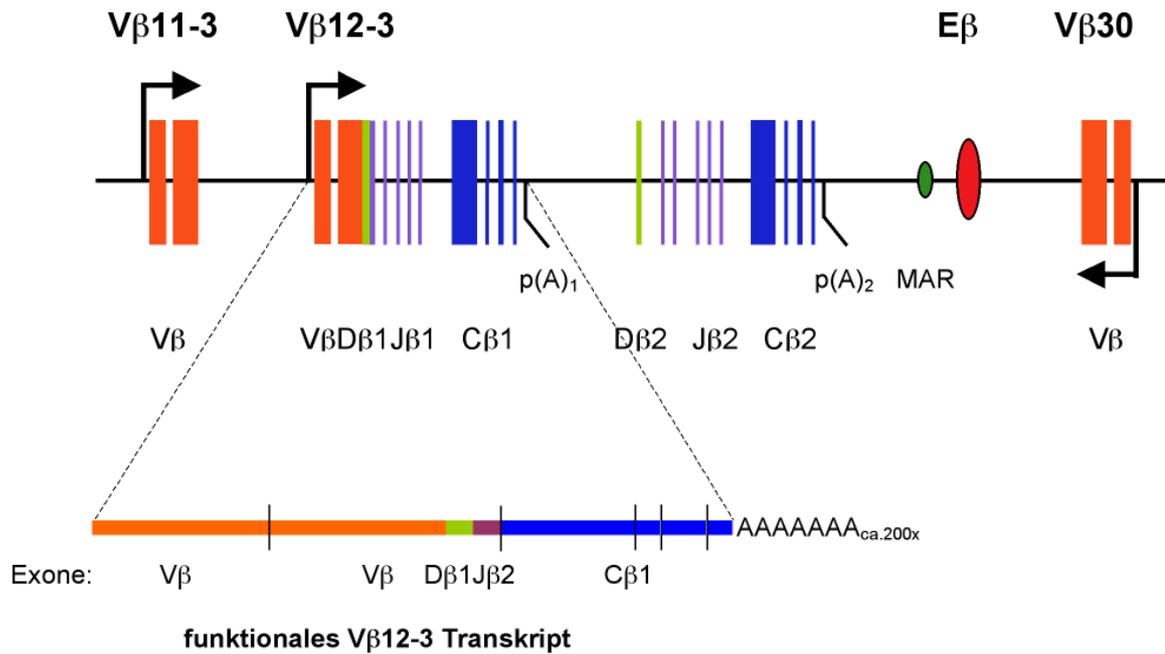


Abbildung 1.5: Der rekombinierten TCRβ-Lokus (Jurkat-T-Zellen) und ein gespleißtes Transkript.

- a) Die variablen Bereiche von Vβ11-3 und Vβ12-3 (orange) liegen stromaufwärts der Dβ- (grün), Jβ- (lila) und Cβ-Elemente (blau). Stromabwärts liegen das MAR-Element (grün) und Eβ (rot). Vβ30 liegt in umgekehrter Orientierung zur Transkriptionsrichtung funktionaler Transkripte.
- b) Das gespleißte Vβ12-3 Transkript besteht aus 6 Exonen stromaufwärts des ersten polyA-Signals.

Während dieses Prozesses findet die für Immunglobuline typische somatische Hypermutation statt. Dabei wird die Basensequenz des Keimbahnpromotors pDβ1 verändert und die Variabilität der T-Zell-Rezeptoren weiter erhöht (Diaz und Lawrence, 2005). Funktionale Primärtranskripte starten am Vβ12-3 Promotor und enden stromabwärts des ersten polyA-Signals (Abb. 1.5). Stromaufwärts von Vβ12-3 liegt die variable Region Vβ11-3. Zwischen dem ersten und dem zweiten polyA-Signal liegt der duplizierte Genbereich, der in Jurkat-Zellen für die Bildung funktionaler Transkripte nicht benötigt wird. Weiter stromabwärts befindet sich ein MAR-Element sowie der Enhancer Eβ.

1.13 Ausgangssituation und Fragestellung

Viele wichtige Fähigkeiten höherer Organismen sind kodiert durch Multigenfamilien. Die Organisation solcher Genfamilien ist jedoch noch wenig charakterisiert. Ein Beispiel für solche komplexen Multigenfamilien stellt der TCR β -Lokus dar. Er umfaßt 685 kb und besteht aus 65 verschiedenen Gensegmenten, die je nach Zelllinie rekombiniert werden. Ein Schlüsselement der Genexpression des Lokus ist der Enhancer E β . Dabei wurde gezeigt, dass E β neben der Wechselwirkung mit seinem Zielpromotor auch eine wichtige Rolle bei der Gen-Umlagerung des TCR β -Lokus spielt (Bouvier, Watrin et al., 1996). Auch interagiert E β in dem Keimzellstadium von T-Zellen spezifisch mit dem Promotor pD β 1 und steuert somit die Transkription dieses Promotors in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Zellen (Spicuglia, Kumar et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, wie spezifisch die Wechselwirkung von E β mit seinem Zielpromotor ist und welche molekularen Mechanismen die Wechselwirkungen mit dem Zielpromotor regulieren. Dazu sollen vergleichende Transkriptanalysen durchgeführt werden, in deren Zentrum das Gensegment des Zielpromotors und die angrenzenden nicht funktionalen Gensegmente stehen. Durch vergleichende CHIP-Analysen des funktionalen Lokus mit den angrenzenden nicht rekombinierten Gensegmenten soll neben dem Chromatinstatus auch die Besetzung mit Transkriptionskomplexen untersucht werden. In Analysen zu putativen Regulations-elementen des Lokus werden auch stabil replizierende EBV-Plasmid-Vektoren verwendet werden. In diesen Plasmid-Vektoren können Elemente des TCR β -Lokus modellhaft nachgebildet und mittels Transkriptanalysen in Abhängigkeit von E β untersucht werden.

Der distale Enhancer des TCR β -Lokus kann auch als Modell zur Untersuchung genereller Mechanismen der Promotor-Enhancer-Interaktion herangezogen werden. Bisher wurden erst einigen Elementen von E β eine Funktion zugeordnet. Mit Hilfe von EBV-Vektor-Systemen können Mutationsanalysen dazu beitragen, weiteren Elementen des Enhancers Funktionen zuzuordnen.

2 Material

2.1 Geräte und Hilfsmittel

Apparaturen für die Elektrophorese von Acrylamidgelen	SE 250, SE 280 and SE 600, Amersham Biosciences
Analysenwaagen	AE 100 und 163, Mettler
	SBC32, SPB55 und SPB63, Scaltec
Autoradiographiekassetten	Appligene, Amersham Biosciences
Blockthermostat	TCR 100, Roth
Direkt Imager	Instant Imager, Packard
Durchflußzytometer	FACS Calibur, Becton Dickinson
Entwicklermaschine	Hyperprocessor, Amersham Biosciences
	Curix 60, Agfa
Elektroblotmaschine	Trans-Blot SD, BioRad
Gefrierschränke	HFU686 und HFU630, Heraeus
Geigerzähler	LB122, Berthold
Heizblöcke	Thermomixer Compact, Eppendorf
Heizrührgeräte	RCT Basic, IKA Labortechnik
Homogenisator	Dounce, Wheaton
Inkubatoren	WJ311, Forma Scientific
	Unequip, Unitherm
	B6200, Heraeus
Konduktometer	Typ 703, Knick
Kühlschränke	Liebherr, BEKO
Lichtmikroskop	IM35 und Axiovert, Zeiss
Magnetrührer	REO, IKAMAG
Netzteile	EPS 2A200, Amersham Biosciences
	Modell 3000 XiPowerPac 200 und 3000, BioRad
	E432 und E734, Consort

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

Varifuge 3.0R, Biofuge 28RS und
 Multifuge 3L-R, Heraeus
 EBA 3S und Rotanta/RPC, Hettich
 5B Plus und 5C Plus, Sorvall

2.2 Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

AT-Cloning-Kit	pGEM-T; Promega PCR2.1; Invitrogen
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
Gelfiltrationssäulchen (MicroSpin S-200)	APB
Gewebekulturplatte (96-Loch), Microtest III, Falcon 3075	Becton Dickinson
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Health Care
GFX Micro Plasmid Kit	GE Health Care
Luziferase-Reporter-System	Promega
Sephadex G-50 (Nick column)	APB
Nitrozellulosemembran (0,45 µm Porendurchmesser)	BioRad
Nitrozelluloserundfilter (BA85)	Schleicher & Schüll
Nucleobond AX Plasmid DNA Kit	Machery & Nagel
Oligotex Direct mRNA mini Kit	Qiagen
Oligotex RNA Midi/Maxi Kit	Qiagen
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym, Eppendorf
pH-Indikatorpapier (Neutralit pH 5-10)	Merck
RNA-Zap-System	Ambion
Sterilfilter (Millex-GP, 0,22 µm)	Millipore
SYBR Green	ABS
Ultrafiltrationseinheit (MWCO 30 kDa)	Amicon

Ultrafiltration-Filtereinheit (MWCO 10 kDa)	Millipore
Ultrafree-Filtereinheit (0,45 µm Porendurchmesser)	Millipore
Whatman 3MM Papier	Bender & Hobein
Zellkulturflaschen, Nunclon Surface	Nalge Nunc International

2.3 Chemikalien

Agarose	Gibco,
α-Amanitin	Roche
α-(32 P)-dCTP	APB
Acrylamid	Fluka
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 30% (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Acrylamidlösung 30% (Rotiphorese Gel A)	Roth
Actinomycin D	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Roth
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Roth
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bacto Yeast Extract	Difco
Bisacrylamidlösung 2% (Rotiphorese Gel B)	Roth
Bradford Reagenzlösung	BioRad
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	Peqlab
Bromphenolblau	Sigma
BSA (10 mg/ml)	New England Biolabs
Cäsiumchlorid	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Merck
Coomassie-Brillantblau R-250	Sigma
Deoxychololat (DOC)	Sigma
DEPC behandeltes aqua dest.	Ambion
Desoxyribonukleotidtriphosphate	Amersham Biosciences

N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylpimelimidat (DMP)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Doxycyclin	Sigma
Emetin	Sigma
Ethanol	Merck, Riedel-de Hæn
Ethanolamin	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, PAA, PAN
Glucose	Merck
L-Glutaminlösung (200 mM)	Gibco BRL
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Glykogen (aus Austern)	Sigma
Harnstoff	Roth
HEPES	Biomol
IGEPAL CA630 (NP-40)	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kompetente Zellen	GC5; Biomol XL-10; Stratagene Dh5 α ; Stratagene
Lachssperma-DNA	Sigma
N-Laurylsarcosin	Sigma
Lithiumchlorid	Sigma
Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH
Magnesiumchlorid	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma

Methanol	Merck, Roth
Magnetic Labeling System (MACS)	Miltenyibiotec
MOPS	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Sigma
Natriumborat	Roth
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Nitroblautetrazolium (NBT)	Peqlab
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Serva, Sigma
Oligo(dT)-Primer	Invitrogen
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin/Streptomycinlösung (100x)	Biochrom
Phenylmethylsulfonyluorid (PMSF)	Biomol, Roth
Phenol (TE-gesättigte Lösung)	Roth
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Protein A-Sepharose	Amersham Biosciences
Protein G-Sepharose	Amersham Biosciences
Roti-Phenol/Chloroformlösung (TE-gesättigt)	Roth
RPMI 1640-Medium	Gibco BRL
Saccharose	Merck, Roth
Salzsäure (37 %)	Merck, Roth
5-Sulfosalicylsäure	Sigma
Trichloressigsäure	Fluka
Triton-X100	Sigma
Trishydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Sigma
Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	Gibco BRL

2.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	CIAP; Fermentas
DNA-Polymerase I (Kleenow)	Fermentas
DNA-Polymerase Taq	Fermentas
DNA-Polymerase AmpliTaq Gold	ABS
DNA-Polymerase Taq Plus Long	Stratagene
DNA-Ligase T4	Fermentas
DNA-Polymerase Pfu	Fermentas
DNase I	Sigma, Quiagen
DNase Turbo	Ambion
Lysozym	Sigma
Polynukleotid-Kinase	Fermentas
Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, NEB
Reverse Transkriptase	AMV ThermoScript; Invitrogen M-MLV; Invitrogen M-MLV Accuscript; Stratagen
RNase A	Ambion
RNase H	Invitrogen
RNase Inhibitor	RNase Out; Invitrogen

2.5 Oligodesoxyribonukleotide

Oligo	Name	Sequenz
oAH1	Luc_S2_f	GCTCTAAGATTCCAACCTATGG
oAH2	Luc_S1_b	AGTCCTTGGGGTCTTCTACCT
oAH8	TBPnRNA_f	GCAGGCTGTTGTTCTGATCCA
oAH9	TBPnRNA_f	GCCTGTGAAGATAACCCAAGG
oAH35	WT_f	GATCCCTAAACCAATAAAAAATGTTCTGGTCTGGCCTGACTCTGACTTGTGAATGTCTGGG
oAH36	WT_b	TCGACCCAGACATTCACAAGTCAGAGTCAGGCCAGACCAGAACATTTTTATTGGTTTAGG
oAH37	up_pA_f	GATCCCTGGGACAATAAAAAATGTTCTGGTCTGGCCTGACTCTGACTTGTGAATGTCTGGG
oAH38	up_pA_b	TCGACCCAGACATTCACAAGTCAGAGTCAGGCCAGACCAGAACATTTTTATTGTCCCAGG
oAH39	pA_f	GATCCCTAAACCAGGAAAAATGTTCTGGTCTGGCCTGACTCTGACTTGTGAATGTCTGGG
oAH40	pA_b	TCGACCCAGACATTCACAAGTCAGAGTCAGGCCAGACCAGAACATTTTTCTGGTTTAGG
oAH41	1.+2.Box_f	GATCCCTAAACCAATAAAAAATGTTCTGGTCTGAATTGACTCTGACTTGTGAATCTAGGGG
oAH42	1.+2.Box_b	TCGACCCCTAGATTCAACAAGTCAGAGTCAATTCAGACCAGAACATTTTTATTGGTTTAGG
oAH43	pA_frag_RT_b	TGGTTTAGGGATCCCCTAGATGGTTTAGGTCGAC
oAH44	pA_frag_RT_b1	ATTTTTATTGTCCCAGGGATC
oAH52	12-3_Spl_V1	AGAATATTCCACATCTGCTCTCA
oAH53	12-3_Spl_V2	TATTCCACATCTGCTCTCACTCT
oAH74	21.2_1a	GTGAATCGTCTACTGCTTCCCTC
oAH96	21.2_8	TCTGTAAGGACAGCAACATCC
oAH97	21.2_9	TTCCCTAGGACTCACCTTCCAC
oAH98	T05_f	TGCTGGGTGGCCTTCTGTCTC
oAH99	T05_b	ATTGCACCAAAAAGCCACAGGC
oAH100	21.2_Ex/Ex_3f	CTGTCTCTGGTGGGAAGAACT
oAH101	21.2_2a	TAGGCAACTGTGAATCGTCTACT
oAH102	8.1_17	AGTCTTCAGAATATTTGCCATCA
oAH103	8.1_16	AGAGTCACTTCTTGTCCCATCTC
oAH104	8.1_Ex1-2_f	GCATCCTGGTAGCGAGTGAGT
oAH105	8.1_Ex1-2_b	CTCTGTACCTCATGGCGG
oAH106	8.1_14	ACAACGTTCCGATAGATGATTC
oAH107	C1_Ex_b	TCTGATGGCTCAAACACAGC
oAH108	8.1_Ex/Ex_f	TGGTAGCGAAGCATACAGATG
oAH109	20.1_12	TGTAAATGGCACTTTATCTTTCC
oAH110	20.1_10	CCAATACCAACGGAGTAGAAGA
oAH111	20.1_11	AGCTTCTTAGAACTCAGGATGAACT
oAH112	20.1_13	CCAGACTAGCTGAAGGAAAGG
oAH113	20.1_Ex_f	CTGATCTGGCCAATACCAAC
oAH114	up MAR f1	GTTTTGAGCACGTCTACTTTTC
oAH115	up MAR b1	CAAAGTTCCCCCTTTACTCTTT
oAH116	dstr Enh f1	GGTCTCTAGAGGGGAATCTAGGT
oAH117	dstr Enh b1	CAGTTATTGCAGCTGTTTTTCA
oAH429	oAT-429	CAGTGACATAGATGGTCTGCTCA
oAH430	oAT-430	GGCAGAGGTTAGTCTGACTGTGT
oAH510	oAT-510	ACCAATTTTCAGGCCACAACCTC
oAH511	oAT-511	CAGCAGTTTCTCGACCTGTTC
oAH516	oAT-616	CAGCAGTTTCTCGACCTGTTC

2.5.1 Oligodesoxyribonukleotide der Transkriptanalysen

(Hybridisierungstemperatur in °C)

Primerpaar		Spezifität	Hyb.-temperatur
oAH96	oAH97	ungespleißt	60
oAH98	oAH99	ungespleißt	62
oAH100	oAH101	gespleißt	58
oAH100	oAH74	gespleißt	58
oAH102	oAH103	ungespleißt	58
oAH104	oAH105	ungespleißt	58
oAH106	oAH107	gespleißt	60
oAH108	oAH105	gespleißt	60
oAH109	oAH110	ungespleißt	58
oAH109	oAH111	ungespleißt	58
oAH112	oAH110	gespleißt	58
oAH112	oAH113	gespleißt	58
oAH114	oAH115	-	63
oAH116	oAH117	-	63
oAH1	oAH2	gespleißt	60
oAH8	oAH9	gespleißt	58
oAH511	oAH516	rekombiniert	60
oAH575	oAH576	-	60
oAH429	oAH430	-	60
oAH577	oAH578	-	60
oAH579	oAH580	-	60
oAH510	oAH518	nicht rekombiniert	60
oAH557	oAH578	nicht rekombiniert	60
oAH104	oAH43	ungespleißt	58
oAH108	oAH43	gespleißt	58
oAH104	oAH44	ungespleißt	58
oAH108	oAH45	gespleißt	58
oAH52	oAH105	-	58
oAH53	oAH105	-	58

2.5.2 Oligodesoxyribonukleotide der ChIP-Analysen

Primer-Paar Name	Primer 1	Sequenz	Primer 2	Sequenz
V2	oAT529	AGGCCTCATTCTGCTGTGATCC	oAT530	GCGCAAGATCACTTCTCTGTCCCA
V11-3	oAT462	GGAACCTTCTCTGTAAGGACAGCA	oAT463	ATCACTGGGAGATTATGTGAGGA
upV12-3	oAT421	ACGTATGAGGCATAGTCCAGTGT	oAT422	CCGGGTACAAAATACAGGTACAG
V12-3 a	oAT114	TGACCATGGCACCAAGCTACCAGTGAGAG	oAT115	AGAGATGCACACTTGACAGAGG
V12-3 b	oAT116	TGACCATGATCCAGGGAGCCTCTGCAAGTG	oAT117	GGCCCTCTGTGAGCATGAGCA
V12-3 c	oAT390	TCACTCTGCCATGGACTCCTG	oAT391	CAGAAGCCCCAGCCTGATGAT
V12-3 d	oAT425	ATCCTGGTAGCGAGTGAGTCTTC	oAT426	AGTCACTTCTGTCCCCATCTCTG
upVDJ	oAT510	ACCAATTTTCAGGCCACAACCTC	oAT512	GAACAGGTCGAGAACTGCTG
J1.2	oAT559	ACTATGGCTACACCTTCGGTTC	oAT560	TCTCTTTGACATTTCCAGGAC
J1.5	oAT563	ATGATGCACTGTGTAGCAATCAG	oAT564	TTTTACTCAATCTGCCTCACCAG
upC1	oAT126	TGACCATGCCAGGAAGCCCTAGTACAACC	oAT127	CACTCAACGCTTGGTGTGTG
C1pA	oAT136	TGACCATGCTCCCTAACCCAGGGGACCTT	oAT137	GGGCCCTCATCCCTCTTACG
doC1pA	oAT427	CAGAGGAAGAGCCAACCTATACA	oAT428	GGGTAACCTAAACCCGAAGACAC
D2	oAT429	CAGTGACATAGATGGTCTGCTCA	oAT430	GGCAGAGGTTAGTCTGACTGTGT
J2.3	oAT565	AAGGCTCTAGGCTGACCGTACT	oAT566	CCAAAATACTGCGTATCTGTGCT
upC2	oAT144	TGACCATGCCAAGGAGATGCTCAGGACAG	oAT145	ACCCCTGAGTTTTCTCAGCTC
doC2pA a	oAT208	GCTATGACCATGTAGAACAGTGAGAGGGGCTGA	oAT209	TACCTGTTCTGGGATCATTG
doC2pA b	oAT154	TGACCATGAGCCCTTCCAATGGGCTTCTTC	oAT155	GCCTCTCTCAGCCCCTCTCACTG
up MAR	oAT214	GCTATGACCATGGAGTTTCTGGGTGCAGCATTAA	oAT215	ACTGGGTGTCACCTGTGTAGG
MAR	oAT431	AAGATCACAGCTCAACAGAGACC	oAT432	AGGAGGACATATAAGCCACAGAGA
upEb	oAT553	ACTGGAGCCCTGACACCTGT	oAT554	GATTGAGGGCCACTCTCCTTT
Eb	oAT433	TAATAGCTGACAACCTGGGGTAGG	oAT434	CAGGTAGAAAAGAGCAGCATAGGA
V30 c	oAT543	CAAACCCCAACCTATACTGGTAC	oAT544	ACACTCCAGGCACAGAGATAGAA
V30 b	oAT541	AAGGAAAGGCTGGCTTGGATGAT	oAT542	ATCAGATCAGCCCCTAAGGCTAA
V30 a	oAT539	CTTTCCAGGCTTCTGATGTCTC	oAT540	ATCTGCTGCCAGAGCAGAGGAAT
V12-3 GL	oAT559	ACTATGGCTACACCTTCGGTTC	oAT560	TCTCTTTGACATTTCCAGGAC
upV29-1	oAT545	TACAGGAAGGTTTGGGCTGTGTG	oAT546	CTCTGGGGAATGTTATGGATAC
V29-1	oAT523	CATCACTTGAAGATGCTGAGTCT	oAT524	CTTTATCTCTCCAATACCACCTC
D1	oAT557	CTCTATAAGGACATGCCCCCAAC	oAT558	CACGTGCTCCTCAGGATGTTTTGA

2.6 BAC Klone

Folgende BAC Klone (humane, genomischer DNA) des Children's Hospital Oakland Research Institute wurden als Matrize in den PCR-Analysen und für die Erstellung von Primer-Eichkurven verwendet:

CHORI RPCI 11-114B6

CHORI RPCI 11-785K24

CHORI RPCI 11-243N15.

Die drei BACs enthalten überlappende DNA-Fragmente, welche den nicht rekombinierten TCR β -Lokus mindestens in dem Bereich von V β 11-3 bis V β 30 abdecken. Es wurde eine Mischung der BACs in den beschriebenen Analysen eingesetzt. In dem verwendeten Ansatz ist jeder BAC Klon im gleichen Mengenverhältnis enthält. Dem Ansatz wurde eine bestimmte Anzahl relativer Einheiten (Moleküle) zugeordnet (10.038.640.800 relative Einheiten). Zur Erstellung der Eichkurven wurden Verdünnungsstufen erstellt, die in der quantitativen PCR als Matrize eingesetzt wurden. Für die aufgelisteten Primerpaare wurden

Eichkurven unter Verwendung des BAC Ansatzes erstellt und die Geradengleichung bestimmt (Verhältnis relativer Einheiten zum ct-Wert der Reaktion).

BAC-Ansatz:

CHORI RPCI 11-114B6 0,37 µg/µl **5 µl**
 (171,367 kB, 113104,2 kDa, 5 µl = 1850 ng = 16,67 fmol = 10.038.640.869 relative Einheiten)

CHORI RPCI 11-785K24 0,123 µg/µl **16,2 µl**
 (173,362 kB, 114418,9 kDa, 5 µl = 615 ng = 5,15 fmol = 3.101.391.501 relative Einheiten)

CHORI RPCI 11-243N15 0,15 µg/µl **12,9 µl**
 (179,344 kB, 118367,04 kDa, 5 µl = 750 ng = 6,46 fmol = 3.887.832.376 relative Einheiten)

34,1 µl

Primerpaar		Geradengleichung der Eichkurve
oAH96	oAH97	$y = -1,3954\text{Ln}(x) + 41,377$
oAH102	oAH103	$y = -1,6057\text{Ln}(x) + 45,516$
oAH104	oAH105	$y = -1,5847\text{Ln}(x) + 43,407$
oAH109	oAH110	$y = -1,7595\text{Ln}(x) + 48,758$
oAH109	oAH111	$y = -1,683\text{Ln}(x) + 45,669$
oAH114	oAH115	$y = -1,5158\text{Ln}(x) + 41,924$
oAH116	oAH117	$y = -1,269\text{Ln}(x) + 40,564$
oAH575	oAH576	$y = -1,3681\text{Ln}(x) + 41,574$
oAH429	oAH430	$y = -1,4637\text{Ln}(x) + 43,111$
oAH577	oAH578	$y = -1,4975\text{Ln}(x) + 43,056$
oAH579	oAH580	$y = -1,4063\text{Ln}(x) + 41,321$
oAH510	oAH518	$y = -1,3681\text{Ln}(x) + 41,574$

2.7 Antikörper

- | | |
|----------------------------------|---------------------------|
| Antikörper gegen Histon H3: | Abcam ab1791 |
| Antikörper gegen H3K4-Dimethyl: | Abcam ab8580 |
| Antikörper gegen H3K4-Trimethyl: | Upstate 07-030 |
| Antikörper gegen Rpb1 | Santa Cruz SC-899 (CN-20) |

2.8 Plasmid-Vektoren

pSJ18, pSJ19, pSJ20	(Stefan Jühnemann)
pGL2 Basic	(Promega)
pGEM-T	(Promega)
pSS15, pSS16, pSS17, pSS19	(Diss. Silvia Sanner)
pJC13-1	(Chung, Bell et al., 1997)
pPHS1, pPHS54	(Diss. P. Haus-Seuffert)
pREP4, pREP4 cat.	Invitrogen
PCR2.1	Invitrogen

2.9 Eβ Fragment Sequenzen

Sequenzen der in der Mutationsanalyse verwendeten Eβ-Fragmente: Punktmutationen sind rot hervorgehoben.

	1	20	40	60	80
A (WT)	GCTGACAAC TGGGGTAGGAATGGGGGTTCTGAGCCCAGTGTGGCTGCCGGGCTGTTTATCTCTGAGTCACATCAGCACCAAGCCACAGC				
B (pAH2)	GCTGACAAC TGGGGTAGGAATGGGGGTTCTGAGCCCAGTGTGGCTGCCGGGCTGTTTATCTCTGAGTCACATCAGCACCAAGCCACAGC				
C (pAH60)	-----				
F (pAH61)	-----				
E (pAH62)	-----				
D (pAH63)	-----CAGC				
	100	120	140	160	180
A (WT)	AGCCACCTGCCCTAGCTCCATCTCTTACAGTCACAACAGGATGTGGTTTGACATTTACTGGGTCCTGCATCTGGGGTGCCTGTGAAAGTT				
B (pAH2)	AGCCACCTGCCCTAGCTCCATCTCTTACAGTCACAACAGGATGTGGTTTGACATTTACTGGGTCCTGCATCTGGGGTGCCTGTGAAAGTT				
C (pAH60)	--CCACCTGCCCTAGCTCCATCTCTTACAGTCACAACAGGATGTGGTTTGACATTTACTGGGTCCTGCATCTGGGGTGCCTGTGAAAGTT				
F (pAH61)	-----TGTGGTTTGACATTTACTGGGTCCTGCATCTGGGGTGCCTGTGAAAGTT				
E (pAH62)	-----CAGGATGTGGTTTGACATTTCTGGGTCCTGCATCTGGGGTGCCTGTGAAAGTT				
D (pAH63)	-----CAGGATGTGGTTTGACATTTACTGGGTCCTGCATCTGGGGTGCCTGTGAAAGTT				
	200	220	240	260	
A (WT)	GCTCCCTCCACCCACCCACCTTCAGAGCATCATGAGAACCACACTCACCGCATCCGGCACCCAACCCCTCCTATGCTGCTCTTTCTACC				
B (pAH2)	GCTCCCTCCACCCACCCACCTTCAGAGCATCATGAGAACCACACTCACCGCATCCGGCACCCAACCCCTCCTATGCTGCTCTTTCTACC				
C (pAH60)	GCTCCCTCCACCCACCCACCTTCAGAGCATCATGAGAACCACACTCACCGCATCCGG-----				
F (pAH61)	GCTCCCTCCACCCACCCACCTTCAGAGCATCATGAGAACCACACTCACCGCATCCGG-----				
E (pAH62)	GCTCCCTCCACCCACCCACCTTCAGAGCATCATGAGAACCACACTCACCGCATCCGG-----				
D (pAH63)	GCTCCCTCCACCCACCCACCTTCAGAGCATCATGAGAACCACACTCACCGCATCCGGCACCCAACCCCTCCTATGCTG-----				
	280	300	320		
A (WT)	TGGGCCCTGGTTAGCATCCTGGCAGTAGAAATAGAACTTCAGAGGGGAGGGGCAGGGTCT				
B (pAH2)	TGGGCCCTGGTTAGCATCCTGGCAGTAGAAATAGAACTTCAGAAAGGGAGGGGCAGGGTCT				
C (pAH60)	-----				
F (pAH61)	-----				
E (pAH62)	-----				
D (pAH63)	-----				

2.10 Eukaryotische Zelllinien

Jurkat J6 humane leukämische T-Zell-Lymphoblasten

HeLa-Zellen

humanes Cervix-Karzinom

2.11 DNA-Längenstandards

1 kb DNA-Leiter (Gene Ruler), MBI Fermentas

Fragmentlängen in bp: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250;

100 bp DNA-Leiter Plus (Gene Ruler), MBI Fermentas

Fragmentlängen in bp: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100;

SDS-PAGE Protein-Standard (niedriger Bereich), BioRad

Molekulargewichtsstandard in kDa: 97, 66, 45, 31, 21,5, 14,4;

SDS-PAGE Protein-Standard (hoher Bereich), BioRad

Molekulargewichtsstandard in kDa: 200, 116, 97, 66, 45

3 Methoden

3.1 Prokaryotische Zellkultur

Escherichia coli (*E.coli*) wurde in sterilen Glas- oder Kunststoffgefäßen in Flüssigkultur unter guter Belüftung bei 37°C im Schüttler inkubiert. Hierzu wurde LB-Medium verwendet. In Abhängigkeit von den Resistenzgenen der Plasmid-Vektoren wurden verschiedene Antibiotika zur Selektion dem Medium zugegeben.

Auf LB-Festmedium wurde *E.coli* mit einer sterilen Platinöse überimpfen und ebenfalls bei 37°C im Brutschrank inkubieren.

Antibiotika:

Ampicillin	100 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/ml
Kanamycin	100 µg/ml;

LB-Medium:

1 % (w/v)	Bactotrypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
1 % (w/v)	NaCl;

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

3.2 Prokaryotische Dauerkulturen

Für das Anlegen von Dauerkulturen wurden 500 µl gewachsener Bakterienkultur mit 500 µl 50 %-igem Glycerin (v/v) gemischt und in 2 ml Nunc-Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckel bei -80°C eingefroren.

3.3 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*

Der Bakterienstamm wurde auf einer LB-Platte ausgestrichen, die gegebenenfalls mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt war und über Nacht bei 37° C bebrütet wurde. Eine

einzelne Kolonie wurde in 20 ml TYM bis zu einer OD_{600} von 0,2-0,8 vermehrt. Die Suspension wurde auf 100 ml TYM verdünnt und in einem 1 l Kolben bis zu einer OD_{600} von 0,6 gezogen. Anschließend wurde mit TYM-Medium auf 500 ml aufgefüllt und abermals bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Nun wurde durch sanftes Schütteln des Kolbens in einem Eis-/Kochsalzbad rasch auf 0° C heruntergekühlt, bei 4000 rpm und 0° C im GSA-Rotor 10 min zentrifugiert und das Sediment vorsichtig in kaltem (4°C) 100 ml TfBI suspendiert. Danach wurde wie oben beschrieben abzentrifugiert (8 min), der Überstand abgegossen und das Sediment durch vorsichtiges Schütteln auf Eis in 20 ml kaltem (4°C) TfBII suspendiert. Schließlich wurden 0,1 ml Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

TYM-Medium:	2 % (w/v) Bactotrypton	TfBI:	30 mM Kaliumacetat
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt		50 mM $MnCl_2$
	100 mM NaCl		100 mM NaCl
	10 mM $MgSO_4$		10 mM $MgSO_4$

TfBII:	10 mM MOPS (pH 7,0)
	75 mM $CaCl_2$
	10 mM KCl
	10 % (v/v) Glycerin

$MgSO_4$ -Stammlösung: 1 M, steril filtriert; wurde dem TYM-Medium erst nach dem Autoklavieren zugefügt

$MnCl_2$ -Stammlösung: 1 M, steril filtriert; wurde dem TfBI-Puffer erst nach dem Autoklavieren zugefügt

3.4 Transformation chemisch kompetenter *E.coli*

100 μ l kompetente *E.coli* wurden mit dem halben Ligationsansatz (5-7,5 μ l) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Um die Aufnahme der DNA in die Zelle zu ermöglichen, wurden die Zellen für 45 sec (3 min) bei 42°C (37°C) und weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei RT mit 1 ml LB-Medium versetzt und 60 min bei 37°C auf einem Thermoschüttler inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf LB-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert. Nach 16 h Inkubation bei 37°C wurden Klone entsprechend der weiteren Verwendung gepickt.

3.5 Eukaryotische Zellkultur

3.5.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Alle Arbeiten wurden unter Laminarfluß mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, autoklavierten Glaswaren und mit vom Hersteller entkeimten Kunststoffmaterialien sowie Nährmedien durchgeführt. Das FCS wurde vor Gebrauch zur Inaktivierung des Komplementsystems 30 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Jurkat-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium gehalten, welches mit 10 % FCS (v/v), 1000 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin supplementiert wurde. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Haltung erfolgte in horizontal gelagerten Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 2,5 x 10⁵ Zellen/ml bis 1,2 x 10⁶ Zellen/ml gehalten. Bei logarithmischem Wachstum verdoppelte sich die Zelldichte bei 37°C aller 20 h. In einer Neubauer Zählkammer wurden unter dem Lichtmikroskop die Zellen gezählt.

3.5.2 Elektroporation

Unter den zahlreichen Methoden zur Transfektion menschlicher Tumor-Zelllinien ist die Elektroporation die Methode der Wahl, um bei schlecht zu transfizierenden Zellen relativ hohe Transfektionseffizienzen (5-10%) zu erzielen. Auch HeLa-Zellen wurden mit dieser Methode effektiv transfiziert.

Am Vortag der Elektroporation wurden die Zellen mit neuem Medium versetzt und auf eine Dichte von 3,5 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Am Tag der Transfektion wurde die Zelldichte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt und damit das logarithmische Wachstum überprüft. Nur bei optimalem Wachstum (Verdopplungszeit ca. 20h) war die Elektroporation erfolgreich. Die Zellen wurden zunächst für 5 min bei 1000 rpm und RT abzentrifugiert, einmal in 1x PBS-Puffer resuspendiert und wieder unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Dann wurden die Jurkat-Zellen auf eine Dichte von 3,5 x 10⁷ Zellen/ml (HeLa-Zellen 1,5 x 10⁷ Zellen/ml) mit RPMI 1640-Medium (ohne Serum) eingestellt. Die zu transfizierende Plasmid-DNA hatte meist eine Konzentration von ca. 1 mg/ml, um nur ein kleines Volumen der DNA-Lösung verwenden zu müssen. Die Standardmenge des transfizierten Reporter-Plasmids betrug 10 µg. Sollte ein Protein überexprimiert werden, wurden zwischen 5 µg und 10 µg Expressions-Plasmid

cotransfiziert. Die Gesamtmenge an transfizierter DNA wurde zwischen verschiedenen Ansätzen mit dem entsprechenden Expressions-Plasmid ohne kloniertem Fragment (*Insert*) ausgeglichen. Bei transienter Transfektion wurde dem Ansatz 1 µg des Expressions-Plasmids pRc/CMV-β-Galaktosidase zugegeben, um die Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Ansätzen mit Hilfe der β-Galaktosidase-Analyse abgleichen zu können. Bei stabiler Transfektion wurde die Proteinmenge im Luziferase-Reporter-System über den Bradford-Test bestimmt, um unterschiedliche Zellzahlen ausgleichen zu können. Die DNA-Lösung wurde in der sterilen Elektroporationsküvette (4 mm) vorgelegt, anschließend wurden 0,4 ml der $3,5 \times 10^7$ Zellen/ml enthaltenden Jurkat-Zell-Suspension (bzw. 0,4 ml der $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml enthaltenden HeLa Zell-Suspension) zugegeben und mit der DNA-Lösung vermischt. Es wurden also $1,4 \times 10^7$ Jurkat-Zellen (bzw. 6×10^6 HeLa-Zellen) pro Ansatz transfiziert.

Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Küvette in die Elektroporationsapparatur gesteckt und ein Puls appliziert. Für Jurkat-Zellen erwiesen sich 950 µF und 250 V (Zeitkonstante 30 ± 5) als diejenigen Parameter, bei denen die größte Reporterogenaktivität gemessen wurde. HeLa-Zellen wurden unter gleichen Bedingungen elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 15 min bei RT in der Küvette belassen, anschließend in 10 ml 10 % FCS enthaltendes RPMI 1640-Medium gegeben und für 48 h im Zellinkubator inkubiert.

3.5.3 Auswertung der Transfektion

44 bis 48 h nach der Transfektion wurden die Transfektionen ausgewertet. Die Jurkat-Zellen wurden dafür für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert, einmal mit 1 x PBS-Puffer gewaschen und wieder abzentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 150 µl Lysis-Puffer aufgenommen, mit der Pipette resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lysat im Eppendorf-Gefäß für 2 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. 40 µl dieses cytoplasmatischen Proteinextraktes wurden in die Vertiefungen einer 96-well-Platte gegeben und diese in die Halterung des Lumineszenzmessgerätes gesteckt. Nach automatischer Einspritzung von 50 µl Luziferase-Reagenz, wurde für 10 sec das emittierte Licht gemessen, was bei der enzymatischen Umsetzung des Substrats gebildet wurde. Die Anzahl der gemessenen relativen Lichteinheiten ist dabei ein Maß für die Menge der im Proteinextrakt enthaltenen Luziferase.

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
Luziferase-Reagenz:	20 mM Tricin
	1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
	2,67 mM MgSO_4
	0,1 mM EDTA
	33,3 mM DTT
	270 μM Coenzym A
	470 μM Luziferin
	530 μM ATP

3.5.4 Herstellung stabiler Zelllinien mittels episomaler Vektoren

Jurkat-Zellen wurden zunächst mit den EBV-Plasmid-Vektoren transfiziert. 24 h nach der Elektroporation wurde damit begonnen das Selektionsmedium Hygromycin B dem Medium zuzugeben. Die Konzentration lag während der gesamten Selektionsphase bei 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Jeden zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um eine konstante Konzentration des Selektions-Antibiotikums zu gewährleisten. Dabei wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1000 rpm, RT), mit PBS gewaschen und in frischem RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und frischem Selektionsmedium aufgenommen. Eine Kontrollzelllinie ohne EBV-Plasmid wurde in der Elektroporation und unter Hygromycin-Selektion parallel prozessiert. Zu dem Zeitpunkt (ca. 10. Tag nach der Transfektion) an dem die Kontrollzelllinie im Gegensatz zu den anderen transfizierten Zelllinien abgestorben ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Selektion abgeschlossen ist. Die Volumina der stabil zu machenden Zelllinien wurden während der Selektionsphase der Anzahl lebender Zellen angepaßt (2 bis 10 ml Medium). Nach erfolgreicher Selektion wurden die neuen, episomal stabilen Zelllinien wie untransfizierte Jurkat-Zellen behandelt. Um zu vermeiden,

dass durch statistische Effekte ein Teil der Zellen die Plasmide verlieren, wurde eine Hygromycin-Konzentration von 100 µg/ml aufrechterhalten.

3.6 DNA - und RNA - Arbeitstechniken

3.6.1 RNA- und Plasmid-DNA-Präparation

Plasmid-DNA wurde entsprechend den Herstellerangaben (Quiagen, Machery-Nagel) im Mini-,Midi- und Maxi-Maßstab präpariert und anschließend zur Überprüfung der Qualität in der Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Außerdem erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit dem Spektrophotometer. Total-RNA wurde ebenfalls gemäß den Herstellerangaben (Quiagen) im Mini-, Midi- und Maxi-Maßstab präpariert und die Konzentration anschließend bestimmt. Während der Präparation wurde die RNA auf der Säule 15 min mit RNase-freier DNaseI (Quiagen) gespalten. Gegebenenfalls wurde im Anschluß an die RNA-Präparation ein weiterer DNaseI-Verdau durchgeführt (Sigma, Invitrogen). Mittels Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurde die RNA auf ihre Qualität untersucht. Dabei wurde anhand der 28s (1,9 kb) und 18s (5 kb) RNA-Banden die Qualität der RNA abgeschätzt. Merkmale für unverdaute RNA sind zum einen scharfe Banden, zum anderen sollte die 5 kb Bande ungefähr doppelt so stark sein wie die 1,9 kb Bande.

Die RNA diente als Matrize für die reverse Transkription und die folgende quantitative PCR. Bei der quantitativen PCR wurden 50-500 bp Amplikons gebildet. Auch wenn die RNA in der Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen einmal nicht den höchsten Qualitätsansprüchen genügte, war dies nicht kritisch für die beschriebenen Analysen. Die Ursache dafür liegt in den geringen Größen der Amplikons. Anschließend wurde die RNA aliquotiert und bei -80°C gelagert. Grundsätzlich wurden RNA-Arbeiten mit besonderer Sorgfalt durchgeführt, um Kontaminationen mit RNase zu vermeiden. Dabei wurde DEPC behandeltes aqua dest. verwendet. Zur RNase-Dekontamination von Oberflächen und Gefäßen wurden verschiedene Ausführungen des RNA-Zap-Systems (Ambion) eingesetzt.

3.6.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von RNA erfolgte auf einem 1,2 %-igem (w/v) Agarose-Formaldehydgel. Dazu wurden 2,4 g Agarose in 200 ml 1 x MOPS aufgekocht. Nach Abkühlung der

Agaroselösung auf eine Temperatur von 60°C, wurden 3,6 ml 37 % (v/v) Formaldehyd zugesetzt und das Gel in einer horizontalen Elektrophorese-Apparatur (12,5 x 19,5 cm) gegossen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x MOPS-Puffer für 2,5 h bei einer Spannung von 120 V. Aufgetragen wurden jeweils 5 µg RNA, die zuvor mit 5 µl RNA-Auftragspuffer (MBI Fermentas) versetzt wurden. Als Marker wurden 5 µg RNA-Standard (Gibco, Life Technologies) aufgetragen. Da der RNA-Auftragspuffer (Fermentas) bereits Ethidiumbromid enthielt, mußte dem Gel dieses nicht zugesetzt werden und die RNA konnte nach erfolgter Elektrophorese auf einem UV-Leuchtschirm sichtbar gemacht werden.

Puffer und Lösungen:

MOPS-Puffer	20 mM	3-Morpholino-propan-sulfonsäure
	5 mM	Natriumacetat
	1 mM	Na ₂ -EDTA
RNA-Auftragspuffer	95 % (w/v)	Formamid
	0,025 % (w/v)	SDS
	0,025 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,025 % (w/v)	Xylencyanol
	0,025 % (w/v)	Ethidiumbromid
	0,5 mM	Na ₂ -EDTA
Laufpuffer	3,0 g	Tris
	14,4 g	Glycin
	ad 1000 ml	aqua bidest.

3.6.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde zunächst mittels zufallsgenerierter hexamerer Primer mit dem Enzym ThermoScript (AMV; Invitrogen) durchgeführt. In den Analysen zu Transkripten des oberen und unteren Stranges wurde aufgrund der besseren Eignung das Enzym AccuScript (MMLV; Stratagene) verwendet.

Die reverse Transkription wurde nach Anleitung und mit den Materialien des “ThermoScript RT-PCR Systems” von der Firma Invitrogen durchgeführt. Als Matrize wurde 5 µg der zu untersuchenden RNA pro Reaktion eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 12 µl wurde die RNA gemeinsam mit 50 ng eines Hexanukleotid-Primers und einer dNTP-Lösung, die alle vier Desoxynukleotide gleichermaßen enthält (finale Konzentration: 1 mM), für 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 5 min direkt auf Eis überführt. Es erfolgte die Zugabe von 5 µl eines von Invitrogen bereitgestellten 5x Puffers, 1 µl einer 0,1 M DTT Lösung, 1 µl RNAsin (Invitrogen), 1 µl H₂O und 1 µl der Theroscript reversen Transkriptase. Als negative Kontrolle wurde in einem parallelen Ansatz wie beschrieben verfahren, allerdings wurde statt des Enzyms reverse Transkriptase 1 µl H₂O zugegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen erfolgte die Inkubation 10 min bei 25°C und 30 min bei 50°C. Anschließend wurde die reverse Transkriptase bei 85°C (5 min) denaturiert. Die Inkubationschritte wurden mittels eines PCR-Thermocyclers (Biometra) durchgeführt. Von der gebildeten cDNA wurden jeweils 2 µl als Matrize in den PCR-Analysen eingesetzt. Die reverse Transkription mit Hilfe der AccuScript reversen Transkriptase von der Firma Stratagene wurde ebenfalls gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die genspezifischen Primer wurden jeweils mit 2,5 µl eines 4 pmol/µl Ansatzes verwendet. Standardmäßig wurden 5 µg RNA sowie 0,5 µl RNase-Block pro Reaktion eingesetzt.

3.6.4 Quantitative PCR

Bei der quantitativen PCR werden die entstehenden Produkte über ein Fluoreszenzsignal zu jedem Zeitpunkt der Reaktion quantifiziert. Diese Reaktion wurde mit dem Kit “SYBR Green PCR Core Reagents” durchgeführt. Die Fluoreszenz von SYBR Green nimmt bei der Wechselwirkung mit doppelsträngiger DNA zu. Das resultierende Signal ist zu der Menge der entstehenden DNA-Fragmente korreliert und kann aufgezeichnet werden. Die Reaktion wurde in Volumina von jeweils 25 µl durchgeführt (halber Reaktionsansatz).

Der Master-Reaktionsansatz wurde auf Eis vorbereitet. Er bestand aus 1 x SYBR Green Puffer, 3 mM MgCl₂, je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und 0,4 mM dUTP (entspricht 1 mM der dNTP-Mischung), sowie 2,0 µl eines 4 pmol/µl Ansatzes der jeweiligen Primer, 0,025 U AmpliTaq Gold (Taq-Polymerase), H₂O (bidest.) und 0,01 U AmpErase (Uracil-N-Glykosylase). Man benutzt dUTP anstelle von dTTP in der dNTP-Mischung, damit die

Uracil-N-Glykosylase uridinhaltige PCR-Produkte abbauen kann, welche eventuell in früheren PCR-Reaktionen entstanden sind und deshalb das Gemisch verunreinigen könnten. Das Enzym ist während des Aufwärmens des Thermocyclers aktiv und wurde im ersten Denaturierungsschritt deaktiviert. Außerdem ist es bei Temperaturen über 55°C inaktiv. Die Mischung wurde dann in spezielle 96-well-Platten aliquotiert. Zuletzt wurde die zu untersuchende Probe hinzu gegeben (Matrize), wobei jede Probe in zwei oder drei Ansätzen analysiert wurde. Der Start der Reaktion erfolgte automatisch im PCR-Gerät, da die DNA-Polymerase erst durch den ersten Denaturierungsschritt bei 95°C aktiviert wurde. Im folgenden ist ein Programm dargestellt, wie es für quantitative PCR-Reaktionen benutzt wurde:

1. Schritt: 95°C - 10 min

 Zyklenzahl: 40

2. Schritt: 95°C - 15 sec

3. Schritt: 58°C - 1 min (je nach Primer auch 60°C, 61°C oder 63°C)

Dissoziationskurven: bei 60°C

Die Primer für die quantitative PCR wurden zunächst getestet, ob sie in der Lage sind ein spezifisches PCR-Produkt bei einer bestimmten Temperatur zu amplifizieren. Zunächst wurden die Primer mit Hilfe des Internet-gestützten Programmes Primer3 ausgewählt. Sie wurden optimiert auf eine Länge von mindestens 21 bp und einer Hybridisierungstemperatur von 58°C. Um die Spezifität der Primer zu kontrollieren, wurden diese mit Hilfe des Internet-gestützten Programmes Ensembl gegen das menschliche Genom geblastet. Die Primerpaare wurden dann in einer RCR getestet. Dabei wurde in der quantitativen PCR der Verlauf der Reaktion untersucht. Der Reaktionsverlauf ist durch charakteristische sigmoidale Amplifikationskurven gekennzeichnet. Außerdem gaben die Dissoziationskurven der PCR-Produkte einen Hinweis auf eventuelle Nebenprodukte, die durch Maxima im Bereich geringer Schmelztemperaturen angezeigt werden. Zur Kontrolle wurden die Produkte der quantitativen PCR im Anschluß im Agarose-Gel untersucht. Dabei wurde die Größe des Produktes sowie die ungefähre Produktstärke abgeschätzt. Außerdem wurden Nebenprodukte sichtbar gemacht.

3.6.5 Amplifikation von DNA mittels PCR

Um cDNA oder genomische DNA mit Hilfe der PCR zu vervielfältigen, wurde die Taq-DNA-Polymerase verwendet. War eine größere Genauigkeit der DNA-Synthese für präparative Arbeiten notwendig, so wurden die Pfu- oder Vent-Polymerase im Gemisch mit der Taq-Polymerase eingesetzt. Denn die Pfu- und die Vent-Polymerase besitzen eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität zur Überprüfung synthetisierter Produkte. Jedoch ist die Polymerisationsgeschwindigkeit der Taq-Polymerase (ca. 1000 Nukleotide/min) doppelt so hoch wie die der Pfu/Vent-Polymerasen (ca. 500 Nukleotide/min). Im Gegensatz zur Taq-Polymerase, die überhängende Adenosin-Reste an amplifizierte DNA anhängt, generieren die Pfu- und die Vent-Polymerase glatte Enden.

Ein PCR-Reaktionsansatz enthält jeweils 20 pmol Primer, 5-200 ng DNA oder cDNA, 250 µM jeden dNTPs, 5 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10 x PCR-Puffers und die vom Hersteller empfohlene Menge an thermostabiler DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Der Ansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Enzyms bei 94°C im Thermocycler gestartet, um unspezifische Paarungen der Primer in der ersten Amplifizierungsrunde zu vermeiden. Für die Bestimmung der Hybridisierungstemperatur wurde folgende Formel oder das Programm OLIGO 4.0S (Molecular Biology Insights Inc., <http://oligo.net/>) verwendet:

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

TH = Hybridisierungstemperatur

(GC) = Anzahl der GC-Basenpaare

(AT) = Anzahl der AT-Basenpaare

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

[Na⁺] = Konzentration an Na⁺-Ionen bzw. an anderen einwertigen Ionen

(%GC) = prozentualer Anteil an GC-Basenpaaren

Die Primer wurden so ausgewählt, dass der GC-Gehalt möglichst bei 50 % lag, die Primer nicht miteinander hybridisieren konnten und keine intramolekularen Haarnadelschleifen zu erwarten waren. Zur Vorhersage von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen wurde das Programm OLIGO 4.0S (Molecular Biology Insights Inc., <http://oligo.net/>) benutzt. Optimale Hybridisierungstemperaturen liegen zwischen 50 und 60°C (58°C). Manchmal wurde zusätzlich die Hybridisierungstemperatur durch eine PCR mit Temperaturgradienten

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

Zyklennummer	1	2 - 32	33
Denaturierung	94°C 2-5 min	94°C 30s	
Hybridisierung		58°C 30s	
Elongation		72°C 30s	72°C 10 min

3.6.6 Kolonie-PCR

Zur Bestimmung positiver Klone eines Ligationsansatzes wurde alternativ zur Mini-Präparation mit anschließender Restriktionsspaltung Kolonie-PCR durchgeführt. Hierbei wurden Bakterien von der Kulturplatte direkt in eine PCR-Reaktion gegeben. Der erste Denaturierungsschritt wurde auf 5 min verlängert, sodass die Bakterien zerkocht und die Plasmid-DNA freigesetzt wurde. In der PCR wurden geeignete Primerpaare eingesetzt, um das klonierte Fragment auf seine Größe und Orientierung im Plasmid-Vektor zu bestimmen. Dabei wurde mindestens ein Primer auf die Grenze des klonierten Fragmentes zum Plasmid-Vektor gelegt. Reaktions-Ansätze von 20 µl haben sich bei 30 Zyklen bewährt.

3.6.7 Restriktionsspaltung

Restriktionsanalysen von Miniprep-DNA (ca. 500 ng) wurden meist in einem Volumen von 10 bis 25 µl nach Angaben der Hersteller der jeweiligen Restriktionsenzyme durchgeführt (NEB, MBI Fermentas). Für präparative Ansätze, um z.B. 10-20 µg DNA zu spalten, wurde der Ansatz entsprechend vergrößert und darauf geachtet, dass die DNA-Konzentration 100 ng/µl nicht überstieg.

3.6.8 Phenolchloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Die Extraktion mit Phenol-Chloroform-Lösung stellt eine Möglichkeit dar, Proteine und andere Verunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen. Ein folgender Fällungsschritt dient dabei der Entfernung des Extraktionsmittels. Die Fällung wurde auch zur Reinigung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren eingesetzt. Dabei wurde die

Nukleinsäurelösung zunächst mit einem Volumenanteil Phenol-Chloroform-Lösung versetzt und das Gemisch anschließend 30 sec bis 2 min geschüttelt bzw. gevortext. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 5000-8000 rpm zentrifugiert. Das Chloroform bildet die untere Phase, während sich die wässrige Phase mit den Nukleinsäuren oberhalb befindet. An der Phasengrenze sammeln sich präzipitierte Proteine. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne dabei Teile des Präzipitats aufzunehmen. Diese Prozedur wurde zwei- bzw. dreimal wiederholt. Zur Fällung der DNA aus der wässrigen Lösung, wurde 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat/Essigsäure (pH 5,2 RT) und 2,5 Volumen Ethanol (-20°C) oder 0,7 Volumen Isopropanol (-20°C) hinzugefügt. In Abhängigkeit von der gewünschten Ausbeute wurde 30 bis 240 min bei RT oder -20°C gefällt. Die Nukleinsäuren wurden anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm sedimentiert. Um Salze zu entfernen wurde außerdem einmal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Danach wurde für 5 min zentrifugiert, das Nukleinsäure-Pellet getrocknet und in 20 bis 100 µl dest. oder TE aufgenommen.

3.6.9 Ligation von DNA

Die Ligation des mit Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragments in das zuvor linearisierte und dephosphorylierte Plasmid erfolgt mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4 Ligase; 5 U/µl). Dabei wurden 200 bis 300 ng Plasmid, 0,5 bis 1 µg des entsprechenden DNA-Fragmentes, 5 U T4 Ligase und Ligationspuffer des Herstellers in einem Endvolumen von 10 bis 15 µl über Nacht bei 16°C inkubiert. Das molare Verhältnis zwischen Plasmid und Fragment wurde je nach Bedarf zwischen 1:1 und 1:5 eingestellt. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde anschließend für die Transformation kompetenter *E.coli* verwendet. Die zweite Hälfte wurde bei 4°C weiter ligiert und ggf. später in der Transformation eingesetzt.

3.6.10 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gele wurden in Konzentrationen von 0,5 bis 2 % (w/v) hergestellt, entsprechend der zu trennenden DNA-Fragmente. Dazu wurde 1 x TBE-Puffer zusammen mit der abgewogenen Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Der Lösung wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und anschließend wurde das Gel gegossen. Als Laufpuffer diente 1 x TBE.

Nach dem die Proben (ca. 10 bis 200 μ l Volumen, entsprechend der Größe der Taschen im Gel) mit 1/5 konzentriertem Laufpuffer (MBI) versetzt wurden und in die Probenauftragstaschen eingefüllt worden waren, wurde die Elektrophorese mit 10 V/cm Gel-Länge durchgeführt. Als Standard dienten 1 kb oder 100 bp Längenstandards (MBI). Die Gele wurden aufgrund des im Gel bereits enthaltenen Ethidiumbromids direkt unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

1x TBE-Puffer: 90 mM Tris
 90 mM Borsäure
 2 mM EDTA

5x Laufpuffer: 50 % (v/v) Glycerin
 10 mM EDTA
 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
 0,05% (w/v) Xylencyanol

3.6.11 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des "GFX PCR-DNA and Gel Band Purification Kits" (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) nach der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt und in ca. 20-50 μ l TE aufgenommen.

3.6.12 DNaseI-Behandlung von RNA

Zuerst wurde die RNA mit dem entsprechenden Kit von Quiagen präpariert. Dabei wurde bereits während der RNA-Präparation auf der Säule, DNA mit Hilfe der DNaseI (Quiagen) gespalten. Anschließend wurde meist revers transkribiert und das gebildete Produkt in PCR-Analysen untersucht. Aufgrund der Sensitivität der PCR auf Verunreinigungen mit genomischer bzw. Plasmid DNA, wurde gegebenenfalls noch eine zweite DNaseI-Behandlung im Anschluß an die RNA-Präparation durchgeführt. Dazu wurde der Kit AMPD1 der Firma Sigma-Aldrich und die DNaseI von Invitrogen entsprechend den

Herstellerangaben verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Qualität der RNA-Präparationen und der unterschiedlichen Zugänglichkeit der DNA für DNA-abbauende Enzyme, wurde die Spaltung der DNA in der quantitativen PCR durch entsprechende negative Kontrollen bestätigt.

3.7 Chromatin-Immunopräzipitation

Zur *in vivo* Detektion von Proteinen die an spezifische Stellen der DNA binden, benutzt man die Technik der Chromatin-Immunopräzipitation. Sie läßt sich in drei aufeinander folgende Arbeitsschritte unterteilen. Im ersten Schritt wird das zu untersuchende Zellmaterial herangezogen (Jurkat-T-Zellen) und die zellulären Proteine und die DNA durch Behandlung mit Formaldehyd vernetzt. Im zweiten Schritt findet dann die Immunopräzipitation statt. Dabei werden spezifische Antikörper verwendet, um vernetzte DNA-Proteinkomplexe zu präzipitieren. Der letzte Schritt ist schließlich die Detektion immunopräzipitierter, vernetzter DNA durch PCR. Aufgrund der Komplexität dieser Methode existieren in der Literatur zahlreiche Protokolle, die unter bestimmten Voraussetzungen erfolgreich die Bindung von Proteinen an spezifische DNA-Regionen nachweisen können. Im folgenden ist das Protokoll wiedergegeben, welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Grundlage dieses Protokolls ist die in Odom et al. beschriebene Methode (Odom, Zizlsperger et al., 2004) (<http://web.wi.mit.edu/young/pancregulators/>).

1. Expansion der Jurkat-T-Zellen

1.1 Gegebenenfalls Induktion der Zellen mit PMA (für 4h oder 24h).

2. Vernetzung der Zellen

2.1 Es wurden 1×10^8 bis 1×10^9 Zellen verwendet.

2.2 Die Zellen wurden einen Tag vor der Vernetzung gesplittet.

2.3 Die Zelldichte zum Zeitpunkt der Vernetzung betrug 5×10^5 Zellen/ml bei Jurkat-Zellen.

2.4 Die Zellen wurden vereinigt, wobei ein kleines Aliquot (ca. 100 μ l) in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit P200 resuspendiert wurde, damit die Zellen gezählt und die Zelldichte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden konnte.

- 2.5 Die Zellen wurden in 250 ml Gefäßen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT).
- 2.6 Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in ca. 40 ml vorgewärmten Medium (mit 10 % Serum) resuspendiert und in einem 50 ml Falcon-Gefäß vereinigt.
- 2.7 Zentrifugation: 1200 rpm, 5 min, RT.
- 2.8 Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 43,78 ml Medium (ohne Serum) bei RT aufgenommen - dazu wurde 1,22 ml 37 %-iges Formaldehyd gegeben (Endkonzentration: 1 %).
- 2.9 Inkubation auf einem Rollen-Tisch unter ständiger Bewegung für genau 9 min bei RT.
- 2.11 Zugabe von 2 M Glycin = 2 ml (steril filtriert), (Enkonzentration: 125 mM).
- 2.12 Sofortiges, vorsichtiges Schütteln.
- 2.13 Inkubation auf Eis für 10 min, die Lösung verfärbte sich gelb.
- 2.14 Alle Arbeiten wurden von hier an auf Eis durchgeführt
- 2.15 Zentrifugation: 1200 rpm, 5 min, 4°C.
- 2.16 Verwerfen des Überstandes sowie dreifaches Waschen des Pellets mit jeweils 50 ml kaltem 1 x PBS.
- 2.17 Letzter Waschschrift: das Pellet wurde in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt, zentrifugiert und der PBS-Überstand wurde idealerweise komplett abgenommen und verworfen.
- 2.18 Das Pellet wurde auf Trockeneis eingefroren und wurde anschließend bei -80°C gelagert; alternativ wurde direkt weiter gearbeitet.

3. Zell-Lyse und Ultraschallbehandlung

- zunächst wurde der “Complete-Proteinase-Inhibitor-Mix” von Roche (Bestell-Nr. 11697498001) allen Lysis-Puffern hinzugegeben:
- 25x “Complete”:
 - eine Tablette wurde zwischen zwei Abwiege-Papier-Stücke zerdrückt
 - das Pulver wurde in 2 ml dest. gelöst
 - die Aliquots wurden bei -20°C gelagert

Lysis-Puffer 1 (LP1)

5,0 ml 1 M Hepes-KOH, pH 7,5

2,8 ml 5 M NaCl

0,2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

10,0 ml 100 % Glycerin

5,0 ml 10 % NP-40

2,5 ml 10 % Triton X-100

74,5 ml H₂O

100,0 ml (Lagerung bei 4°C)

Endkonzentration

50 mM

(st. Filtration; Lagerung bei 4°C)

140 mM

1 mM

10 %

0,5 %

0,25 %

Lysis Puffer 2 (LP2)

4,0 ml 5M NaCl

0,2 ml 0,5 M EDTA

0,1 ml 0,5 M EGTA

1,0 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0)

94,7 ml H₂O

100,0 ml (Lagerung bei 4°C)

Endkonzentration

200 mM

1 mM

0,5 mM

10 mM

2x Lysis Puffer 3 (LP3)

2,8 ml 5 M NaCl

0,4 ml 0,5 M EDTA

0,2 ml 0,5 M EGTA

2,0 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0)

10,0 ml 10 % N-Lauroyl-Sarcosine

84,6 ml H₂O

100,0 ml (Lagerung bei 4°C)

Endkonzentration

(2x)

(1x)

280 mM

140 mM

2 mM

1 mM

1 mM

0,5 mM

20 mM

10 mM

1 %

0,5 %

- vor der Verwendung, wurde 1x LB3 versetzt mit:

Vor der Ultraschallbehandlung:

10 % Na-Deoxycholate (frisch angesetzt)	0,1 %
25x "Complete"	1x

Nach der Ultraschallbehandlung:

10 % Triton X-100 (bei Schritt 2.5)	0,5 %
100 % Glycerin (bei Schritt 2.6)	10 %

3.1 Bei der Verwendung gefrorener Zellen wurde auf Eis aufgetaut; bei der Verwendung frischer Pellets erfolgte die direkte Zugabe von 10 ml Lysis Puffer 1 zu dem Pellet. Für eine effektive Kern-Präparation in Schritt 3.2 wurde das Pellet-Volumen markiert.

3.2 Es wurde für 10 min bei 4°C geschüttelt. Danach wurde in einer Heraeus Multifuge für 10 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet war dann kleiner und heller. (Kontrolle der Markierung am Röhrchen). Wenn das nicht der Fall war, wurde der Schritt 3.1 wiederholt und das Pellet eventuell unter dem Mikroskop kontrolliert.

3.3 Jedes Pellet wurde in den Röhrchen mit 10 ml Lysis-Puffer 2 resuspendiert. Anschließend wurde für 10 min bei RT vorsichtig geschüttelt und bei 4000 rpm, 10 min, bei 4°C abzentrifugiert.

3.4 Das jeweilige Pellet in den Röhrchen wurde in 10 ml LP 2 resuspendiert (ohne Triton X-100 und Glycerin). Die Suspension wurde sonifiziert in einem 15 ml Falcon-Gefäß mit einem Branson-Ultraschallgerät und einer Micro-Spitze in einem Eis/Ethanol-Bad.

Einstellungen des Ultraschallgerätes:

<u>Langsamer Modus</u>	(13 Zyklen, das heißt 6 min 30 sec insgesamt,
40 % Intensität	die Suspension sollte sich nach jedem Puls für
Zeit 30 sec	mindestens eine Minute abkühlen)
Puls an 0,9 sec	
Puls aus 0,1 sec	

Schneller Modus (1 Zyklus, das heißt 6 min insgesamt - abkühlen lassen!)

40 % Intensität	
Zeit 6 min	

Puls an 15 sec

Puls aus 45 sec

Beide Modi führen zu einer durchschnittlichen Fragmentgröße des Chromatins von 300 bis 500 bp. Tendenziell kleinere Fragmente erhält man im langsamen Modus. Wenn kleinere Fragmente als 300 bp erhalten werden sollten, wurde im langsamen Modus die Ultraschall-Behandlung in 30 Sekunden Schritten verlängert (bis zu maximal 7,5 min insgesamt). Die Proben enthielten auch größere Fragmente, welche nur durch Ultrazentrifugation mit einem Cäsiumchlorid-Gradienten effektiv entfernt werden konnten.

Hinweis: Wenn die Probe zu schäumen anfängt, sollte das Programm sofort unterbrochen und auf Eis inkubiert werden, bis die Blasen verschwunden sind. Anschließend kann fortgefahren werden.

3.5 Nach der Ultraschall-Behandlung wurde 1/20 von 10 %-igem Triton X-100 hinzugegeben (Endkonzentration 0,5 %). Die Probe wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die Zelltrümmer wurden in einer gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert (4°C, 15 min, 13.000 rpm).

3.6 Der Überstand in dem sich das lösliche Chromatin befindet, wurde in ein neues 15 ml Falcon-Gefäß überführt und die dsDNA-Konzentration einer 1:100 Verdünnung bestimmt. Die Chromatinlösung wurde auf eine Konzentration von 1 bis 2 mg/ml mit LP3 eingestellt und Glycerin zu einer finalen Konzentration von 10 % hinzugegeben. 1 ml Aliquots wurden in Eppendorf-Gefäße überführt und 10 µl Aliquots wurden zur Kontrolle separiert. Diese Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und wurden anschließend bei -80°C gelagert.

3.7 Die 10 µl Aliquots wurden auf die Größe des Chromatins untersucht, dazu wurden 30 µl (3 Volumen) des ChIP-Elutions-Puffers zu der Probe gegeben. Anschließend wurde Proteinase K (PCR grade, Roche) hinzugegeben und für mindestens 2 h bei 65°C inkubiert, um die Vernetzung zwischen Proteinen und DNA zu lösen. 1 bis 2 µg der gereinigten DNA wurde anschließend auf ein Agarose-Gel geladen und auf die Größenverteilung der DNA-Fragmente untersucht.

3.8 Falls notwendig wurde eine zweite Runde Ultraschall-Behandlung durchgeführt. Die jeweiligen Einstellungen mußten jedoch empirisch ermittelt werden. Problematisch war manchmal das nun enthaltene Triton X-100, aufgrund der Schaumentwicklung.

4. Immunopräzipitation

4.1 Protein A/G-Sepharose (FF, GE Healthcare) wurde im Verhältnis 1:2 gemischt, entsprechend der unterschiedlichen Bindungskapazitäten.

4.2 Die *Beads* wurden 2 bis 3 mal mit eiskaltem 1 x PBS in beschichteten Eppendorf-Gefäßen gewaschen (Zentrifugation: maximal 3000 rpm, 4°C, 1 min)

4.3 Die *Beads* wurden geblockt durch Inkubation mit 1 x PBS, 0,5% BSA bei 4°C durch Schütteln für 30 min.

4.4 Genügend Aliquots vernetzter Chromatinproben wurden aufgetaut. Pro ChIP wurden 100 µl einer 2 mg/ml oder 200 µl einer 1 mg/ml konzentrierten, vernetzten Chromatinextrakte verwendet. Somit war ein Aliquot von 1 ml ausreichend für 5 ChIPs (1 mg/ml).

4.5 Das Chromatin wurde vorbehandelt durch Inkubierung mit geblockten *Beads* (10 µl geeignete *Beads* pro 100 ml Chromatinextrakt). Somit wurden 100 µl geblockte *Beads* pro 1 ml Aliquot Chromatinextrakt verwendet. 200 µl der zu 50 % geblockten, aufgeschwämmten *Beads* (in 1x LP3) wurden pro 1 ml Aliquot hinzugegeben. Unter konstanter Bewegung wurden diese Aliquots bei 4°C für 30 bis 60 min inkubiert (beschichtete Eppendorf-Gefäße).

4.6 Parallel wurden die vorgeblockten *Beads* mit den entsprechenden Antikörpern gemischt. Pro ChIP wurden typischerweise 2-10 µg Antikörper und 15-20 µl *Beads* verwendet. In beschichteten Eppendorf-Gefäßen wurde der vorgeblockte Mix angesetzt:

40 µl 50 % geblockte *Beads* in PBS aufgeschwämmt (=20 µl geblockter *Beads*)
_x µl Antikörper (= 1 µg)
ad 400 µl kaltem PBS.

4.7 Diese Antikörper-*Beads*-Mischung wurde 1 min bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde resuspendiert in einem Volumen 1 x LP3 (0,5% Triton X-100, 1x "Complete", ohne Glycerin).

4.8 In beschichteten Eppendorf-Gefäßen wurden dann die ChIPs zusammenpipettiert:

40 µl Antikörper-beschichtete *Beads* (50 % aufgeschwämmt in 1x LP3)
100 µl (oder 200 µl) des vorbehandelten Chromatinextraktes (von 4.5).

4.9 Die ChIP-Proben wurden für mindestens 2 h (normalerweise über Nacht) unter konstanter Bewegung bei 4°C inkubiert.

5. Waschen, Elution und Revertierung der Vernetzung

5.1 Zentrifugation der *Beads* bei 3000 rpm für 30 sec bei 4°C.

5.2 Die *Beads* wurden 6x gewaschen mit 1 ml RIPA-Puffer.

Waschpuffer (2x RIPA-Puffer):		Endkonzentration
10 ml	1 M Hepes (pH 7,6)	50 mM
400 µl	0,5 M EDTA	1 mM
20 ml	10 % NP-40 (IPGEL)	1 %
20 ml	5 M LiCl	0,5 M

100 ml		

Hinzugabe zu frisch präpariertem 1x RIPA-Puffer:

10 % Na-Deoxycholate (frisch präpariert)	0,1 %
25x "Complete"	1x

5.3 Waschen der *Beads* mit 1 ml TE-Puffer und 50 mM NaCl.

5.4 Hinzugabe von 100 µl vorgewärmten (65°C) Elutions-Puffer und folgendem Schütteln für 10 min bei 1400 rpm und 65°C im Thermomixer.

<u>Elutions-Puffer:</u>	50 mM Tris (pH = 8,0)
	10 mM EDTA
	1 % SDS

5.5 Zentrifugation der *Beads* bei 13.000 rpm für 1 min bei RT und Transfer des gesamten 100 µl Ansatzes in ein unbeschichtetes Eppendorf-Gefäß

5.6 Die Inputs wurden auf 100 µl mit bidest. aufgefüllt und mit 3x Volumen Elutions-Puffer versetzt.

5.7 Revertierung der Vernetzung über Nacht bei 65°C

6. RNase A, Proteinase K

6.1 Hinzugabe von 1x Volumen TE-Puffer und RNase A (1 mg/ml) zu einer Endkonzentration von ca. 0,05 µg/µl: 5 µl pro CHIP und 10 µl pro Input. Inkubation für 1 bis 2 h bei 37°C.

6.2 Hinzugabe der Proteinase K zu einer Endkonzentration von 0,2 µg/µl (ca. 2,5 µl/250 µl Ansatz): 4 µl pro CHIP und 8 µl pro Input. Inkubation für 2 h bei 56°C.

6.3 Lagerung bei -20°C - alternativ wurde direkt mit Schritt 7 weitergebebeitet.

7. DNA-Aufreinigung

7.1 Hinzugabe von 1x Volumen PCI-Mix (25:24:1 - Roth) und Vortex 20-30 sec.

7.2 Zentrifugation der Proben bei 13.000 rpm, RT, 5 min und Transfer der oberen Phase in frische Eppendorf-Gefäße.

7.3 Vorbereitung des Master-Mixes für die EtOH-Präzipitation:

1/25x Volumen	5 M NaCl
1,5 µl	Glykogen
2x Volumen	100 % EtOH, eiskalt

nach Zugabe des Mixes zu den Proben werden diese bei -80°C (≥ 30 min) oder bei -20°C (≥ 2 h) gelagert.

7.4 Zentrifugation der Proben (13.000 rpm, RT, 5 min) und Verwerfung des Überstandes. Waschen des Pellets mit 500 µl eiskaltem 70 %-igem EtOH und nochmalige Zentrifugation.

7.5 Trocknen des Pellets und Resuspendierung in 50 µl 10 mM Tris/HCL. Schütteln der Proben für 15 min bei RT im Thermomixer.

7.6 Bestimmung der dsDNA-Konzentration der Proben und Laden von 0,5 bis 2 µg gereinigter DNA auf einem 1 %-igem Agarose-Gel und folgende Kontrolle auf die Fragmentgrößen-Verteilung des Materials.

8. ChIP-Analyse

8.1 Ungefähr 20 ng Matrize wurden pro PCR-Reaktion verwendet.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden wie die Genexpression des T-Zell-Rezeptor- β -Lokus reguliert wird. Der gesamte TCR β -Lokus besteht aus insgesamt 65 verschiedenen variablen Gensegmenten. Im Zentrum der Genregulation in Jurkat-T-Zellen steht der Enhancer E β und sein Zielpromotor V β 12-3. Nicht rekombinierte Gensegmente führen im Gegensatz zu V β 12-3 nicht zu Genprodukten in Jurkat. Interagiert E β ausschließlich mit seinem Zielpromotor oder werden auch nicht rekombinierte Gensegmente transkribiert? Begrenzen Insulator-Elemente die Wechselwirkung von E β auf den V β 12-3 Zielpromotor? Dies zu untersuchen ist von Interesse, weil sowohl stromaufwärts des funktionalen V β 12-3 Promotors, als auch stromabwärts von E β , weitere variable Gensegmente liegen. Die Gensegmente bestehen aus jeweils einem Promotor und zwei stromabwärts liegenden Exonen, die den variablen Teil der T-Zell-Rezeptor- β -Kette kodieren. In cDNA-Datenbanken von Jurkat-T-Zellen sind ausschließlich Sequenzen von V β 12-3 Transkripten hinterlegt, neben ungespleißten Transkripten handelt es sich vor allem um gespleißte V β 12-3 Transkripte.

Unterscheidet sich der V β 12-3 Chromatinstatus von dem Chromatin nicht funktionaler Genelemente? Wird der TCR β -Lokus auch durch posttranskriptionale Prozesse reguliert? Welche funktionalen DNA-Elemente und biochemischen Faktoren führen zu der selektiven Bildung des V β 12-3 Genproduktes?

4.1 Vergleichende Transkriptanalysen am TCR β -Lokus

Um diese Fragen beantworten zu können ist es notwendig zunächst zu untersuchen, ob an den nicht rekombinierten variablen Gensegmenten überhaupt Transkription stattfindet. Enhancer-Elemente können verschiedene Aktivatoren binden und somit die Transkription ihres Zielpromotors erhöhen (Huang, Cabaud et al., 2003). Es ist möglich, dass E β selektiv mit dem Promotor des rekombinierten Gensegmentes interagiert und somit zu einer hohen Transkriptionsrate des V β 12-3 Gensegmentes führt. Durch vergleichende Transkriptanalysen verschiedener Gensegmente sollte zunächst untersucht werden, welche Bedeutung

Eß auf die Transkriptionsrate des rekombinierten Gensegmentes hat. Dabei wurden stellvertretend für die nicht rekombinierten Gensegmente des Lokus, die sich im 5'- und 3'-Bereich des funktionalen Gensegmentes V β 12-3 befinden, die variablen Gensegmente V β 11-3 und V β 30 untersucht. Der Aufbau des rearrangierten Genlokus und der flankierenden Bereiche ist in Abbildung 4.1 gezeigt.

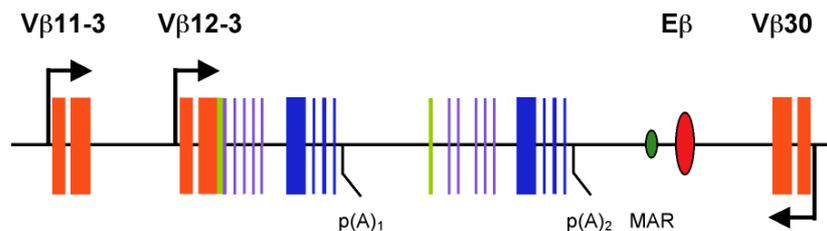


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des rearrangierten TCR β -Lokus in Jurkat-T-Zellen. Das rekombinierte Gensegment V β 12-3 wird stromaufwärts bzw. stromabwärts des funktionalen Lokus durch die Gensegmente V β 11-3 und V β 12-3 flankiert. Jedes Gensegment besteht aus einem Promotor (Pfeile) und den zwei dazugehörigen Exonen des variablen Genbereiches (orange). Der Bereich stromabwärts des V β 12-3 Promotors ist dupliziert (grün, lila, blaue Exon-Bereiche). Der Bereich stromabwärts des V β 12-3 Promotors ist dupliziert (grün, lila, blaue Exon-Bereiche).

Die mRNA-Synthese der Gensegmente wurde durch reverse Transkription und anschließende qualitative und quantitative PCR-Techniken untersucht. In der reversen Transkription wurde die RNA zunächst durch das Enzym reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Entscheidend für die Spezifität der reversen Transkription sind die eingesetzten Primer. Zufallsgenerierte hexamere Primer binden RNA unspezifisch. Genspezifische Primer sind jedoch in der Lage, ausschließlich eine definierte DNA zu amplifizieren. Darüber hinaus bieten genspezifische Primer den Vorteil, dass Transkripte des oberen und unteren DNA-Stranges unterschieden werden können. Deswegen wurden in den Analysen zu den Transkripten der Gensegmente V β 11-3, V β 12-3 und V β 30 zumeist genspezifische Primer eingesetzt. Zunächst galt es die Primerpaare mehreren Qualitätskontrollen zu unterziehen:

1. Die durch Computer-gestützte Analysen abgeleiteten Primer wurden experimentell auf ihre Spezifität untersucht. Dazu wurden die Primer eines Primerpaares einzeln in der reversen Transkription auf verschiedenen Matrizen eingesetzt (naïve T-Zell-RNA, Jurkat-RNA).
2. Anschließend wurden beide Primer eines Paares in einer folgenden PCR verwendet.

3. Das Produkt dieser Reaktion wurde im Agarose-Gel auf die richtige Fragmentgröße überprüft. Das Entstehen von Nebenprodukten war ein Ausschlußkriterium.

4. Als Kontrolle dienten in der quantitativen PCR die sigmoidalen Kurven der Amplifikation sowie die Dissoziationskurven der entstandenen Produkte, welche bei Nebenprodukten einen zweiten Scheitelpunkt aufweisen.

Problematisch ist die Kontamination der isolierten RNA mit DNA. Das kann genomische DNA, oder aber die DNA episomaler Plasmid-Vektoren sein. Vorversuche zur Optimierung der RT-PCR ergaben, dass zum vollständigen Ausschluß kontaminierender DNA eine zweifache Behandlung der RNA-Präparationen mit DNase I auf der Säule und nach der Elution notwendig war. Das vollständige Entfernen der DNA wurde anschließend durch verschiedene Kontrollen überprüft. So wurde die reverse Transkription ohne das Enzym reverse Transkriptase bzw. ohne Primer durchgeführt. Anschließend wurden die Produkte der qualitativen PCR auf DNA-Kontaminationen im Agarose-Gel untersucht. Außerdem wurde in den Transkriptanalysen quantitative PCR durchgeführt. Wurden in Kontrollreaktionen der quantitativen PCR keine Primer bzw. keine reverse Transkriptase eingesetzt und dennoch geringste Mengen an Produkt amplifiziert, so wurde dieses Hintergrundsignal von den später ermittelten Werten abgezogen.

4.1.1 Ungespleißte Transkripte sind sowohl an V β 12-3, als auch an V β 11-3 detektierbar

Die Transkriptanalysen wurden für die Gensegmente V β 12-3, V β 11-3 und V β 30 mit jeweils zwei Primerpaaren durchgeführt, welche spezifisch ungespleißte Transkripte amplifizieren können. Die Spezifität der Primer ist dadurch gegeben, dass mindestens ein Primer auf den Intron-Exon-Übergang gelegt wurde (Abb. 4.2).

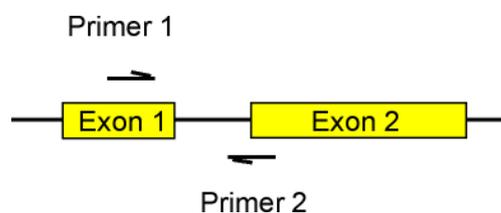


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Position spezifischer Primer zur Amplifikation ungespleißter Transkripte.

Zur Validierung der Primer und zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz wurde PCR zunächst auf klonierten Bereichen (BAC, *bacterial artificial chromosome*) des TCR β -Lokus durchgeführt. Die eingesetzte BAC Matrize repräsentiert den nichtrekombinierten Locus des humanen Genoms (2.6 BAC Klone). Kontrollreaktionen wurden parallel zu der reversen Transkription durchgeführt, dabei wurde das Enzym reverse Transkriptase dem Reaktionsansatz nicht hinzugegeben. In der folgenden Endpunkt-PCR sollte auch bei einer Zyklenzahl von 37 keine Produktbildung auftreten. In der Abbildung 4.3 sind die PCR-Produkte der Primerpaare der TCR β -Gensegmente V β 11-3, V β 12-3 und V β 30 auf Agarose-Gele aufgetragen wurden. Zur besseren Visualisierung der Mengenunterschiede amplifizierter DNA wurden vier verschiedene PCRs mit aufsteigender Zyklenzahl durchgeführt. In der ersten Spur wurde als Standard eine 100 bp DNA-Leiter aufgetragen.

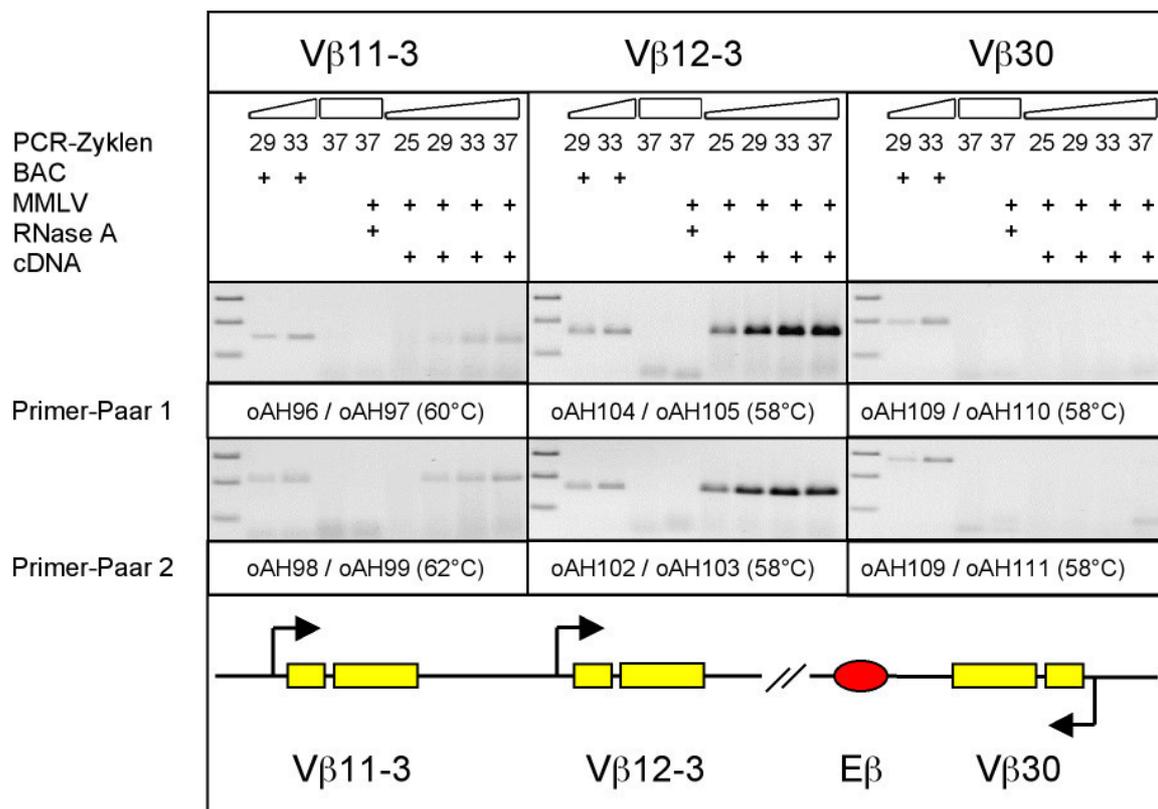


Abbildung 4.3: Nachweis ungespleißter Transkripte an den Gensegmenten V β 11-3 und V β 12-3.

Auf die erste Spur der Agarose-Gele wurde eine 100 bp DNA-Leiter aufgetragen. Die zweite und dritte Spur enthält das Referenz-Produkt einer BAC Matrize. Auf die Spuren vier und fünf wurden die Produkte der negativen Kontrollen aufgetragen. Die verwendeten Primer und deren Hybridisierungstemperaturen sind angegeben.

Am Promotor V β 30 konnten keine Transkripte nachgewiesen werden. Stromabwärts von V β 11-3 wurden nur wenige Transkripte gemessen. Dagegen waren im Bereich des funktionalen Promotors V β 12-3 primäre, ungespleißte Transkripte deutlich nachweisbar. Die quantitative PCR bestätigte die Ergebnisse der semi-quantitativen Endpunkt-PCR. Für V β 11-3 wurden $0,03 \times 10^6$ Transkripte und für V β 12-3 wurden $6,7 \times 10^6$ Transkripte gemessen. An V β 12-3 liegen damit etwa 220 mal mehr ungespleißte Transkripte vor, als am benachbarten Gensegment V β 11-3. Damit wurde gezeigt, dass neben V β 12-3 auch nicht rekombinierte Gensegmente des TCR β -Lokus transkribiert werden

4.1.2 Ausschließlich V β 12-3 Transkripte werden gespleißt

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob und wieviel gespleißte Transkripte an den drei V β -Gensegmenten entstehen. Zusätzlich sollte das jeweilige Verhältnis von gespleißten zu ungespleißten Transkripten bestimmt werden. Dazu wurden Primerpaare verwendet, die auf den Exon-Exon-Übergängen positioniert wurden und somit spezifisch für gespleißte Transkripte sind (Abb. 4.4 a)). Ungespleißte Transkripte, die Intron-Bereiche enthalten, können somit nicht amplifiziert werden. Für V β 30 wurden ebenfalls zwei Primerpaare eingesetzt, welche jedoch innerhalb der Exone des Transkriptes liegen (Abb. 4.4 b)). Dementsprechend wurden sowohl gespleißte, als auch ungespleißte Transkripte amplifiziert. Die Amplikons unterscheiden sich in der Größe um die Anzahl der intronischen Basenpaare.

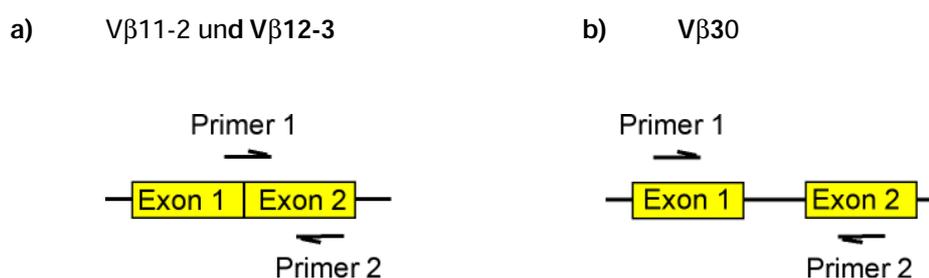


Abbildung 4.4: Primerkombinationen zur Detektion gespleißter Transkripte.

Um sicherzustellen, dass die für die Analysen der gespleißten Transkripte ausgewählten Primerpaare funktionieren, wurden diese zunächst auf zwei verschiedenen Matrizen getestet. Als negative Kontrollen wurden für V β 11-3 und V β 13-3 sowohl BAC DNA, als

auch genomische Jurkat DNA verwendet. Beide Matrizen führten zu keinem Amplikon in der PCR (Abb. 4.5). Für die V β 30 Primerpaare stellen diese Matrizen hingegen positive Kontrollen dar. Im Gegensatz zu Jurkat-T-Zellen enthalten primäre humane T-Zell-Lymphozyten alle möglichen rearrangierten Kombinationen, also auch V β 11-3 und V β 30. Deswegen wurde cDNA aus peripheren, humanen T-Zellen als positive Kontrolle für V β 11-3 und V β 12-3 verwendet. Dazu wurde die RNA naiver T-Zellen mittels zufallsgenerierter hexamerer Primer zunächst revers transkribiert.

Die Abbildung 4.5 belegt die Existenz gespleißter Transkripte an allen drei Promotoren. Die negativen Kontrollen zeigen wie erwartet keine Produkte. Die gebildeten V β 30 Amplikons zeigen, dass die ausgewählten Primer spezifisch für die Transkripte des Gensegmentes sind.

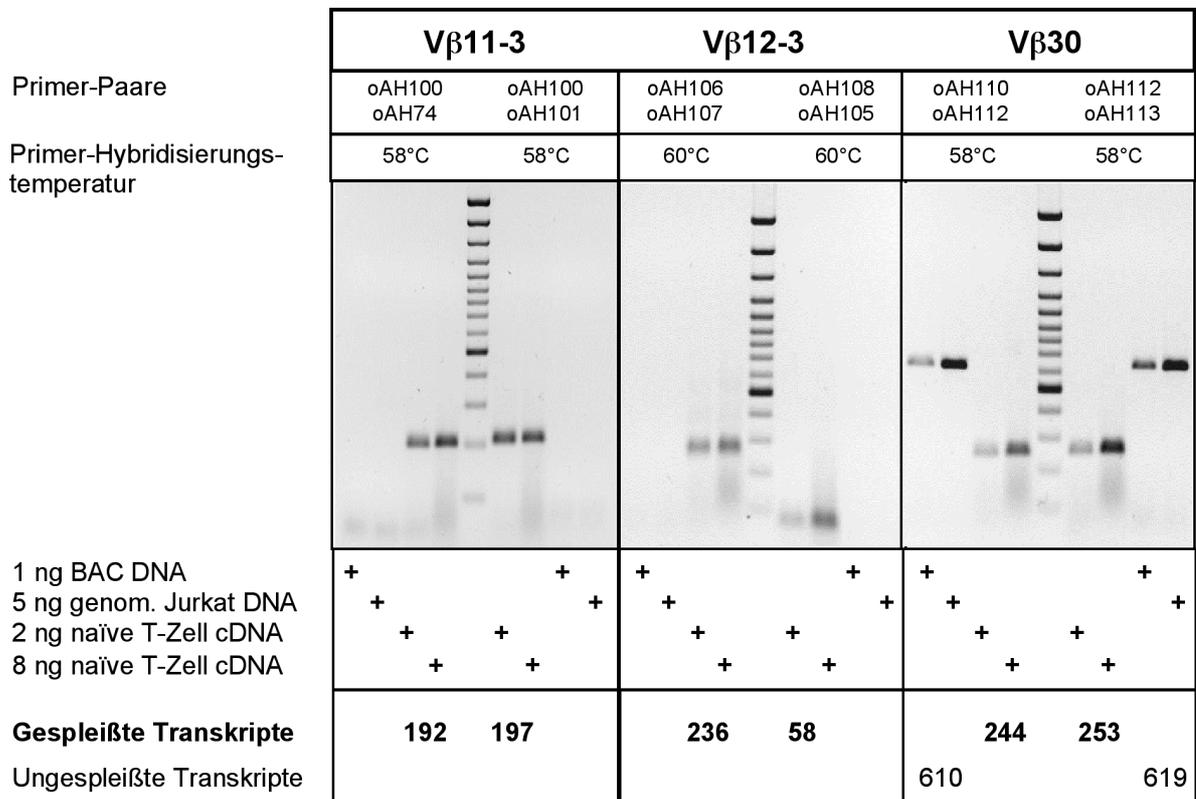


Abbildung 4.5: Nachweis gespleißter Transkripte.

Je zwei Primerpaare wurden für die Gensegmente V β 11-3, V β 12-3 und V β 30 getestet. Zur negativen Kontrolle wurde neben BAC DNA auch genomische Jurkat DNA eingesetzt. Als positive Kontrolle wurde cDNA naiver T-Zellen verwendet. An V β 30 wurden aufgrund der Primer (Abb. 4.4 b)) neben gespleißten Transkripten auch ungespleißte Transkripte amplifiziert. Die Größe der Amplikons ist in bp angegeben. Es wurden jeweils 34 PCR-Zyklen durchgeführt.

In den Analysen zu den gespleißten Transkripten der drei Gensegmente, wurden nur an V β 12-3 gespleißte Transkripte in Jurkat nachgewiesen (Abb. 4.7). Primärtranskripte wurden hingegen sowohl an V β 12-3 als auch an V β 11-3 detektiert. Dabei ergab die quantitative PCR an V β 12-3 ein Verhältnis gespleißter zu ungespleißter mRNA von 15:1 (Abb. 4.7). Durch die Transkriptanalysen wurde gezeigt, dass neben dem rekombinierten V β 12-3 Gensegment auch an nicht rekombinierten Gensegmenten Transkription stattfinden kann. Diese Transkripte sind jedoch um Größenordnungen geringer, als die am funktionalen Gensegment. Außerdem erfolgt die Prozessierung ausschließlich an funktionalen V β 12-3 Transkripten. Um auszuschließen, dass die geringe Transkriptmenge nicht rekombinierter Gensegmente die Folge von RNA-Abbaumechanismen sind, wurden Analysen zu der Stabilität von Transkripten durchgeführt.

	V β 11-3		V β 12-3		V β 30	
Primer-Paare	oAH100 oAH74	oAH100 oAH101	oAH106 oAH107	oAH108 oAH105	oAH110 oAH112	oAH122 oAH 113
Primer-Hybridisierungstemperatur	58°C	58°C	60°C	60°C	58°C	58°C
cDNA (mit gensp. Primern revers transkribiert)						
cDNA (mit hexameren Primern revers transkribiert)						
AMV	+	+	+	+	+	+
RNase A	+	+	+	+	+	+
Detektierte Transkripte (bp)	-	-	235	58	-	-

Abbildung 4.6: Gespleißte Transkripte sind ausschließlich an V β 12-3 detektierbar. Die zuvor getesteten Primerpaare (Abb. 4.5) wurden in der PCR eingesetzt. Der hervorgehobene Primer jedes Paares wurde in der reversen Transkription verwendet. Die negativen Kontrollen sind in den äußeren Spuren der Agarose-Gele aufgetragen. Die Zyklenzahl der PCRs betrug 34. Die Größe der detektierten Transkripte ist in bp angegeben.

V β 12-3

	qualitative PCR	quantitative PCR
PCR-Zyklen	26 30 30 30 18 22 26 30	Transkriptmenge in relativen Einheiten
BAC	+ +	
MMLV	+ + + + +	
RNase A	+ + + + +	
cDNA	+ + + + +	
gespleißte Transkripte		100-200 x 10⁶
Primer-Paare	oAH106 / oAH107 (60°C)	oAH106 / oAH107 (60°C) oAH108 / oAH105 (60°C)
ungespleißte Transkripte		6,7 x 10⁶
Primer-Paare	oAH104 / oAH105 (58°C)	oAH104 / oAH105 (58°C) oAH102 / oAH103 (58°C)

Abbildung 4.7: An V β 12-3 liegt das Gleichgewicht der Transkripte deutlich auf der Seite der gespleißten Transkripte.

Es wurde qualitative und quantitative PCR durchgeführt. Das quantitative Ergebnis wurde mittels zweier Primerpaare bestimmt. Der jeweils hervorgehobene Primer wurde in der reversen Transkription verwendet. Die Anzahl der PCR-Zyklen und die Primer-Hybridisierungstemperaturen sind angegeben.

4.2 Analysen zur Stabilität von Transkripten

Verschiedene Abbauege sind für eukaryotische RNA in der Literatur beschrieben (Fasken und Corbett, 2005). Ein gezielter Abbau von V β 11-3 Primärtranskripten würde erklären, warum keine gespleißten Transkripte dieses Gensegmentes in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden konnten. Einer dieser Abbauege ist der NMD (*nonsense mediated decay*). Dabei ist für den Abbau der RNA durch den NMD die Erkennung von *nonsense-codons* in der ersten Translationsrunde notwendig (Maquat, 2004). Sequenzanalysen zeigen mehrere potentielle Stop-Kodons stromabwärts des ersten Introns im V β 11-3 Gensegment. Ein weiterer Mechanismus zum gezielten Abbau von mRNA in Eukaryoten ist der *non-stop decay*. Dabei werden nicht korrekt polyadenylierte Transkripte kodierender Chromatinbereiche nach der Erkennung durch translatierende Ribosomen abgebaut (Vasudevan, Peltz et al., 2002).

4.2.1 V β 11-3 Transkripte werden nicht durch NMD bzw. *non-stop decay* abgebaut

Um zu untersuchen, ob V β 11-3 Transkripte durch NMD und/oder *non-stop decay* destabilisiert werden, wurden Jurkat-Zellen mit Emetin behandelt (100 μ g/ml, 8 h) (Rosok und Sioud, 2004). Emetin ist ein Translations-Inhibitor, der mit der Blockierung der Translation auch die Erkennung von Translationsterminationskodons verhindert. Die Erkennung dieser Kodons ist jedoch eine Voraussetzung für den Abbau von Transkripten durch den NMD. Auch der *non-stop decay* ist zur Erkennung nicht korrekt polyadenylierter Transkripte auf die erste Runde der Translation angewiesen. Transkripte die durch NMD bzw. *non-stop decay* reguliert werden, sollten durch den Translationsblock in Relation zu anderen Transkript-Populationen angereichert werden. Um Effekte eines Transkriptions-stops infolge der Emetinbehandlung auszuschließen, wurden die Jurkat-Zellen zusätzlich mit Actinomycin D (Act. D; 2 μ g/ml) inkubiert. Dabei interkaliert Actinomycin D in DNA durch Bindung an Guanin- und Cytosin-Nukleotide. Dadurch wird die Transkription der DNA blockiert. Mittels quantitativer PCR wurde der Einfluß von Emetin und Actinomycin D auf die Transkript-Fließgleichgewichte von V β 11-3 und V β 12-3 bestimmt (Abb. 4.8).

Emetin Act.D	- -	+ -	+ +
V β 11-3	30 x 10 ³	56 x 10 ³	8 x 10 ³
V β 12-3	6.000 x 10 ³	3.000 x 10 ³	2.600 x 10 ³
Verhältnis V β 11-3 vs. V β 12-3	0,005	0,019	0,003

Abbildung 4.8: Transkript-Fließgleichgewichte mittels quantitativer PCR in relativen Einheiten.

Für V β 11-3 wurde das Primer-Paar oAH97/oAH96 (58°C) und für V β 12-3 wurden oAH103/oAH102 (58°C) verwendet. In der reversen Transkription wurde jeweils der erste Primer der Primerpaare eingesetzt. Das Verhältnis der V β 11-3 Transkripte zu denen von V β 12-3 ist angegeben.

Die relative Anzahl ungespleißter V β 11-3 Transkripte steigt nach Emetin-Inkubation an, während V β 12-3 Transkripte abnehmen (Abb. 4.8). Die relative Anreicherung der V β 11-3 Transkripte ist jedoch nach der gleichzeitigen Inkubation mit Emetin und Actinomycin D nicht mehr zu beobachten. Die Zahl der V β 11-3 Transkripte nimmt im Vergleich zu den

unbehandelten Zellen stark ab. Somit ist keine relative Anreicherung der V β 11-3 Transkripte gegenüber den V β 12-3 Transkripten zu beobachten (Abb. 4.9).

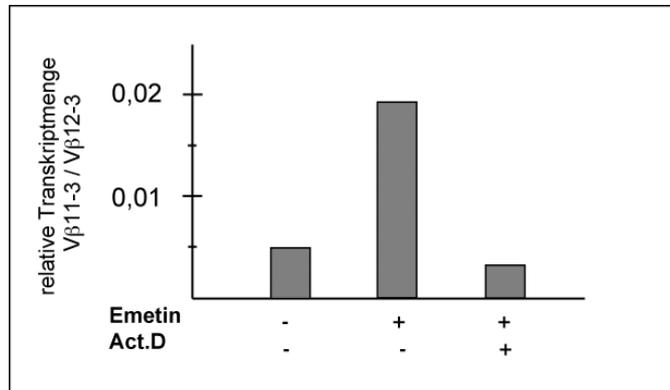


Abbildung 4.9

Der Translations-Inhibitor Emetin beeinflusst die Genexpression von Jurkat-Zellen, im Falle von V β 11-3 und V β 12-3 in gegensätzlicher Weise. Der gleichzeitige Stop der Transkription durch Actinomycin D zeigt, dass die V β 11-3 Transkripte nicht angereichert werden. Demzufolge werden V β 11-3 Transkripte nicht durch NMD oder *non-stop decay* abgebaut.

4.2.2 V β 11-3 und V β 12-3 Primärtranskripte sind vergleichbar stabil

Um eine generelle Aussage zur Stabilität der Transkripte des TCR β -Lokus treffen zu können, wurden die Transkription durch Inkubation der Jurkat-Zellen mit Actinomycin D blockiert (2 μ g/ml, 8 h). Anschließend wurde die relative Veränderung der Transkriptmengen zueinander untersucht. Transkripte die in Anwesenheit von Actinomycin D besonders stark abnehmen zeigen damit eine geringe Stabilität (Ionov, Nowak et al., 2004; Murasawa, Matsubara et al., 1995).

Die Stabilität der gespleißten und ungespleißten Transkripte von V β 11-3 und V β 12-3 wurden verglichen (Abb. 4.10). Die V β 11-3 Transkripte nehmen um den Faktor zehn ab. Die ungespleißten V β 12-3 Transkripte wurden um den Faktor sieben reduziert, während die gespleißten V β 12-3 Transkripte nur zweifach abnahmen. Die reifen V β 12-3 Transkripte zeigen damit die höchste Stabilität.

	V β 11-3	V β 12-3	
	ungespleißt	ungespleißt	gespleißt
PCR-Zyklen	20 25 30 35	20 25 30 35	20 25 30 35
Primer-Paare	oAH96 / oAH97	oAH102 / oAH103	oAH106 / oAH107
Hyb.-temperatur	60°C	60°C	60°C
unbehandelt			
relative Werte	0,03 x 10 ⁶	6,8 x 10 ⁶	225 x 10 ⁶
Act.D (2 µg/ml, 8 h)			
relative Werte	0,003 x 10 ⁶	0,94 x 10 ⁶	101 x 10 ⁶
Effekt	10x ↓	7x ↓	2x ↓

Abbildung 4.10: Untersuchung der Stabilität von Transkripten mittels Actinomycin D.

Die Ergebnisse qualitativer und quantitativer PCR für V β 11-3 und V β 12-3 sind abgebildet. Die reverse Transkription wurde jeweils mit dem hervorgehobenen Primer durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur in der PCR ist angegeben. Die Transkripte wurden vor und nach der Inkubation mit Actinomycin D gemessen.

Dabei wird durch den unveränderten Nachweis ungespleißter V β 12-3 Transkripte nach Actinomycin-Behandlung demonstriert, dass effektives Spleißen in Abhängigkeit von der Transkription stattfindet (Swinburne, Meyer et al., 2006). Die gespleißten Transkripte sind Teil eines Ribonukleoproteinkomplexes, der die RNA vor RNA-abbauenden Enzymen schützt. Diese Transkripte sind somit durch eine hohe Stabilität gekennzeichnet (Custodio und Carmo-Fonseca, 2001). Die Transkriptanalysen mit Actinomycin D zeigen, dass die Stabilität funktionaler Transkripte vergleichbar ist, mit der Stabilität von Transkripten nicht rekombinierter Gensegmente.

4.3 Analysen zu Transkripten des oberen und unteren DNA-Stranges

Strangspezifische RT-PCR-Analysen haben gezeigt, dass 22 % von über 26.000 humanen Transkriptionsloci Transkripte des kodogenen (*sense*) und nichtkodogenen (*antisense*) DNA-Stranges bilden (Chen, Sun et al., 2004). Im folgenden sollte untersucht werden, ob an der Genregulation des TCR β -Lokus auch molekulare Mechanismen eine Rolle spielen, die auf *antisense* Transkripten beruhen. In der Literatur wird beschrieben, dass es während der

reversen Transkription von mRNA zu einer selbstgeprimten Zweitstrang-Synthese kommen kann (Sambrook, 2001). Dabei geht man davon aus, dass sich die umgeschriebene cDNA während der RT-Reaktion zurückfaltet und als Primer auf der eigenen Matrize wirkt. Hier wurde zunächst die Eignung der AMV und MMLV reversen Transkriptase für die erforderliche strangspezifische Analyse von Transkripten untersucht. Dazu wurden zwei Primerpaare verwendet, welche spezifisch für gespleißte V β 12-3 Transkripte und gespleißte Luziferase Transkripte sind (Abb. 4.11 a)). Dabei wurde Gesamt-Zell-RNA episomal stabiler Jurkat-Zellen verwendet (pSJ18).

Das Verhältnis gespleißter Transkripte zu den durch Selbstpriming gebildeten zeigt, dass die MMLV besser als die AMV für die Analysen strangspezifischer Transkripte geeignet ist. Jedoch bildet auch die MMLV in geringem Umfang selbstgeprimte doppelsträngige cDNA-Produkte (Abb. 4.11). Das wurde durch quantitative PCR bestätigt. Als Beispiele dienten V β 12-3, Luziferase und zelluläres TBP (Abb. 4.12). Der Anteil der durch Selbstpriming gebildeten Produkte liegt bei den hier untersuchten Genen unter drei Prozent. Damit ist die MMLV-RT für die Untersuchung strangspezifischer Transkripte geeignet.

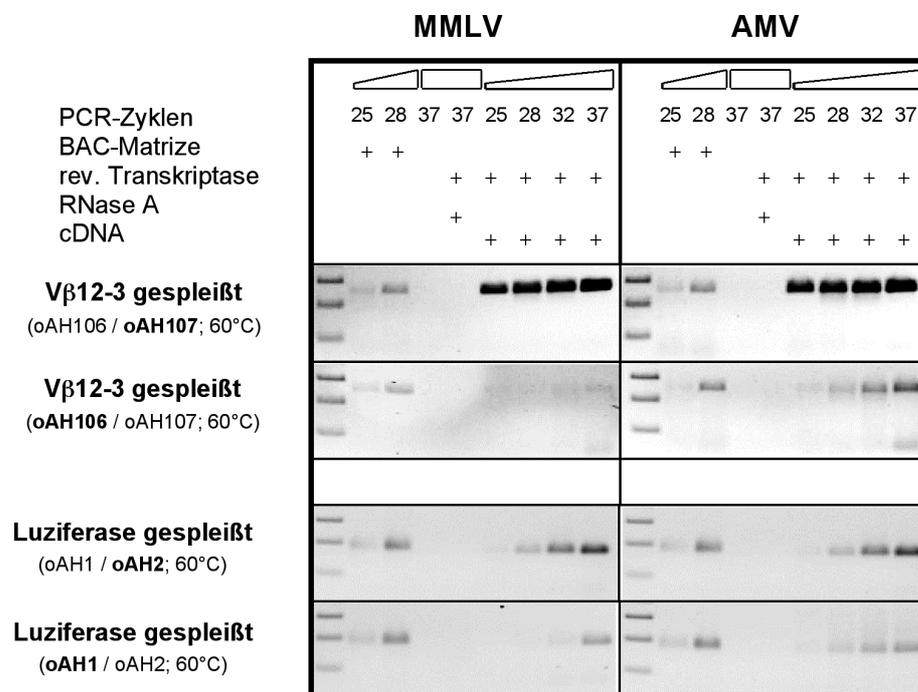


Abbildung 4.11: Die MMLV zeigt eine höhere Strangspezifität als die AMV.

In der reversen Transkription wurde zuerst der Rückwärts-Primer für den Nachweis der Transkripte des oberen DNA-Stranges verwendet (hervorgehobener Primer). Anschließend wurde der Vorwärts-Primer zum Umschreiben der Transkripte des unteren Stranges eingesetzt. Gespleißte, kodierende Transkripte stammen ausschließlich vom oberen Strang ab. Die Primerpaare und ihre Hybridisierungstemperatur in der PCR sind angegeben.

reverse Transkription mit MMLV + quantitative PCR	V β 12-3 gespleißt (oAH106 / oAH107; 60°C)	Luziferase gespleißt (oAH1 / oAH2; 60°C)	TBP ungespleißt (oAH8 / oAH9; 58°C)
Anteil durch Selbst- priming gebildete Produkte	0,01 %	2,6 %	0,5 %

Abbildung 4.12: Anteil der in der reversen Transkription mit MMLV durch Selbstpriming entstandenen Produkte.

In der reversen Transkription wurde der Vorwärts- (Selbstpriming) und Rückwärts-Primer (funktionale Transkripte) nacheinander eingesetzt. Mittels quantitativer PCR wurden die Produktmenge bestimmt. Der Anteil durch Selbstpriming entstandener Produkte in der reversen Transkription mit MMLV ist kleiner als 3 %.

4.3.1 An den Gensegmenten V β 11-3, V β 12-3 und V β 30 können *antisense* Transkripte detektiert werden

Im folgenden wurden V β 11-3, V β 12-3 und V β 30 auf Transkripte des oberen (kodierend) und unteren (nicht kodierend) DNA-Stranges untersucht. Dazu wurde in der reversen Transkription jeweils nur ein genspezifischer Primer eingesetzt, der entweder für die Transkripte des oberen oder unteren DNA-Stranges spezifisch ist (Abb. 4.13.).

An V β 11-3 und V β 12-3 konnten sowohl Transkripte des oberen, als auch des unteren Stranges nachgewiesen werden (Abb. 4.14). An V β 30 wurden nur Transkripte des oberen Stranges (nicht kodierend) im Bereich der Nachweisgrenze detektiert. An V β 11-3 wurde eine vergleichbare Anzahl von *sense* und *antisense* Transkripten gemessen. An V β 12-3 wurden hingegen mehr als doppelt so viel ungespleißte *sense* Transkripte im Vergleich zu *antisense* detektiert. Unter Einbeziehung der gespleißten V β 12-3 Transkripte ist die Anzahl der funktionalen V β 12-3 Transkripte jedoch 200 mal höher, als die der nicht kodierenden *antisense* Transkripte (Abb. 4.15). Außerdem wurde gezeigt, dass sowohl die *sense*, als auch die *antisense* V β 12-3 Transkripte PMA induzierbar und Pol II abhängig sind. Durch die strangspezifischen Transkriptanalysen wurden nichtkodierende Transkripte des Gegenstranges sowohl an V β 12-3, als auch im Bereich nicht rekombinierter Gensegmente nachgewiesen.

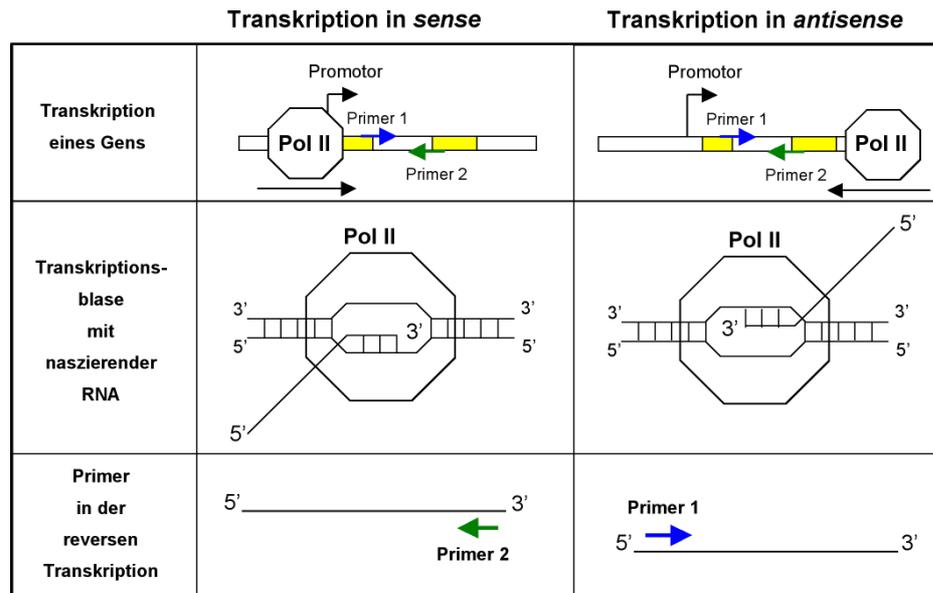


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung der reversen Transkription zur Unterscheidung strangspezifischer Transkripte.

Transkription eines Gens mit zwei Exonen (gelb). Die PCR-Primer 1 und 2 liegen auf der Intron-Exon-Grenze. Der Reverse-Transkriptionsprimer (Primer 1) ist in der reversen Transkription spezifisch für die *sense* Transkripte (kodierend), der Vorwärts-Transkriptionsprimer (Primer 2) ist spezifisch für die *antisense* Transkripte (nicht kodierend).

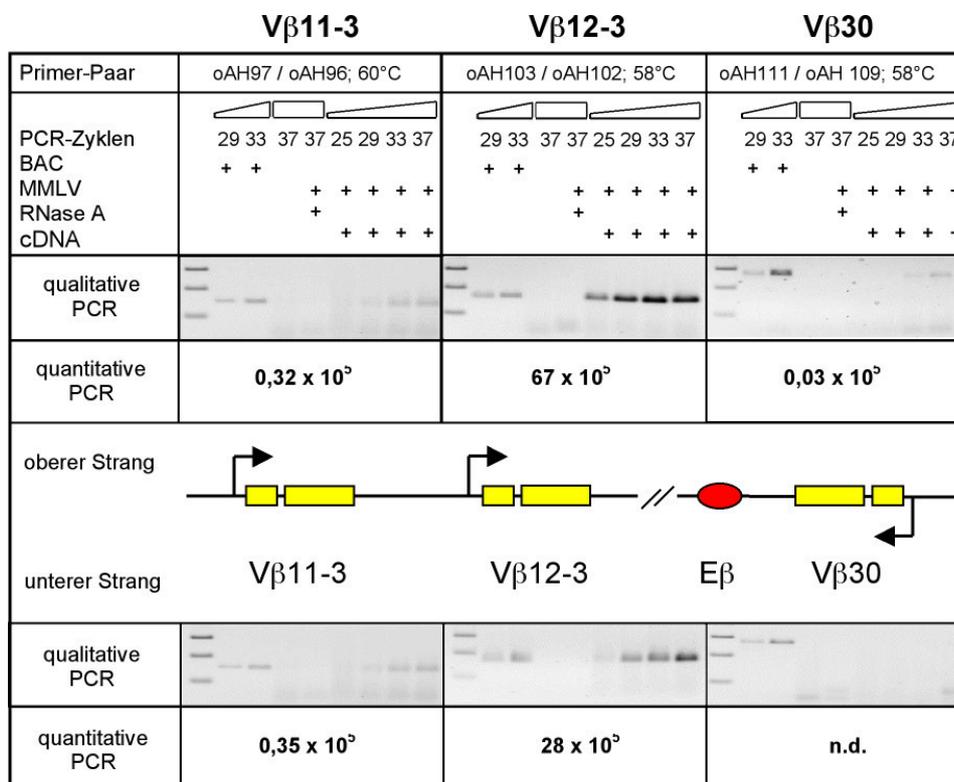


Abbildung 4.14: Qualitative und quantitative PCR an Vβ11-3, Vβ12-3 und Vβ30.

Die *sense* Transkripte sind oberhalb, die *antisense* Transkripte sind unterhalb des schematischen Lokus abgebildet. Die Angaben der Transkriptmenge erfolgt in relativen Einheiten. In der reversen Transkription wurde der jeweils erste Primer der Primerpaare zur Detektion der *sense* Transkripte verwendet.

Vβ12-3	sense								antisense							
	25		29		37		37		25		29		33		37	
PCR-Zyklen																
BAC	+		+						+		+					
MMLV					+		+		+		+		+		+	
RNase A					+						+					
cDNA					+		+		+		+		+		+	
unbehandelt																
	6,7 x 10 ⁶								2,8 x 10 ⁶							
PMA (0,02μg/ml; 24h)																
	24,4 x 10 ⁶ 3,6x ↑								6,0 x 10 ⁶ 2,1x ↑							
α-Amanitin (2μg/ml; 24h)																
	2,1 x 10 ⁶ 3,2x ↓								0,9 x 10 ⁶ 3,0x ↓							

Abbildung 4.15: Einfluss von PMA und α-Amanitin auf die Vβ12-3 Transkripte.

Die Ergebnisse qualitativer und quantitativer PCR (in relativen Einheiten) sind dargestellt. Die roten Zahlen geben die x-fache Veränderung der gemessenen Transkript-Fließgleichgewichte wieder, bezogen auf unbehandelte Jurkat-Zellen. Die Primer oAH104, oAH105 (58°C) wurden verwendet, die Konzentration und Dauer der PMA und α-Amanitin Behandlung sind angegeben.

4.3.2 Intergenische Transkripte des Enhancers Eβ

Am β-Globin-Lokus wurden mehrere Startstellen intergenischer Transkripte in der LCR identifiziert (Routledge und Proudfoot, 2002) und auch am Enhancer des Maus λ5-VpreB1-Lokus konnten bidirektionale Transkripte nachgewiesen werden (Szutorisz, Canzonetta et al., 2005). Es sollte untersucht werden, ob an Eβ Transkripte gebildet werden und ob diese für die Regulation des TCRβ-Lokus von Bedeutung sind. Dementsprechend wurden strangspezifische Transkriptanalysen im Bereich von Eβ durchgeführt. Dabei wurden Primerpaare stromaufwärts und stromabwärts von Eβ zur Analyse intergenischer Transkripten eingesetzt. Dadurch wurden intergenische Transkripte des oberen und unteren DNA-Stranges im Bereich von Eβ nachgewiesen (Abb. 4.16).

Es wurden vergleichbare Transkriptmengen des oberen Stranges stromaufwärts und stromabwärts von Eβ gemessen. Am unteren DNA-Strang wurde durch das Primerpaar 1 die fünffache Transkriptmenge im Vergleich zu dem stromabwärts liegenden Primerpaar 2 detektiert. Die intergenischen Transkripte im Bereich von Eβ sind Pol II abhängig und PMA-induzierbar. Die Transkripte des unteren Stranges zeigen dabei den stärksten Effekt

infolge der α -Amanitin Behandlung. Somit demonstrieren die Transkriptanalysen die Bildung von Transkripten des Gegenstranges im Bereich von E β .

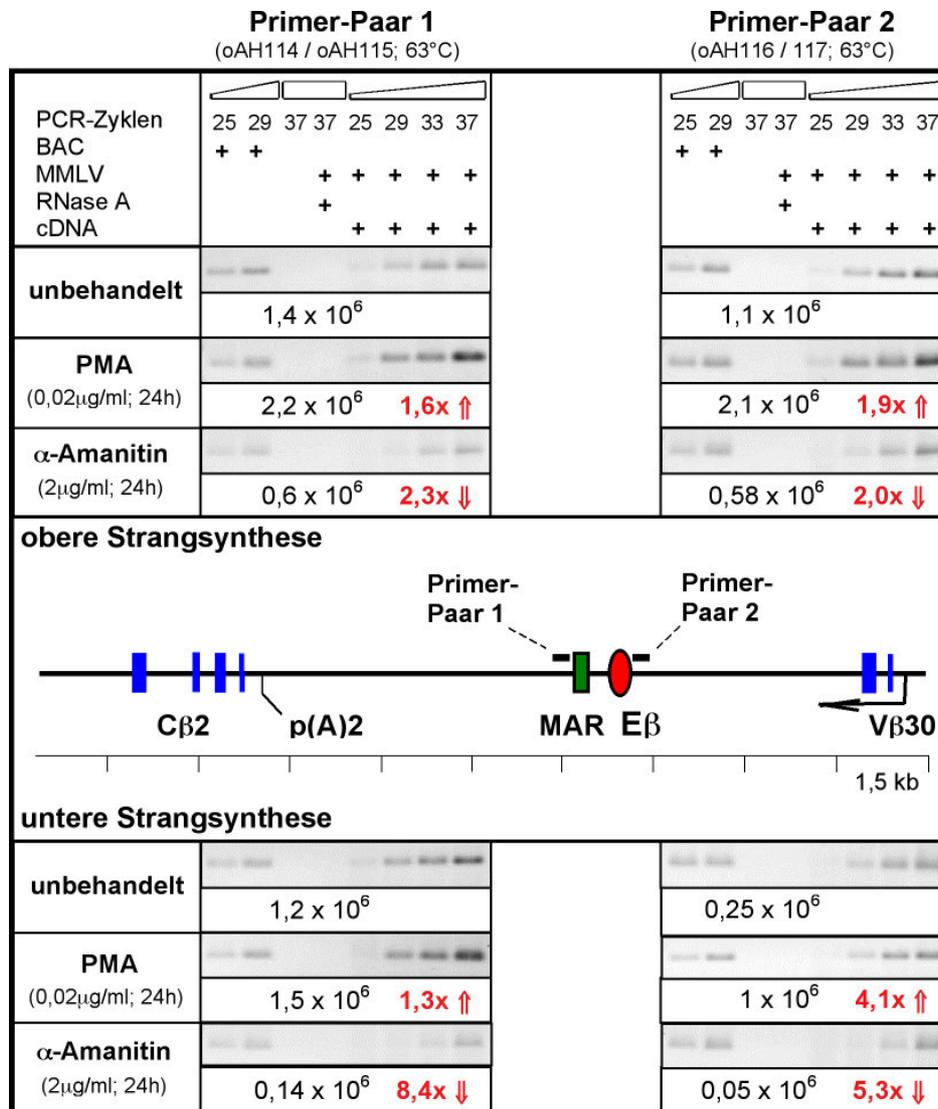


Abbildung 4.16: Strangspezifische intergenische Transkripte stromaufw rts und stromabw rts von E β .

Das Primer-Paar 1 befindet sich 900 bp stromaufw rts, das Primer-Paar 2 befindet 5 bp stromabw rts des 330 bp Enhancers. Die Transkriptmengen sind in relativen Einheiten angegeben. Die durch PMA und α -Amanitin Behandlung ermittelten x-fachen Effekte im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind rot angegeben.

4.4 Intergenische und Allel-spezifische Transkriptanalysen

Analysen zur Verteilung von Transposons im humanen Genom haben gezeigt, dass bis zu 50 % des Genoms transkribiert werden (Semon und Duret, 2004). Mehr als 40 % von 33.000 untersuchten cDNAs der Maus sind nicht kodierend (OkazakiFuruno et al., 2002). Vergleichbare Ergebnisse wurden für humane Transkripte gefunden (OtaSuzuki et al., 2004). Zur Analyse nicht kodierender bzw. intergenischer Transkripte am TCR β -Lokus wurden mehrere Primerpaare synthetisiert. Die meisten Primerpaare der Analysen sind Allel-unspezifisch. Es wurden jedoch auch Allel-spezifische Primer eingesetzt um zu untersuchen, ob an variablen Promotoren des nicht rekombinierten Allels Transkripte gebildet werden. Die Abbildung 4.17 zeigt die relative Lage von Primerpaaren im rekombinierten Allel und die relative Anzahl nachgewiesener Transkripte.

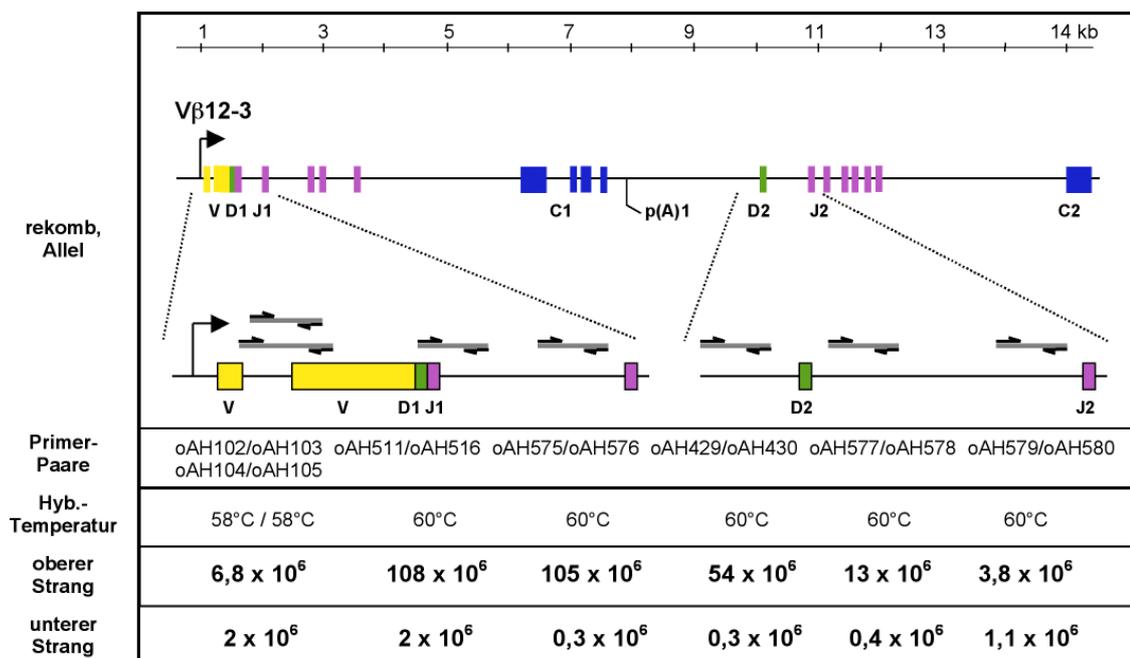


Abbildung 4.17: Transkripte des rekombinierten TCR β -Allels.

Das rekombinierte Allel und die Lage der verwendeten Primerpaare sind abgebildet. Die detektierten Transkripte des oberen und unteren DNA-Stranges sind in relativen Einheiten angegeben.

Im ORF von V β 12-3 wurde die größte Anzahl kodierender Transkripte stromabwärts der variablen Exone, im Bereich des V(D)J-Rekombinationsortes nachgewiesen. In Richtung des ersten Polyadenylierungssignales nimmt die Anzahl dieser Transkripte deutlich ab.

Kodierende Transkripte in *sense* wurden an jeder Stelle des rekombinierten Allels in größerer Menge detektiert, als nicht kodierende *antisense* Transkripte.

Zur Untersuchung des nicht rekombinierten TCR β -Allels wurden ebenfalls Allel-spezifische Primer eingesetzt (Abb. 4.18). An V β 12-3 dieses Allels konnten keine Transkripte detektiert werden. Somit stammen alle nachgewiesenen V β 12-3 Transkripte vom rekombinierten Allel. Über 250 kb stromabwärts im Bereich des Keimbahn-Promotors pD β 1 konnten Transkripte des oberen Stranges nachgewiesen werden. Die Anzahl dieser Transkripte ist vergleichbar mit denen an E β des rekombinierten Allels.

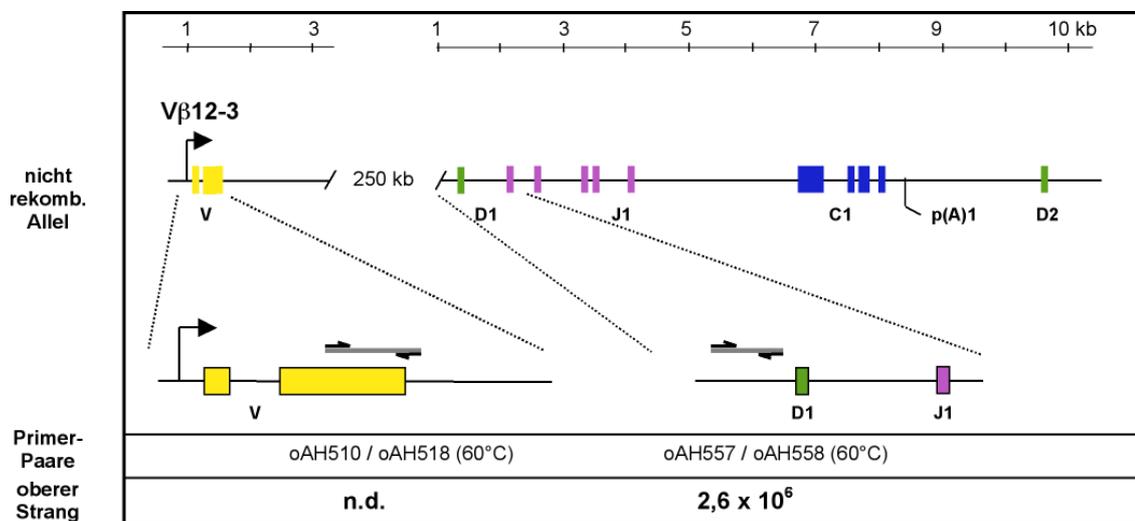


Abbildung 4.18: Transkripte des nicht rekombinierten TCR β -Allels.

Die Lage der verwendeten Primerpaare ist schematisch dargestellt. Die nachgewiesenen Transkripte sind in relativen Einheiten angegeben.

Die Transkriptanalysen zu intergenischen Transkripten haben gezeigt, dass am nicht rekombinierten Allel keine V β 12-3 Transkripte gebildet werden, und dass die Anzahl der *antisense* V β 12-3 Transkripte des funktionalen Lokus geringer ist, als die der *sense* Transkripte.

4.5 Insulator-Analysen

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob Insulatoren bei der Begrenzung der Enhancerwirkung auf den Zielpromotor V β 12-3 beteiligt sind. Dabei

unterscheidet man zwischen CTCF-abhängigen und CTCF-unabhängigen Insulatoren (Magdinier, Yusufzai et al., 2004). CTCF-unabhängige Insulatoren sind bisher noch recht wenig charakterisiert (Gaszner und Felsenfeld, 2006). In den CTCF-abhängigen Insulatoren bindet das Zink-Finger-Protein CTCF spezifisch an DNA (Bell und Felsenfeld, 1999). Zunächst wurde *in silico* im Bereich der Gensegmente V β 11-3, V β 12-3 und V β 30 nach putativen CTCF-Bindungsstellen des oberen und unteren Stranges gesucht. Dabei wurden keine CTCF-Konsensussequenzen (Yusufzai und Felsenfeld, 2004) identifiziert, jedoch eine Reihe teilweise konservierter Elemente im Gen gefunden (Abb. 4.19).

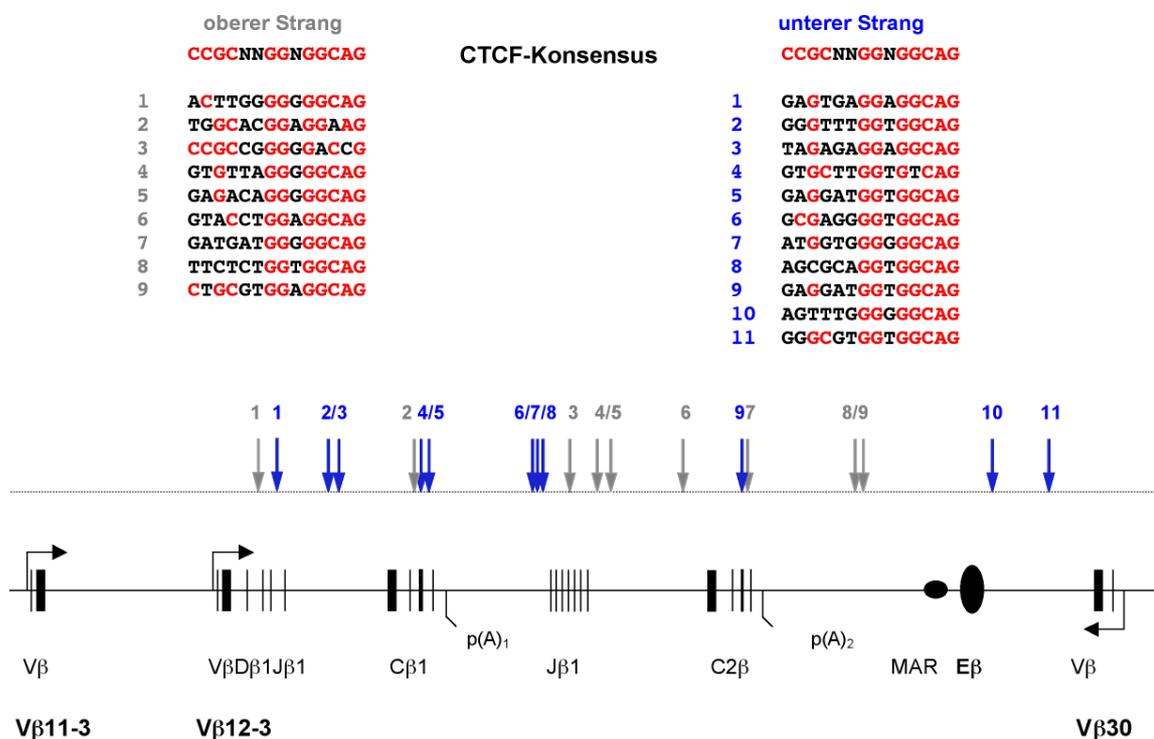


Abbildung 4.19: Identifizierung CTCF-ähnlicher Bindungsstellen an TCR β .

Mehrere Bereiche des Locus weisen Sequenzhomologien zu CTCF auf. Elemente des oberen Stranges sind grau, Elemente des unteren Stranges sind blau mit ihrer Lage im Locus durch Pfeile gekennzeichnet. Der CTCF-Konsensus ist abgebildet.

Zwischen V β 11-3 und V β 12-3 wurden keine DNA-Elemente identifiziert, die eine dem CTCF-Konsensus ähnliche Basensequenz aufweisen.

4.5.1 Das Insulator-Testsystem

Enhancer-Elemente sind in der Lage die Interaktion eines Enhancers auf einen Promotor zu begrenzen und/oder die Ausbildung von Heterochromatin zu blockieren (Gaszner und Felsenfeld, 2006). Um zu klären, ob sich ein Insulator-Element zwischen $V\beta 11-3$ und $V\beta 12-3$ befindet (Abb. 4.20), wurden DNA-Fragmente dieses Bereiches in einem Insulator-Testsystem auf reprimierende Funktion der Promotor-Enhancer-Interaktion untersucht.

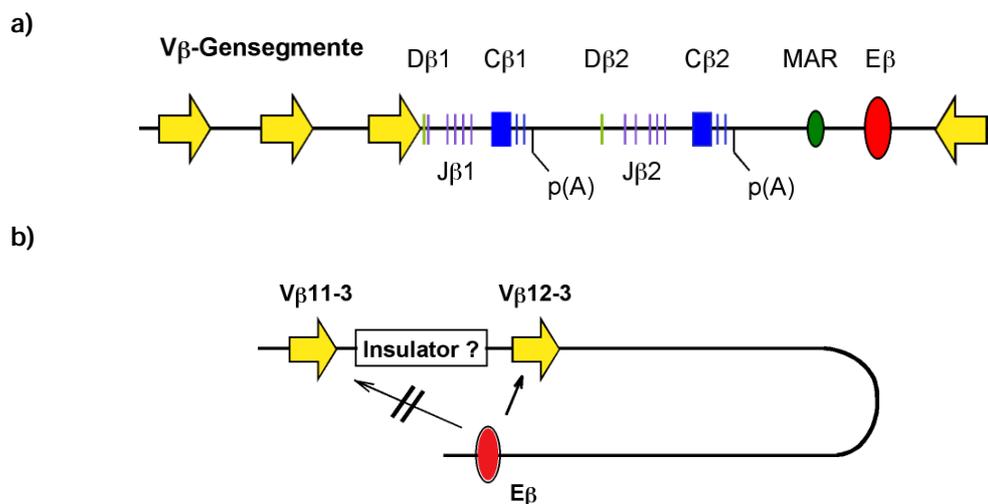


Abbildung 4.20: Lage eines putativen Insulator-Elementes innerhalb des TCR β -Lokus.

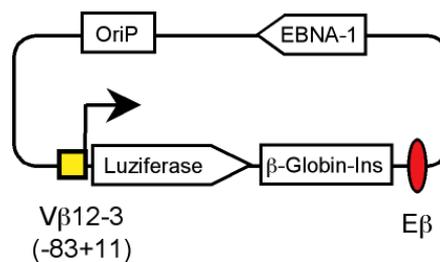
a) Im rekombinierten Allel des TCR β -Lokus bildet nur das an $D\beta 1$ - $J\beta 1$ (grün, lila) rekombinierte Gensegment $V\beta 12-3$ (gelb) funktionale Transkripte.

b) Ein Insulator-Element stromaufwärts von $V\beta 12-3$ könnte die Funktion von $E\beta$ auf $V\beta 12-3$ begrenzen.

Dazu wurde ein stabil replizierendes episomales Testsystem etabliert (Abb. 4.21 a)). Regulatorische Regionen des Epstein-Barr-Virus (EBV) bilden die Grundlage dieses Systems. Der virale Replikationsstartpunkt (OriP) dient einer von der zellulären Kontrolle unabhängigen Replikation des Episoms. Die Expression des viralen EBNA1-Gens dient ebenfalls der episomalen Weitergabe des Plasmids. Der Zusatz des eukaryotischen Antibiotikums Hygromycin B zum Zell-Medium stellt dabei sicher, dass alle Jurkat-Zellen der Zellsuspension das Episom tragen. Dabei werden keine DNA-Elemente des Episoms in das Genom integriert. Im Regelfall enthält jede Wirtszelle 5-10 Kopien des Episoms (Sugden, Marsh et al., 1985). ChIP-Analysen haben gezeigt, dass stabil replizierende EBV-Plasmid-Vektoren Chromatinstrukturen aufweisen (Zhou, Chau et al., 2005).

Der Insulator HS4 des Hühner- β -Globin-Lokus (*gallus gallus*) reduziert die Wirkung des Enhancers, sofern er sich zwischen Promotor und Enhancer auf dem Episom befindet. Die Enhancer induzierte Expression des Luziferase-Reporters wird durch den Insulator um den Faktor drei reduziert (Abb. 4.21 b)). Nach Inkubation der Zellen mit dem Phorbol-Ester PMA bewirkt der HS4 Insulator eine fünffache Reduktion. Das Insulator-Testsystem besitzt den minimalen, voll funktionsfähigen $V\beta 12-3$ Corepromotor (-83+11) stromaufwärts eines Reportergens (Halle, Haus-Seuffert et al., 1997). Stromabwärts von $V\beta 12-3$ befindet sich ein 330 bp Enhancer-Fragment. Der Hühner- β -Globin-Insulator wurde zwischen die Luziferase und E β als Tandem-Wiederholung (1,2 kb) positioniert (Chung, Bell et al., 1997). Die PMA-Induktion transientscher Luziferase-Reporter-Plasmiden führte zu einer sechs- bis zehnfachen Stimulierung (Haus-Seuffert, Halle et al., 1999).

a)



b)

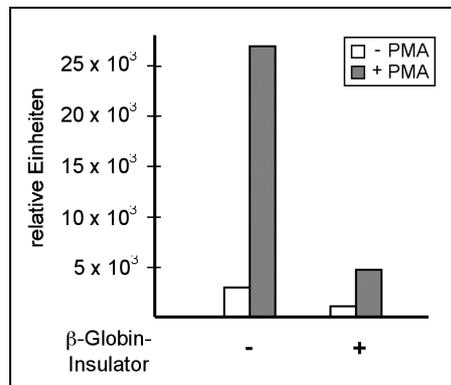


Abbildung 4.21: Entwicklung eines Insulator-Testsystems.

a) Schematischer Aufbau des stabilen Reporters (pSJ20).

b) Insulierender Effekt des Hühner- β -Globin-Insulators auf die Promotor-Enhancer-Wechselwirkung.

4.5.2 Der Bereich zwischen V β 11-3 und V β 12-3 zeigt keine Insulatorfunktion, bewirkt jedoch starke Transkriptionsaktivierung

Im nächsten Schritt wurde der intergenische Bereich zwischen V β 11-3 und V β 12-3 einem Insulator-Test unterzogen. Dazu wurde der Bereich in zwei Fragmente unterteilt, die anstelle des Hühner- β -Globin-Insulators im Plasmid (pSJ18) positioniert wurden. Das Fragment A umfaßt 2906 bp und das Fragment B 2850 bp (Abb. 4.22).

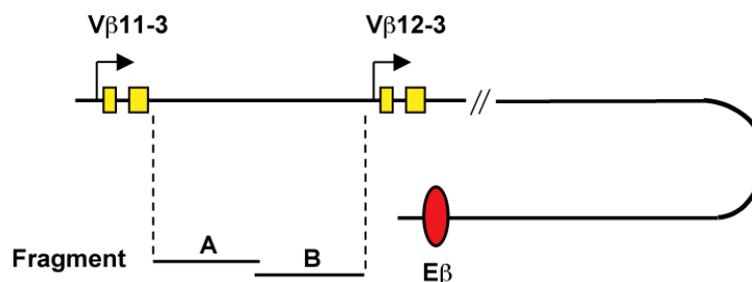


Abbildung 4.22: Fragmente A und B zwischen V β 11-3 und V β 12-3.

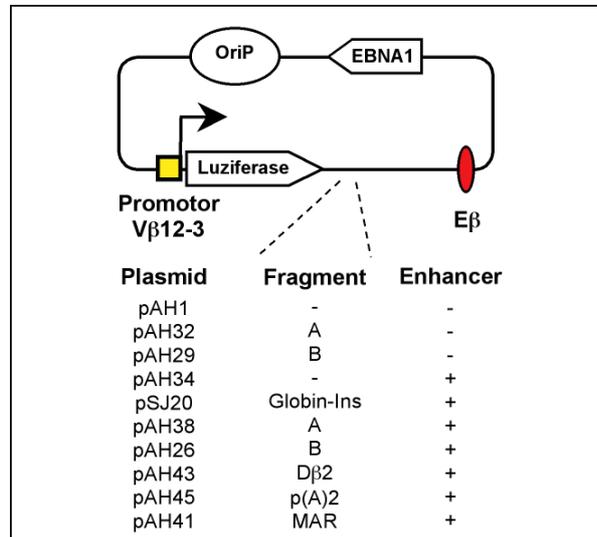
Der intergenische Bereich des rearrangierten TCR β -Allels wird durch die Fragmente A und B abgedeckt. Das Fragment A beginnt 50 bp stromabwärts des 2. Exons von V β 11-3. Es berlappt mit dem Fragment B mit 403 bp. Das Fragment B endet 64 bp stromaufwärts des V β 12-3 Promotors.

Die Fragmente A und B wurden in den abgebildeten Plasmid-Vektor anstelle des Hühner- β -Globin-Insulators positioniert (Abb. 4.21 a). In der Abbildung 4.23 a) sind die Plasmid-Vektoren aufgeführt, welche mittels Luziferase-Analysen in Jurkat-Zellen untersucht wurden. Die Fragmente A und B erhöhen die Transkription von V β 12-3 und zwar stärker als der konstitutive Enhancer. Durch die gleichzeitige Anwesenheit von E β im Vektor-System wird die durch die Fragmente A und B hervorgerufene Transkriptionsaktivierung deutlich reprimiert. Der Phorbol-ester PMA bewirkt eine verstärkte Transkription des Reporters. Dieser Effekt ist vergleichbar mit der Transkriptionsaktivierung durch die Fragmente A und B.

Unter der Annahme von Looping-Mechanismen zur Promotor-Enhancer-Interaktion ist es möglich, dass auch die Gensegmente V β 12-3 und V β 30 durch Insulator-Elemente getrennt werden. Deswegen wurden weitere DNA-Sequenzbereiche im Insulator-Testsystem auf Reprimierung der Enhancer-Funktion untersucht. Die getesteten DNA-Elemente befinden sich alle stromabwärts des V β 12-3 ORFs. Drei verschiedene DNA-Elemente wurden

untersucht. Dabei wurde auch ein 873 bp großes Fragment mit dem Element D β 2 verwendet.

a)



b)

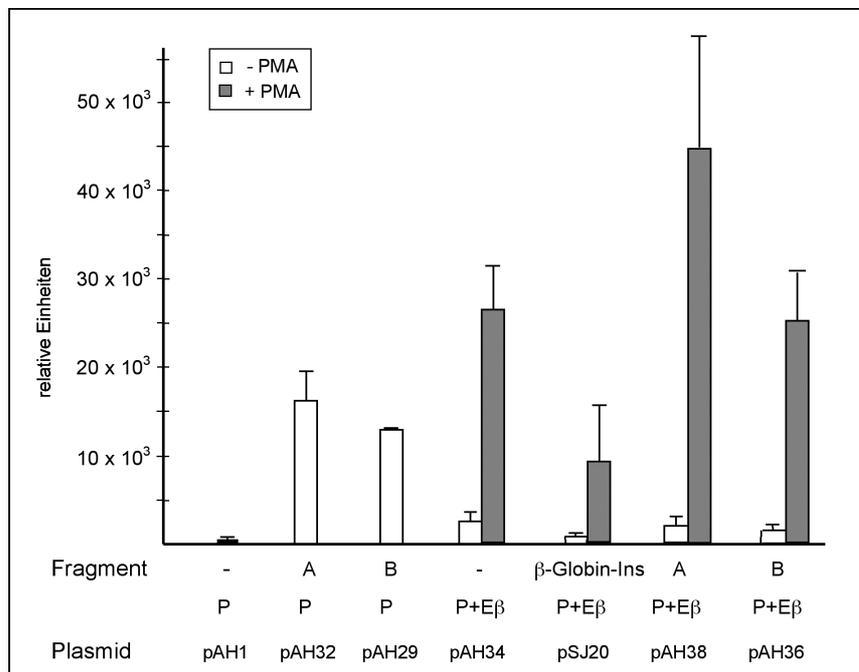


Abbildung 4.23: Interpromotorbereiche stimulieren die Transkription.

a) Schema der Konstrukte.

b) Luziferase-Analysen episomal stabiler Plasmid-Vektoren in Jurkat.

Ebenso wurde ein 2529 bp großes Fragment aus dem Bereich des zweiten Polyadenylierungssignals in das Insulator-Testsystem kloniert. Dieses Element umfaßt die putativen CTCF-Bindungsstellen 9 des oberen DNA-Stranges sowie die putativen Bindungsstellen 7, 8 und 9 des unteren DNA-Stranges (Abb. 4.19). Außerdem wurde ein 342 bp großes Fragment mit dem MAR-Element des TCR β -Lokus getestet. Die Fragmente D β 2, p(A)2 und MAR wurden ebenfalls zwischen den V β 12-3 Corepromotor und E β positioniert (Abb. 4.23 a)). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 4.23 b) zusammengefaßt.

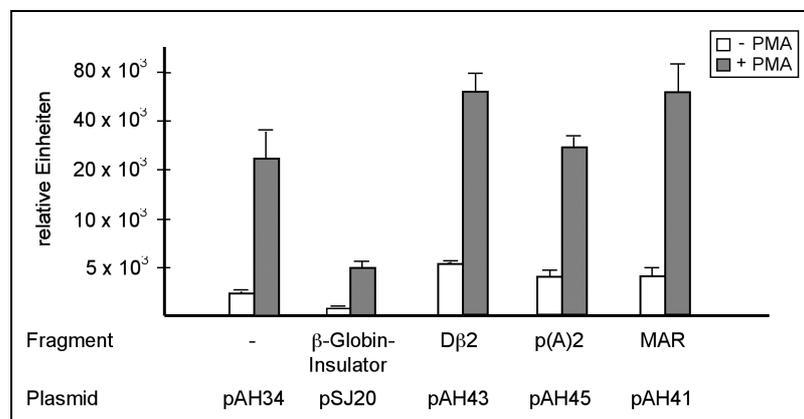


Abbildung 4.24: DNA-Elemente zwischen V β 12-3 und V β 30 verstärken die Transkription des Reporters.

Logarithmische Darstellung der Luziferase-Reporter-Ergebnisse.

Die drei Fragmente bewirken eine stärkere Luziferase-Expression als der Test-Vektor mit dem Hühner- β -Globin-Insulator. Auch ist die Transkription höher als bei alleiniger Anwesenheit des Corepromotors und E β . Die Aktivierung ist ebenfalls stärker als der durch die Fragmente A und B gezeigte Effekt. Außerdem wurde die Wirkung von E β auf den Reporter verstärkt.

Die im Insulator-Testsystem untersuchten DNA-Fragmente des Locus zeigen keine insulierende Wirkung. Jedoch zeigen alle untersuchten Fragmente einen PMA-Effekt. Dieser Effekt ist besonders stark meßbar an den Plasmid-Vektoren, welche die Fragmente A und B tragen. Da der PMA-Effekt Enhancer-abhängig ist, kann dieser Effekt auf eine Interaktion der Fragmente A und B mit E β hinweisen. Insgesamt konnte durch die Analysen

gezeigt werden, dass V β 12-3 von den stromaufwärts liegenden Gensegmenten nicht durch Insulatoren abgegrenzt wird.

4.6 Histon-Besetzung und Histon-Modifikationen am TCR β -Lokus

Geringe Besetzung der DNA mit Histonen kann ein Hinweis auf die Bindung DNA-bindender Proteine sein. Transkriptionsaktive Promotoren weisen häufig eine geringe Besetzung mit Histonen auf (Agelopoulos und Thanos, 2006). Dies ermöglicht es der Transkriptionsmaschine die genomische DNA zu binden und die Transkription zu starten (Dean, 2006). Dabei ist die Methylierung von Lysin K4 des Histons H3 typisch für Chromatinbereiche die aktiv transkribiert werden (Liang, Lin et al., 2004; Schneider, 2004). Zur Untersuchung der Histon-Besetzung und der Histon-Modifikationen wurde der TCR β -Lokus mittels ChIP charakterisiert (Abb. 4.25). Der Lokus zeigt Histon-freie Bereiche an E β und eine reduzierte Besetzung mit Histonen an V β 12-3. V β 11-3 und V β 30 tragen Nukleosomen. Etwa 50 % der durchschnittlichen Histon H3 Besetzung wurde an D β 2 des rekombinierten Allels sowie an pD β 1 des nichtrekombinierten Allels nachgewiesen. Auch E β zeigt nur eine geringe Histon-Besetzung. H3K4 dimethyliert durch den gesamten untersuchten Bereich. Dagegen ist ein deutliches Maximum der H3K4 Trimethylierung an J β 2 des rekombinierten Allels detektiert wurden. Auch der V(D)J-Rekombinationsort zeigt starke H3K4 Trimethylierung. Die Stimulation der Jurkat-Zellen durch PMA führte zu keiner bedeutenden Veränderung der Histon H3 Besetzung am Lokus. Auch auf die H3K4 Di- und Trimethylierung hatte PMA nur geringen Einfluß. Die Histon-Modifikationen nehmen unter PMA-Einfluß jedoch etwas ab, besonders an Orten relativ hoher H3K4 Methylierung. Insgesamt zeigen die bereits beschriebenen Elemente V β 12-3, D β 2, pD β 1 sowie der Enhancer, die für Promotoren typische Besetzung mit Histon H3 und H3 Methylierungsmuster. Das nicht rekombinierte Allel zeigt einen repressiven Chromatinstatus. Allein der keimbahnspezifische Promotor pD β 1 weist Marker transkriptionsaktiven Chromatins auf. Die H3K4 Trimethylierungsraten an V β 12-3 spiegeln die Sonderstellung dieses Gensegmentes im Lokus, im Bezug auf die Transkription und die Prozessierung von Transkripten.

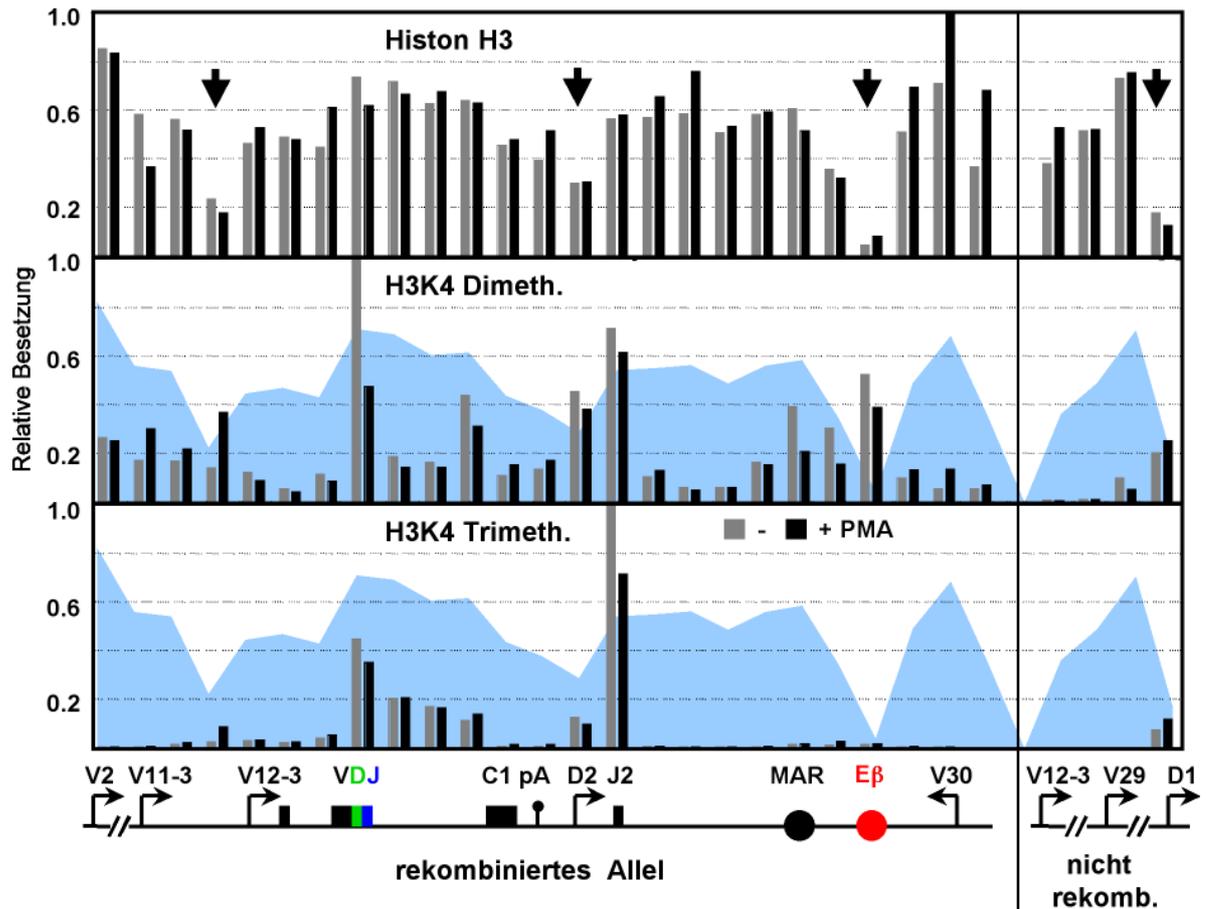


Abbildung 4.25: Besetzung des TCR β -Lokus mit dem Histon H3 sowie H3K4 Di- und Trimethylierung am Lokus.

Spezifische Antikörper gegen Histon H3 (Abcam: ab1791) und gegen die H3K4 Di- (Abcam: ab8580) und Trimethylierung (Upstate: 07-030) wurden verwendet. Die Präzipitate der ChIP-Analysen wurden durch die quantitative PCR analysiert. Die verwendeten Primer und Konditionen sind unter 2.5.2 bzw. 3.7 hinterlegt. Schematisch wurde im linken Teil der Abbildung das rekombinierte und rechten Teil das nichtrekombinierte Allel dargestellt.

Die Säulen (grau: -PMA; schwarz: +PMA) zeigen die jeweilige relative Stärke der Besetzung an, wobei die höchste Besetzung gleich eins gesetzt wurde. (24 h, 0,02 μ g/ml) Die Histon H3 Besetzung wurde durch einen blauen Hintergrund in die Abbildung der H3K4 Methylierung projiziert. Die Bereiche besonders niedriger Histon H3 Besetzung sind durch Pfeile markiert.

4.7 Besetzung der RNA-Polymerase II am TCR β -Lokus

Als nächstes wurde die Verteilung der RNA-Polymerase II am Lokus gemessen. Dazu wurde ein Antikörper gegen die große Untereinheit RNAP II verwendet (Abb. 4.26). Stromaufwärts des V β 12-3 Promotors sowie am nichtrekombinierten Allel, mit Ausnahme von pD β 1, ist die Pol II Besetzung sehr gering bzw. an der Nachweisgrenze. Der Einfluß

von PMA (24 h, 0,02 µg/ml) auf die Pol II Besetzung am Locus ist moderat und führt meist zu einer leichten Erhöhung der detektierten Pol II.

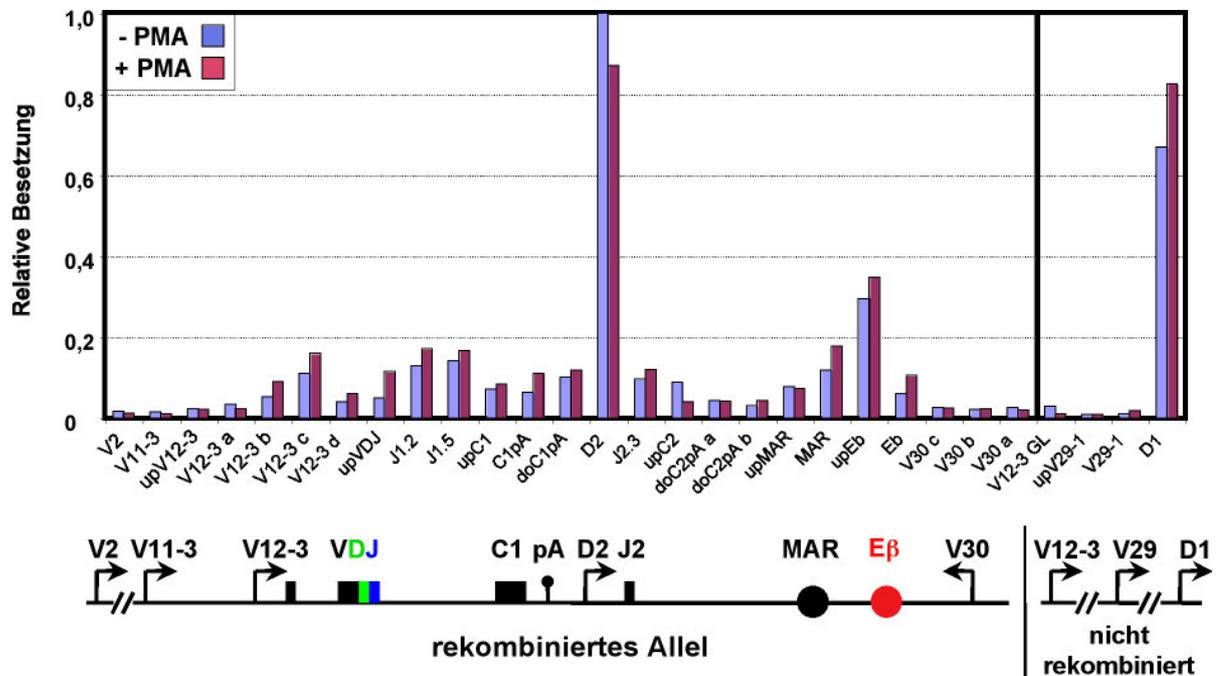


Abbildung 4.26: ChIP von RNAP II am TCR β -Lokus.

Ein spezifischer Antikörper gegen Rpb1 wurde in den ChIP-Analysen verwendet (SC-899(CN-20)). Die Präzipitate dieser Analysen wurden anschließend durch quantitative PCR analysiert. Die Namen der Primerpaare sind angegeben, ihre Sequenz ist im Material-Teil hinterlegt. Das detektierte Besetzungsmaximum wurde gleich eins gesetzt.

Insgesamt zeigen die ChIP-Analysen, dass nicht nur der V β 12-3 ORF, sondern auch nicht funktionale Gensegmente des rekombinierten Allels Eigenschaften offenen Chromatins zeigen. Dabei wurde hohe Pol II Besetzung im Bereich zwischen V β 12-3 und E β sowie an pD β 1 des nicht rekombinierten Allels nachgewiesen.

4.8 Der Einfluß des 3'-Bereichs der V β -Transkripte auf die Genregulation

Neben E β und den Promotoren der Gensegmente können noch weitere DNA-Elemente des Locus für die Genregulation wichtig sein. Das funktionale V β 12-3 Gensegment unterscheidet sich von den anderen Promotoren durch den 3'-Bereich der J-Region infolge

der Gen-Umlagerung. Dieser umfasst weitere Exone und Introne sowie eine funktionale Polyadenylierungsstelle. Im folgenden wurde die Rolle dieser polyA-Region untersucht.

4.8.1 Funktionelle Analyse der polyA-Stellen

Auf der Basis eines episomal stabilen EBV-Vektor-Plasmides wurde der TCR β -Lokus in Teilen rekonstruiert, sodass der Einfluss unterschiedlicher polyA-Stellen auf die episomalen Transkripte untersucht werden konnte. Zunächst wurde ein 1,1 kb großes Fragment des rekombinierten V β 12-3 Gensegmentes in ein EBV-Vektor-Plasmid kloniert (Abb. 4.19). Dieses Fragment umfaßt neben dem V β 12-3 Promotor die zwei variablen Exone, wobei das zweite Exon infolge der V(D)J-Rekombination ein 3'-Spleißsignal enthält. Bereiche aus dem konstanten Teil des Gens sind nicht enthalten, ebenso wie an nicht rekombinierten Gen-Segmenten. Stromabwärts des 1,1 kb Fragmentes wurden unterschiedliche Elemente der Polyadenylierungsstelle positioniert. Stromabwärts des Elementes oriP befindet sich dabei ein 330 bp umfassendes E β -Fragment. Durch die Analyse der episomalen Transkripte sollte der Einfluß unterschiedlicher Polyadenylierungsstellen auf die Transkript-Fließgleichgewichte untersucht werden.

Zunächst wurden episomal stabile Jurkat-Zelllinien generiert. Die Gesamt-Zell-RNA der Zelllinien wurde anschließend mit spezifischen Primern (oAH43, oAH44) revers transkribiert. Dazu wurden Rückwärts-Primer synthetisiert, welche am Übergang zwischen der DNA des Plasmid-Rückgrats und des klonierten TCR β -Fragmentes liegen (Abb. 4.27). Diese Primer sind spezifisch für die episomalen V β 12-3 Transkripte der EBV-Plasmid-Vektoren. In der qualitativen und quantitativen PCR wurden zur Unterscheidung gespleißter und ungespleißter Transkripte spezifische Vorwärts-Primer eingesetzt, welche entweder den Exon-Intron-Übergang (oAH104) oder den Exon-Exon-Übergang (oAH108) überstreichen. Sequenzanalysen haben ergeben, das ein konserviertes AAUAAAAA-Oktamer das Polyadenylierungssignal in der ersten und zweiten Polyadenylierungsstelle des duplizierten TCR β -Lokus darstellt (Abb. 4.28). Zunächst wurde ein Konstrukt untersucht, welches dieses Oktamer enthält (pAH93). Im Ergebnis konnten jedoch keine gespleißten und ungespleißten Transkripte dieses Episoms (pAH93) detektiert werden.

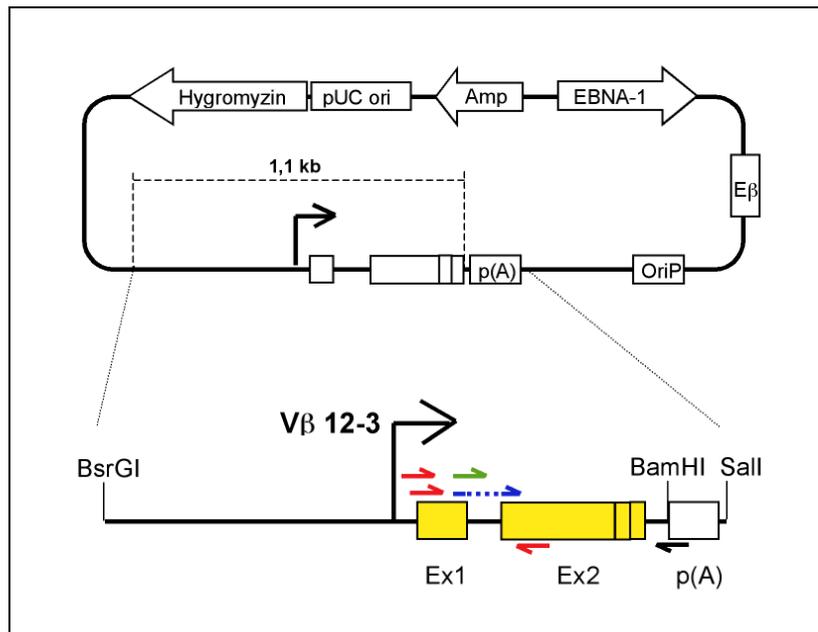


Abbildung 4.27: EBV-Plasmid-Vektor zur funktionellen Analyse der polyA-Stellen.

Ein 1,1 kb Fragment des rekombinierten Allels befindet sich stromaufwärts der zu untersuchenden polyA-Konstrukte. In der reversen Transkription wurden die Reverse-Primer (schwarz; oAH43, oAH44) verwendet, die für die episomalen Transkripte spezifisch sind. Der grüne Vorwärts-Primer (oAH104) ist spezifisch für ungespleißte, der blaue Vorwärts-Primer (oAH108) ist spezifisch für gespleißte Transkripte in der PCR. Zur Validierung wurden weitere Primer verwendet (rot; Vorwärts-Primer: oAH52, oAH53; Reverse-Primer: oAH105)

4.8.1.1 Identifizierung hoch konservierter Elemente der TCR β Polyadenylierungsstellen

Durch Sequenzanalysen der ersten und zweiten Polyadenylierungsstelle des TCR β -Lokus wurden neben dem konservierten AAUAAAAA-Oktamer weitere konservierte Bereiche der Polyadenylierungsstellen identifiziert. Dabei wurde für die Sequenzanalysen auch der murine TCR β -Lokus mit einbezogen (Abb. 4.28).

PCR-Zyklen MMLV RT - Primer	▲		□		quantitative PCR (relative Einheiten)
	26	30	30	30	
WtpA (pAH101) (oAH104 / oAH43)	+	+		+	2×10^5
MT1pA (pAH102) (oAH104 / oAH44)					12×10^5
MT2pA (pAH103) (oAH104 / oAH43)					$0,2 \times 10^5$
MT3pA (pAH104) (oAH104 / oAH43)					$4,1 \times 10^5$

Abbildung 4.30: Mutationen der polyA-Bereiche.

Die episomalen Plasmid-Vektoren sind angegeben sowie die in der PCR verwendeten Primerpaare (jeweils 58°C). Der Primer pAH43 bzw. pAH44 wurde in der reversen Transkription eingesetzt. Hintergrundsignale in der quantitativen PCR wurden von den gemessenen Werten abgezogen.

Im Vergleich zu den V β 12-3 Transkripten des rekombinierten Allels wurden deutlich weniger episomale Transkripte der Zelllinien nachgewiesen. Die Mutation des konservierten Bereiches 1 (Mt1pA) führte zu einer Versechsfachung der detektierten Transkriptmenge gegenüber dem Wildtyp. Die Mutation der konservierten Bereiche 1 und 2 (Mt3pA) führte zu einer Verdopplung der Transkripte gegenüber dem Wildtyp. Infolge der Mutation des Polyadenylierungssignales (Mt2pA) wurden zehnfach weniger episomale Transkripte gemessen. Somit wirken die konservierten Bereiche 1, 2 und 3 der TCR β -Polyadenylierungsstellen negativ auf die Fließgleichgewichte der ungespleißten Transkripte.

In einem zweiten Schritt wurden die gespleißten Transkripte der episomalen V β 12-3 Plasmid-Vektoren untersucht. Im Gegensatz zu den ungespleißten Transkripten sind die gespleißten Transkripte aufgrund ihrer geringen Anzahl nur qualitativ nachweisbar. Das Gleichgewicht zwischen den Primärtranskripten und den gespleißten Transkripten liegt fast vollständig auf der Seite der Primärtranskripten. In der Abbildung 4.31 ist das für die Transkripte des episomalen Wildtyp-Konstruktes (WtpA; pAH101) gezeigt. Diese Ergebnisse wurden durch zwei weitere Primerpaare bestätigt. Dazu wurden spezifische Primer für die episomalen Transkripte (oAH43) in der reversen Transkription eingesetzt. In der folgenden PCR wurden Primerpaare verwendet, welche gespleißte und ungespleißte Transkripte amplifizieren können (Abb. 4.32).

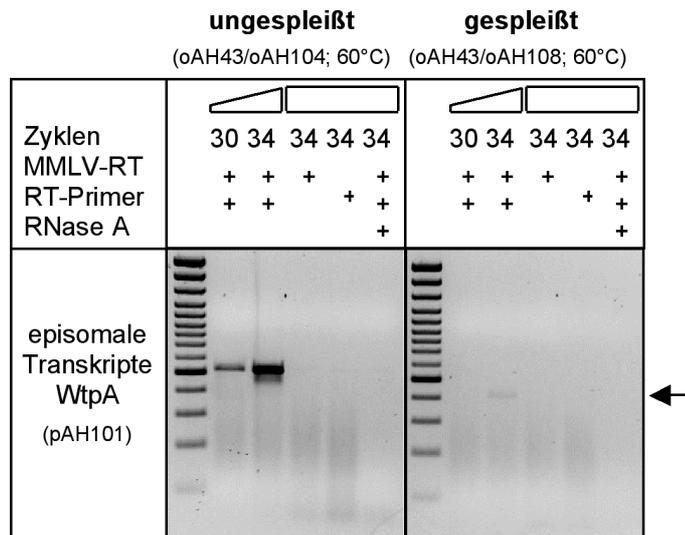


Abbildung 4.31: Ungespleißte und gespleißte Transkripte des episomalen WtpA-Konstruktes. Die Transkripte des Plasmid-Vektors pAH101 wurden mit den angegebenen Primerpaaren nachgewiesen. Der Primer oAH43 wurde in der reversen Transkription eingesetzt.

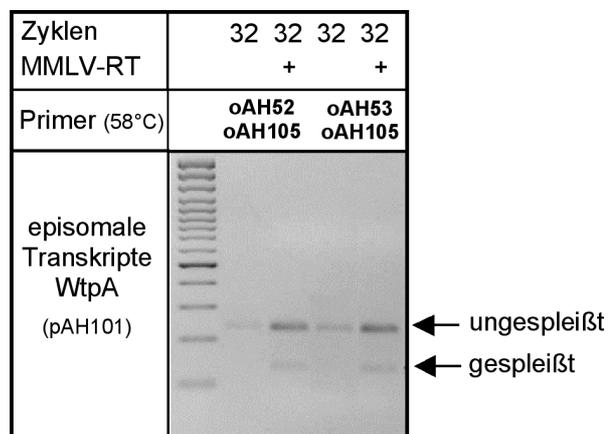


Abbildung 4.32: Episomale WtpA-Transkripte liegen primär ungespleißt vor. Zwei spleiß-unspezifischer Primerpaare wurden in der PCR eingesetzt.

Es wurden auch die V β 12-3 Transkripte des rekombinierten Allels der episomal stabilen Jurkat-Zelllinie pAH101 untersucht. Sowohl die nachgewiesenen Transkriptmengen, als auch das Verhältnis gespleißter Transkripte zu ungespleißten Transkripten entspricht den ermittelten Werten der Jurkat-Zellen ohne Episom. Das heißt, die episomalen V β 12-3 Transkripte haben keinen nachweisbaren Effekt auf die endogenen V β 12-3 Transkripte.

Somit wurden durch die Mutationsanalysen konservierter Elemente der Polyadenylierungsstellen Sequenzelemente identifiziert, die reprimierend auf die V β 12-3 Transkription in stabil replizierenden Plasmid-Vektoren wirken.

4.9 Analysen zur Interaktion von E β mit dem V β 12-3 Promoter

Die Promotoren der variablen Gensegmente des TCR β -Lokus wurden als nicht strukturierte, basale Promotoren charakterisiert, die ein ubiquitäres CRE-Element (*Creb response element*) aufweisen (Anderson, Chou et al., 1988; Anderson, Miyake et al., 1989). Spätere Analysen haben die Bedeutung des konservierten Decamer-CRE-Elementes erweitert, auf ein Dodecamer-Motiv, welches in fast allen TCR β -Promotoren konserviert ist. Dieses Dodecamer bedingt eine starke basale Transkriptionsaktivität (Deng, Sun et al., 1998). Die genaue Struktur des V β 12-3 Corepromotors (-83+11) mit seinen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurde mittels Mutationskonstrukten des Promotors in transienten Luziferase-Reporter-Analysen bereits untersucht (Haus-Seuffert, Halle et al., 1999). In der Abbildung 4.33 ist der Promotor V β 12-3 mit seinen funktionalen Elementen abgebildet.

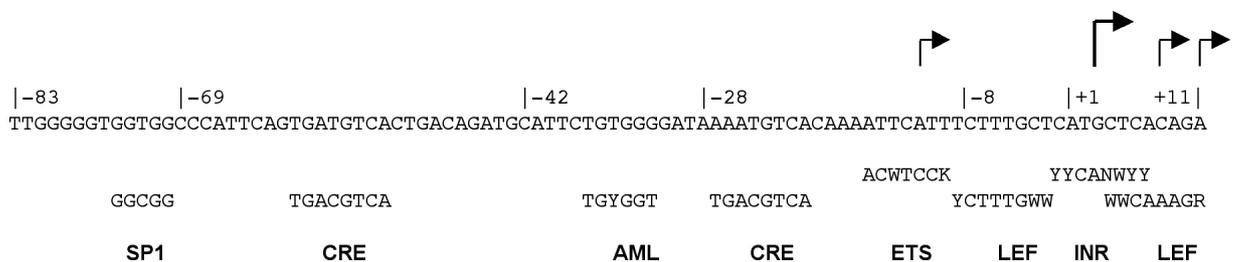


Abbildung 4.33: V β 12-3 Promotorsequenz.

Haupt- und Neben-Startstellen der Transkription sind durch Pfeile markiert. Unterhalb der putativen/nachgewiesenen Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren und dem Initiator sind die Konsensus-Bindesequenzen der regulatorischen Faktoren angegeben.

Die Bindestellen verschiedener Transkriptionsfaktoren liefern Hinweise auf eine komplexe, gewebsspezifische Regulation. Der Aufbau des distalen Enhancers E β wurde in transienten Transfektionsexperimenten und DNaseI-*footprint*-Analysen bestimmt (Gottschalk und Leiden, 1990). Fünf Protein-bindende Bereiche T β 1 bis T β 5 wurden unterschieden. Dabei sind für die volle Enhancer-Aktivität T β 2 bis T β 4 ausreichend (Leiden, 1993).

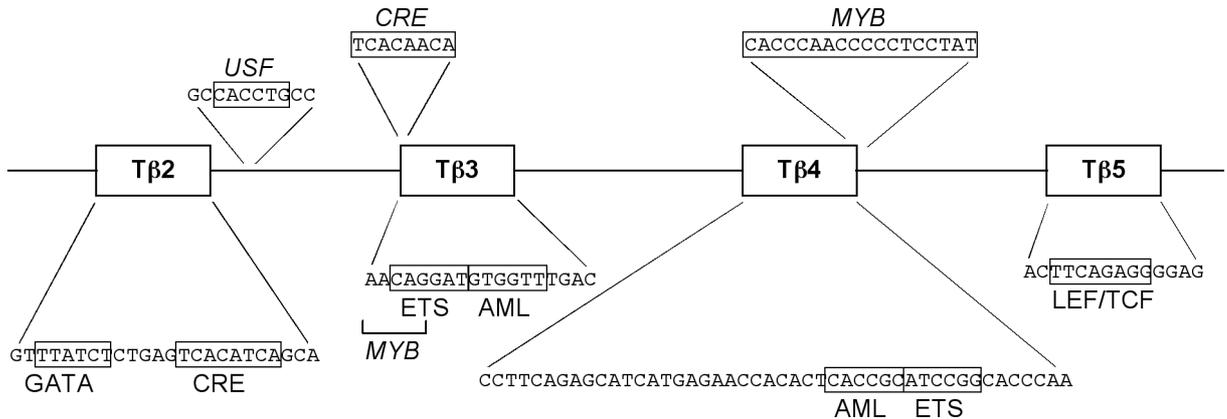


Abbildung 4.34: Aufbau von Eβ.

Der Vβ12-3 Promotor und Eβ ähneln sich in der Zusammensetzung der regulatorischen Sequenzen. Jedoch finden sich nur teilweise konservierte Motive am Promotor, während Eβ zumeist Konsensusbindestellen enthält. Im Rahmen dieser Arbeit sollten mechanistische Elemente identifiziert werden bzw. komplexe Regulationsprozesse in einfache zerlegt werden.

4.9.1 Eβ enthält sowohl aktivierende als auch reprimierende Elemente

Enhancer-Mutanten wurden in stabil replizierenden EBV-Plasmiden auf die Expression des Luziferase-Reporters getestet. Neben dem 330 bp Wildtyp-Enhancer (A) wurden fünf verschiedene Deletions- bzw. Mutationskonstrukte untersucht (Abb. 4.35; Sequenzen S.37). Das Konstrukt B weist eine Punktmutation im Bereich von Tβ5 innerhalb der LEF-Bindestelle auf. In C wurden die Elemente Tβ2 und Tβ5 deletiert. Dem Konstrukt D fehlt neben Tβ2 und Tβ5 die 3'-CRE-Bindestelle. Das Konstrukt E enthält die Myb-Bindestelle, aber die im 5'-Bereich liegende CRE-Bindestelle wurde deletiert. Das kleinste zu untersuchende Enhancer-Fragment F enthält nur noch die zwei AML- und die ETS-1-Bindestelle.

Das Konstrukt B zeigt im Vergleich zu dem Wildtyp-Konstrukt A eine geringe Reduktion der Luziferase-Reporter Transkription. Auch der PMA-Effekt ist etwas schwächer. Die Mutante C, der vier Bindestellen fehlen, zeigt eine dreifach höhere Promotorstimulierung als der Wildtyp. Der PMA-Effekt ist stark reduziert im Vergleich zu dem Wildtyp-Fragment

A. Das Deletionskonstrukt D bewirkt eine gut zweifach stärkere Transkriptionsstimulierung als das Konstrukt A. Der PMA-Effekt ist wie bei dem Fragment C 1,5-fach und somit relativ gering. Die Mutante E zeigt den höchsten Enhancer-Effekt, der 4,5-fach stärker ist als bei dem Wildtypkonstrukt. Die E β -Mutante F zeigt eine vergleichbare Transkriptionsaktivierung wie das Fragment A, jedoch ist der PMA-Effekt sehr gering.

Enhancer - Mutanten		- PMA	+ PMA
A (pSJ18)	1	1	13,3
B (pAH2)	1	0,98	10,2
C (pAH60)	93	3,07	4,5
D (pAH63)	126	2,22	3,4
E (pAH62)	126	4,46	8,5
F (pAH61)	309	1,02	1,7

Abbildung 4.35: Schematische Darstellung der E β -Mutanten.

Die Ergebnisse der Luziferase-Reporter-Analysen sind in relativen Einheiten angegeben. Die Luziferase-Expression des Wildtyp-Konstruktes A wurde gleich eins gesetzt. Die Plasmid-Vektoren der Mutanten A bis F sind aufgeführt. Die Lage der Bindungsstellen sowie die Größe der Konstrukte sind bezogen auf das Fragment A in bp angegeben.

Die Ergebnisse der Enhancer-Mutationsanalysen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die im Enhancer-Bereich T β 5 enthaltene LEF-Bindungsstelle trägt geringfügig zur Promotor-Enhancer-Wechselwirkung bei.
2. Die putative Myb-Bindungsstelle wirkt negativ auf die Promotoraktivität.
3. Besonders die terminalen Bindungsstellen von E β tragen zu dem PMA-Effekt bei (LEF, CRE, GATA).
5. Die beiden ETS- und die AML-Bindungsstellen allein vermitteln die volle Enhancer-Promotor-Wechselwirkung, aber nicht den PMA-Effekt.

5 Diskussion

5.1 Die V β 12-3 Transkripte werden effizient prozessiert

Zunächst wurden die Primärtranskripte der Gensegmente V β 11-3, V β 12-3 und V β 30 mittels qualitativer und quantitativer PCR untersucht. Im Gegensatz zu V β 11-3 und V β 12-3 konnten an V β 30 keine ungespleißten Transkripte nachgewiesen werden. Vergleichende Analysen zu den Primärtranskripten haben hingegen gezeigt, dass die ungespleißten Transkripte an V β 12-3 um den Faktor 200 abundanter sind als die an V β 11-3. Die Untersuchung der gespleißten Transkripte führte zur Bestimmung des Verhältnisses der gespleißten und ungespleißten V β 12-3 Transkripte. Dadurch wurde gezeigt, dass die V β 12-3 Transkripte vor allem in gespleißter Form vorliegen.

Globin-Gene zeigen eine ähnliche Struktur wie die Gene des T-Zell-Rezeptors, sie rekombinieren jedoch in B-Zellen statt in T-Zellen (Corcoran, 2005). Der humane β -Globin-Genkomplex wird durch eine im 5'-Bereich liegende LCR reguliert. Mittels quantitativer PCR-Analysen wurden die Transkript-Fließgleichgewichte des Lokus bestimmt (Haussecker und Proudfoot, 2005). In HeLa-Zellen wurden 100-fach mehr gespleißte als ungespleißte Transkripte am β -Globin-Promotor gemessen. Somit liegen die β -Globin Transkripte ebenfalls primär gespleißt vor. Eine Erklärung dafür ergibt sich aus der starken Kopplung der Transkription mit der Prozessierung (Calvo und Manley, 2003). So wurde in der Literatur die Beladung der zunächst an der CTD der Pol II befindlichen Prozessierungsfaktoren auf naszierende Transkripte beschrieben, was die Kooperativität von Transkription und Prozessierung belegt (Aguilera, 2005).

Der Vergleich der Transkript-Gesamtmenge an V β 11-3 und V β 12-3 unter Nichtberücksichtigung des Prozessierungsgrades hat ergeben, dass die Anzahl der V β 12-3 Transkripte mindestens 3000-fach höher ist, als die Transkript-Gesamtmenge an V β 11-3. Die Interaktion von E β mit seinem V β 12-3 Zielpromotor führt zu einer starken Transkription an diesem Gensegment. Unabhängig von der Transkriptmenge an V β 11-3 und V β 12-3, konnten keine gespleißten Transkripte an nicht rekombinierten Gensegmenten nachgewiesen werden. Unter der Annahme gleicher Spleißeffizienz wären 5×10^6 gespleißte

Transkripte an V β 11-3 detektiert worden. Gespleißte V β 11-3 Transkripte waren jedoch nicht nachweisbar. Somit unterscheidet sich das funktionale Gensegment V β 12-3 von den nicht rekombinierten Gensegmenten nicht nur durch die Anzahl der Primärtranskripte, sondern auch durch eine effiziente Transkript-Prozessierung.

5.2 Vergleichbare Stabilität der V β 11-3 und V β 12-3 Primärtranskripte

V β 11-3 und V β 12-3 ähneln sich in der Sequenz. Möglicherweise werden an V β 12-3 nicht nur mehr Transkripte generiert, sondern die Transkripte infolge der Prozessierung auch besser stabilisiert. Das V β 11-3 Gensegment hat zwar ein erstes Intron, besitzt aber keine definierten Elemente im 3'-Bereich, wie z.B. ein funktionales polyA-Element. Außerdem fehlt dem zweiten variablen Exon aufgrund der nicht erfolgten V(D)J-Rekombination das 3'-Spleißsignal. Das könnte ein Grund für eine erhöhte Instabilität der Transkripte sein (Anderson, 2005). Deswegen wurden Analysen zur Stabilität der Transkripte durchgeführt. Mittels quantitativer PCR können jedoch nur Transkript-Fließgleichgewichte ermittelt werden, wobei keine Aussagen zur Transkriptionsrate und zur Prozessierung gemacht werden können. Deswegen wurde durch Transkriptanalysen mit Emetin bzw. Actinomycin D untersucht, ob die unterschiedliche Transkriptmenge von V β 12-3 und V β 11-3 das Ergebnis von RNA-Abbau bzw. unterschiedlicher RNA-Stabilität ist. Dabei wurde gezeigt, dass der NMD und der *non-stop-decay* nicht am Abbau von V β 11-3 Transkripten beteiligt sind und die V β 11-3, V β 12-3 Primärtranskripte vergleichbare Stabilität zeigen. Somit unterscheiden sich die Primärtranskripte der untersuchten Gensegmente in den durchgeführten Analysen nicht voneinander, obwohl ausschließlich V β 12-3 Transkripte gespleißt werden.

5.3 V β 12-3 Transkripte innerhalb des ORFs zeigen unterschiedliche Abundanz

Mehrere Primerpaare wurden in der reverser Transkription und in der quantitativen PCR zur Untersuchung des V β 12-3 ORFs eingesetzt. Dabei wurde gezeigt, dass die kodierenden Transkripte innerhalb des V β 12-3 ORFs unterschiedlich abundant sind. Die Anzahl der Transkripte im Bereich der Exone eins und zwei liegen um den Faktor 15 niedriger, als die

detektierten Transkripte stromabwärts des zweiten variablen Exons (Abb. 4.17). In ChIP-Analysen zur Kartierung von Prozessierungsfaktoren in Säugergenen wurde gezeigt, dass einige Prozessierungsfaktoren, wie zum Beispiel PTBP1 und CSTF2, besonders an internen Exonen hohe Besetzung zeigen (Swinburne, Meyer et al., 2006). In weiteren Analysen wurde die Bedeutung dieser beiden Faktoren für die Pausierung von Transkriptionskomplexen an Exonen demonstriert. Außerdem ist bekannt, dass RNA-Prozessierungsfaktoren die Rate der Elongation verändern können (Proudfoot, 2003; Ujvari und Luse, 2004). Möglich ist, dass im 3'-Bereich des zweiten variablen Exons Prozessierungsfaktoren binden, die zur Pausierung der Transkription in diesem Bereich führen. Dabei sind die Transkription und die Prozessierung innerhalb der Elongationsphase stark miteinander verknüpft (Howe, Kane et al., 2003) (Lindstrom, Squazzo et al., 2003). Die Kopplung der Transkription mit dem Spleißen kann dazu führen, dass infolge der Pausierung der Transkriptionsmaschine die Spleißreaktion an naszierender RNA gestoppt wird. Infolge der kotranskriptionalen Prozessierung würde somit das erste Exon schnell gespleißt werden, während die Spleißreaktion des zweiten Exons mehr Zeit benötigen würde. Das würde zur Anreicherung partiell gespleißter RNA-Moleküle (Spleißzwischenprodukte) führen. Das könnte die hohe Anzahl ungespleißter Transkripte im Bereich des V(D)J-Rekombinationsortes, innerhalb des V β 12-3 ORFs, erklären. Durch weiterführende Analysen zur Bindung von Faktoren an dem V(D)J-Rekombinationsort kann die Bedeutung dieses DNA Bereiches weiter untersucht werden. Dabei könnten *run-on* Experimente durchgeführt werden, um eine putativ pausierende Polymerase zu untersuchen.

5.4 Am TCR β -Lokus sind *sense* und *antisense* Transkripte nachweisbar

Durch den Einsatz spezifischer Primer in den Transkriptanalysen konnte gezeigt werden, dass neben kodierenden Transkripten des oberen DNA-Stranges (*sense*) auch nicht kodierende Transkripte des Gegenstranges (*antisense*) am TCR β -Lokus existieren. Dabei wurde im gesamten V β 12-3 ORF *antisense* RNA nachgewiesen. Die Anzahl der gemessenen V β 12-3 *antisense* Transkripte ist jedoch deutlich niedriger als die der *sense* Transkripte. Das steht im Gegensatz zu den Beobachtungen an den Gensegmenten V β 11-3 und V β 30. Im Bereich nicht rekombinierter Gensegmente war die Anzahl der *antisense* Transkripte mindestens so hoch wie die der *sense* Transkripte (Abb. 5.1).

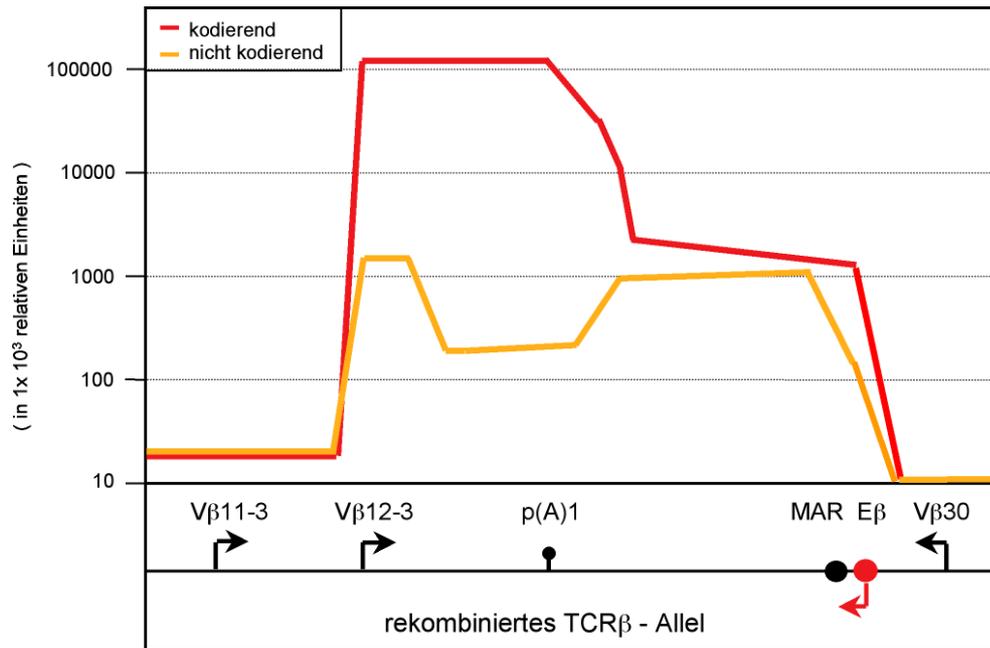


Abbildung 5.1: Kodierende und nicht kodierende Transkripte des rekombinierten TCR β -Allels. Die Anzahl der Transkripte (ungespleißte und gespleißte) ist in relativen Einheiten angegeben (log. Skalierung). Aufgrund der inversen Orientierung von V β 30 stammen kodierende Transkripte stromabwärts von E β vom unteren DNA-Strang.

5.4.1 E β als Promotor von *antisense* Transkripten

Die Transkriptanalysen haben gezeigt, dass im Bereich von E β *antisense* Transkripte gebildet werden (Abb. 4.16). Diese Transkripte sind Pol II abhängig. Dabei spiegelt E β die Transkriptionsfaktor-Bindestellen des V β 12-3 Promotors (Gottschalk und Leiden, 1990) und wurde als Promotor der Keimbahn beschrieben (Spicuglia, Kumar et al., 2002). Auch nach der Rekombination des Allels zeigt E β Promotorfunktion. Jedoch nehmen die *antisense* Transkripte in 5'-Richtung nicht kontinuierlich ab, sodass neben E β möglicherweise weitere *antisense* Promotoren im Locus vorliegen (Abb. 4.17). Im Unterschied zu den *sense* Transkripten des Locus, zeigen die E β Transkripte jedoch relativ geringe Stabilität. Naszierende Transkripte werden durch verschiedene Faktoren der Prozessierung gebunden, die zur Bildung eines exportfähigen hnRNPs beitragen (Berg, 2003). Da die *antisense* Transkripte nicht kodierend sind, unterscheidet sich die Besetzung RNA-bindender Proteine von den *sense* Transkripten. Das erklärt die geringere Stabilität dieser Transkripte.

5.4.2 Die Funktion von *antisense* Transkripten am TCR β -Lokus

Mittels *Micro-Array*- und RT-PCR-Analysen wurden bisher in verschiedenen Pflanzen- und Tiergenomen *antisense* Transkripte nachgewiesen. Dabei wurde gezeigt, dass *antisense* Transkripte sowohl die Regulation der Transkription, als auch posttranskriptionale Mechanismen beeinflussen können (Lavorgna, Dahary et al., 2004; Munroe und Zhu, 2006). Die Funktion von *antisense* Transkripten bei der Regulation der Genexpression ist Gegenstand intensiver Forschung (Lapidot und Pilpel, 2006). Dadurch beschreiben unterschiedliche Modelle die Funktion dieser Transkripte. So können überlappende Transkripte in *sense* und *antisense* im Wettbewerb um Transkriptionsfaktoren stehen, was zu einer negativen Korrelation der Expression dieser Transkripte führen kann. Hinweise darauf kommen von Studien zu den *Imprinting* Promotoren Igf2R und Air, welche die gleichen *cis*-regulatorischen Elemente nutzen (Pauler, Stricker et al., 2005). Mechanismen die auf der Konkurrenz um Transkriptionsfaktoren beruhen scheinen am TCR β -Lokus keine Rolle zu spielen. Denn im Bereich von E β werden *antisense* Transkripte gebildet, E β verstärkt aber gleichzeitig die Transkription seines V β 12-3 Zielpromotors.

In bestimmten Fällen können *antisense* Transkripte auch die Regulation der Transkription vermitteln (Munroe und Zhu, 2006). Grundlage hierfür sind epigenetische Veränderungen des Chromatins, hervorgerufen durch RNA-Duplex-Strukturen infolge von *sense/antisense* Transkripten (Bernstein und Allis, 2005). Dabei wird die heteroduplex RNA durch RNA editierende Enzyme erkannt und modifiziert (Volpe, Kidner et al., 2002). In der Folge kann editierte dsRNA verschiedene Proteine, wie zum Beispiel Vigilin rekrutieren. Vigilin kann mittels HP1 Phosphorylierung heterochromatische Strukturen induzieren, die repressiv auf die Transkription wirken (Wang, Zhang et al., 2005). Die Analyse der Histon-Modifikationen nicht rekombinierter Gensegmente des TCR β -Lokus haben partielle euchromatischen Eigenschaften gezeigt, die auch durch die Bildung von Transkripten an V β 11-3 gespiegelt werden. Außerdem wurden im V β 12-3 ORF mehr *antisense* Transkripte als an den benachbarten Gensegmenten nachgewiesen. Somit scheinen die *antisense* Transkripte am TCR β -Lokus nicht infolge von Duplex-Strukturen epigenetische Veränderungen hervorzurufen, die die Regulation der Transkription beeinflussen.

Ein anderes Modell beschreibt die transkriptionelle Regulation durch aktive *antisense* Transkription ohne eine direkte Beteiligung der *antisense* RNA (Munroe und Zhu, 2006). Denn konkurrierende Transkription des Gegenstranges kann topologische Veränderungen

der DNA induzieren, was zur Reprimierung der Transkription führt (Tsao, Wu et al., 1989). Analysen zur Rekombination des TCR β -Lokus haben gezeigt, dass E β durch *antisense* Transkripte den Locus öffnet und ihn somit für Rekombinationsfaktoren zugänglich macht (Spicuglia, Kumar et al., 2002). Außerdem zeigen Orte sehr hoher Transkription, wie der V β 12-3 ORF, auch die höchsten Raten an *antisense* RNA (Abb. 5.1). Somit liegt am TCR β -Lokus keine negative Korrelation der komplementären Transkripte infolge topologischer DNA-Veränderungen vor.

In Analysen zu RNA-Duplex-Strukturen wurde gezeigt, dass diese Strukturen Faktoren rekrutieren können, welche die Transkription der beteiligten *sense/antisense* Transkripte verändern. Dabei verstärkt die *antisense* RNA die Produktion von siRNA, was zu einer Spaltung homologer Transkripte führt (Wang, Gaasterland et al., 2005). Die Bildung von siRNA aus natürlichen *antisense* Transkripten ist jedoch bisher ausschließlich in *Arabidopsis thaliana* und nicht für humane Zellen beschrieben wurden.

Ein weiteres Modell zur Funktion von *antisense* Transkripten beschreibt ebenfalls die Bildung von RNA-Duplexen. Dabei wirkt die *antisense* RNA posttranskriptional durch die Bildung von eins-zu-eins Komplexen mit den komplementären RNA-Molekülen. Dadurch wird eine Maskierung der *sense* Transkripte bezüglich Spleiß-, Export- und Stabilitätsfaktoren angenommen (Hastings, Ingle et al., 2000; Lazar, 1990). Infolge dessen wird die Prozessierung nicht kodierender Transkripte verhindert. Auch wird die Maskierung von Bindestellen diskutiert, was zu einer negativen Rückkopplung auf die Transkription führt (Lavorgna, Dahary et al., 2004). An den drei untersuchten Gensegmenten des TCR β -Lokus wurden *antisense* Transkripte nachgewiesen. Dabei sind nur die V β 12-3 *sense* Transkripte um Größenordnungen abundanter als die komplementären Transkripte des Gegenstranges (Abb. 5.1). Somit könnte RNA-Duplexbildung an den Gensegmenten V β 11-3 und V β 30 zur Maskierung der *sense* Transkripte führen. Das würde erklären, warum an diesen Gensegmenten keine gespleißten Transkripte detektiert werden konnten.

5.5 Die Besetzung der RNA Polymerase II an V β 11-3, V β 12-3 und V β 30 spiegelt die Transkript-Fließgleichgewichte

Die Besetzung des TCR β -Lokus mit der Pol II wurde an beiden Allelen mittels CHIP-Analysen untersucht. Dabei spiegelt die Besetzung der Pol II am rekombinierten Locus die

Ergebnisse der Transkriptanalysen. Im Bereich zwischen V β 12-3 und E β , wo hohe Transkriptmengen gemessen wurden, zeigt sich auch eine relative hohe Besetzung mit Transkriptionskomplexen (Abb. 4.26). Stromaufwärts von V β 12-3 und stromabwärts von E β wurde die Pol II nur im Bereich der Nachweisgrenze detektiert, was mit einer geringen Anzahl von Transkripten an diesen Gensegmenten einhergeht. Am V β 12-3 Promotor und im ORF wurden nur mittelhohe Pol II Besetzungsraten gemessen. Durch ChIP-Analysen werden Faktoren bzw. Komplexe an der DNA zum Zeitpunkt der Chromatinvernetzung detektiert. Hoch prozessiv transkribierende Pol II gleitet jedoch mit hoher Geschwindigkeit den DNA-Strang entlang (Berg, 2003). Somit wird die Pol II nicht an einem singulärem Ort innerhalb des ORFs vernetzt, sondern entsprechend der statistischen Verteilung während der Transkription. Das erklärt die relativ geringe Detektion der Pol II an V β 12-3 in den ChIP-Analysen.

Die Maxima der Pol II Besetzung wurden an D β 2 des rekombinierten Allels und pD β 1 des inaktiven Allels gemessen. Das Element pD β 1 wurde bereits als Promotor des Keimzellstadiums beschrieben (Spicuglia, Kumar et al., 2002). Die Pol II Besetzung an D β 2 könnte ebenfalls auf eine Promotorfunktion dieses Elementes hinweisen. Außerdem könnte die Pol II Besetzung an pD β 1 und D β 2 Hinweise auf eine pausierende Polymerase geben. Eine pausierende Pol II ist meistens auf einen Stop innerhalb der Elongationsphase der Transkription zurückzuführen (Gnatt, 2002). Dabei werden zwei Arten von DNA-Sequenzspezifischer Pausierung der Pol II unterschieden. Sowohl Haarnadel-Strukturen der transkribierenden RNA, als auch die Bildung thermodynamisch instabiler RNA-DNA-Hybride kann zur Pausierung der Polymerase führen (von Hippel, 2006).

An E β wurde eine hohe Pol II Besetzung gemessen, die ebenso wie die *antisense* Transkripte in 5'-Richtung abnimmt. Analysen zum humanen β -Globin-Gen zeigen ebenfalls eine hohe Pol II Besetzung an der LCR des Locus (Kim, Kiefer et al., 2006). Genomweiten ChIP-chip-Analysen zufolge sind nur einige Enhancer mit der Pol II besetzt. Diese Besetzung ist jedoch geringer als die der Promotoren (Heintzman, Stuart et al., 2007). Am V β 12.3 Promotor wurde hingegen weniger Pol II als an E β gemessen. Die PMA Behandlung der Jurkat-Zellen führte zu einer leichten Erhöhung der Pol II Besetzung. Die höhere Besetzung mit Transkriptionskomplexen infolge der PMA Behandlung könnte die beschriebene Transkriptionaktivierung episomaler Luziferase-Reporter erklären.

5.6 Die Histon H3 Besetzung und H3 Methylierung am TCR β -Lokus

Offenes Chromatin ist die Voraussetzung für die transkriptionale Aktivität von Promotoren (Turner, 2002). Die K4 Di- und Trimethylierung aminoterminaler Histon-Schwänze zeigt typischerweise Maxima im 5'-Bereich aktiver Gene, wobei die Dimethylierung ebenso an inaktiven, aber potentiell aktiven Genen dedektiert worden ist (Bernstein, Humphrey et al., 2002). Die durchgeführten Analysen beziehen sich auf das rekombinierte und auf das nicht rekombinierte TCR β -Allel.

5.6.1 Die Histon H3 Besetzung

Beide TCR β -Allele zeigen Orte niedriger und hoher Histon-Besetzung. Im untersuchten Bereich des rekombinierten Allels wurde an drei Stellen geringe H3 Besetzung gemessen: im 5'-Bereich des V β 12-3 Promotors, an D β 2 und E β (Abb. 4.25). In ChIP- und *Micro-Array*-Analysen (ChIP-chip) wurden humane Promotoren und Enhancer-Elemente auf charakteristische Merkmale des Chromatins untersucht (Heintzman, Stuart et al., 2007). Dabei wurde gezeigt, dass geringe Histon-Besetzung von Promotoren mit einer hohen transkriptionellen Aktivität einhergeht. Stark transkribierte Promotoren sind dementsprechend frei von Nukleosomen. Mittels Transkriptanalysen wurde gezeigt, dass der V β 12-3 Promotor im Gegensatz zu den Promotoren V β 11-3 und V β 30 stark transkribiert wird. Dieses Ergebnis wird durch die geringe H3 Besetzung gespiegelt. An V β 30 konnten im Gegensatz zu V β 11-3 keine Transkripte des oberen Stranges detektiert werden. Die H3 Besetzung an V β 30 ist etwas höher als an V β 11-3. Auch Enhancer zeigen ChIP-chip-Analysen zufolge ebenso wie Promotoren eine starke Abreicherung von Histonen (Heintzman, Stuart et al., 2007). An E β wurde nur eine sehr geringe H3 Besetzung detektiert. Modelle beschreiben Enhancer als Zentren der Assemblierung des Präinitiationskomplexes (PIC), die nach der Bindung von Pol II und weiteren Aktivatoren den GTF-Pol II Komplex auf den Zielpromotor übertragen (Szutorisz, Dillon et al., 2005). Die H3 Minima an V β 12-3 und E β entsprechen der Bindung von Transkriptionskomplexen und Faktoren der Enhancer-Promotor-Wechselwirkung in diesen Bereichen. Sie stehen im Einklang mit Modellen der Enhancer-Promotor-Interaktion. Geringe H3 Besetzung wurde auch stromabwärts des V β 12-3 ORFs an D β 2 bestimmt. Möglicherweise binden dort

ebenfalls Faktoren an die DNA. Auch Wechselwirkungen von E β und D β 2 sind möglich und würden die geringe H3 Besetzung an D β 2 erklären.

Das nicht rekombinierte Allel zeigt in den Promotorbereichen verschiedener Gensegmente eine relativ hohe H3 Besetzung. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Transkriptanalysen, wonach an V β 12-3 des inaktiven Allels keine Transkripte detektiert werden konnten. Der Promotor pD β 1 der Keimbahn (Spicuglia, Kumar et al., 2002) zeigt geringe H3 Besetzung, die mit einer geringen Transkriptmenge einhergeht.

5.6.2 Die H3K4 Dimethylierung

Im gesamten Bereich des rekombinierten V β 12-3 Allels konnte H3K4 Dimethylierung unterschiedlicher Stärke nachgewiesen werden (Abb. 5.2).

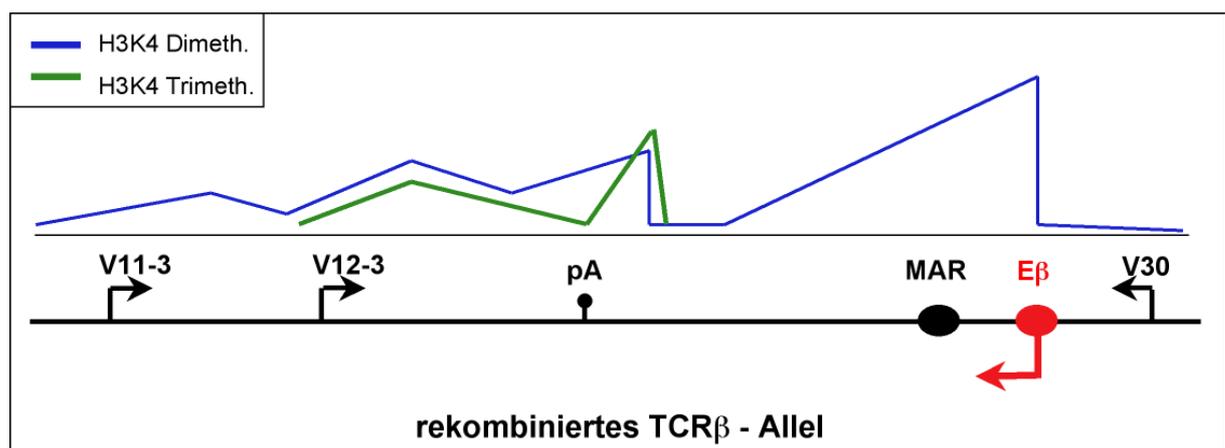


Abb. 5.2: H3K4 Di- und Trimethylierung am rekombinierten TCR β -Allel.

Das Maximum der H3K4 Dimethylierung wurde an E β detektiert. Die Dimethylierung zeigt dabei einen Anstieg von einem Minimum stromaufwärts des MAR-Elementes in Richtung E β . H3K4 Dimethylierung ist charakteristisch für humane Enhancer-Elemente (Heintzman, Stuart et al., 2007). Der TCR β -Lokus zeigt auch im 3'-Bereich des zweiten variablen Exons, am V(D)J-Rekombinationsort, ein hohes H3K4 Dimethylierungssignal. Ähnlich sind die Verhältnisse am humanen β -Globin-Lokus, wo ein Maximum der H3K4 Dimethylierung ebenfalls im Bereich des zweiten und dritten Exons des hochexprimierten γ -Globin ORFs detektiert wurde (Kim, Kiefer et al., 2006).

In der Literatur wird eine bimodale Verteilung (Minimum umgeben von zwei Maxima) der Histon-Modifikationen an aktiven Promotoren infolge Nukleosomen-freier Transkriptionsstartstellen beschrieben (Heintzman, Stuart et al., 2007). Der V β 12-3 Promotor zeigt eine moderate H3K4 Dimethylierung bimodaler Verteilung (Abb. 4.25 und Abb 5.2). Das heißt, stromaufwärts und stromabwärts der Transkriptionsstartstellen ist Dimethylierung nachweisbar, während ein Minimum der Dimethylierung im Bereich der Transkriptionsstartstellen zu beobachten ist. Nicht rekombinierte Gensegmente stromaufwärts von V β 12-3 zeigen eine geringe bis mittlere Dimethylierungsrate, was auf potentiell transkriptionsaktives Chromatin hinweist. Die Transkripte des V β 11-3 Gensegmentes spiegeln diesen Chromatinstatus. V β 30 zeigt geringere H3K4 Dimethylierung als V β 11-3. Auch dieses Ergebnis reflektiert die Resultate der Transkriptanalysen. Am nicht rekombinierten Allel wurde H3K4 Dimethylierung allein am Keimbahnpromotor pD β 1 gemessen.

5.6.3 Die H3K4 Trimethylierung

Die ermittelten Raten der H3K4 Trimethylierung sind geringer als die der Dimethylierung am TCR β -Lokus (Abb. 5.2). Aber die Verteilungsmuster der Di- und Trimethylierung ähneln sich. Jedoch wurde zwischen J β 2 und V β 30 sowie stromaufwärts von V β 12-3 Trimethylierung nur im Bereich der Nachweisgrenze detektiert. Auch am humanen β -Globin-Lokus ist die H3K4 Trimethylierung im Bereich des hoch transkribierten γ -Globin ORFs niedriger, als die K4 Dimethylierung. Außerhalb dieser Region ist die H3K4 Trimethylierung im Gegensatz zur Dimethylierung kaum nachweisbar (Kim, Kiefer et al., 2006). Somit ähnelt der TCR β -Lokus dem β -Globin-Gen in dem Verteilungsmuster der H3K4 Di- und Trimethylierung.

In humanen Zellen und in Hefe zeigen Bereiche aktiver Promotoren starke H3K4 Trimethylierung (Kouskouti und Talianidis, 2005; Pokholok, Harbison et al., 2005). Hohe H3K4 Trimethylierung ist im V β 12-3 ORF besonders am V(D)J-Rekombinationsort gemessen worden (Abb. 5.2) und geht einher mit einer hohen Anzahl ungespleißter Transkripte in diesem Bereich. Am Rekombinationsort könnten Faktoren der Transkription bzw. Prozessierung binden. Erste Analysen zur Besetzung von Prozessierungsfaktoren am TCR β -Lokus zeigen eine hohe Besetzung von CSTF2, HNRPF und SR-Proteinen am V β 12-3 Promotor. Der Spleißfaktor HNRPF wurde außerdem verstärkt am Rekombinationsort nachgewiesen. Die Bedeutung und Funktion eines putativen

Regulationselementes am V(D)J-Rekombinationsort kann jedoch derzeit nicht eingeordnet werden.

Im Gegensatz zur H3K4 Dimethylierung ist an E β keine Trimethylierung nachweisbar. Das stimmt überein mit ChIP-chip-Analysen humaner Enhancer-Elemente (Heintzman, Stuart et al., 2007). H3K4 Trimethylierung wurde vor allem im Bereich transkribierter Gene beschrieben (Ng, Robert et al., 2003). Die Unterschiede der H3K4 Di- und Trimethylierung reflektieren, dass im Gegensatz zu dem stark transkribierten V β 12-3 Promotor, an E β relativ geringe Mengen *antisense* Transkripte gebildet werden.

5.7 Insulator-Elemente begrenzen nicht das funktionale Gensegment

Enhancer sind regulatorische DNA-Elemente die unerwünschte Wechselwirkungen zweier angrenzender Chromatin Domänen verhindern können. Dabei unterscheidet man Enhancer, welche Promotor-Enhancer-Wechselwirkungen blockieren, von denen, die eine Art Barriere gegen sich ausbreitendes Heterochromatin bilden (Gaszner und Felsenfeld, 2006). Manche Insulatoren besitzen sowohl die Enhancer-blockierende Aktivität, als auch die Barriere-Aktivität.

Mittels ChIP-chip-Analysen wurden im humanen Genom CTCF-Bindestellen bekannter Insulatoren bestätigt und mehr als 13.000 neue CTCF-Bindungsstellen potentieller Insulatoren bestimmt (Kim, Abdullaev et al., 2007). Die chromosomale Verteilung dieser Bindestellen korreliert stark mit Genen. Aber es wurden auch CTCF-Bindestellen zwischen Genen und innerhalb von Genen gefunden. Die meisten CTCF-Bindestellen zeigen dabei ein spezifisches CTCF-Konsensusmotiv (HCDSNAGRKGG), welches dem Konsensus von Yusufzai und Felsenfeld ähnelt (Yusufzai und Felsenfeld, 2004). Jedoch haben 18 % der bereits bekannten *in vivo* CTCF-Bindestellen nicht das neue CTCF-Konsensusmotiv (Kim, Abdullaev et al., 2007). Vierzehn putative Bindestellen wurden aufgrund des neuen Konsensusmotives im TCR β -Lokus beschrieben (Kim, Abdullaev et al., 2007). Deswegen wird die Trennung alternativer Promotoren durch CTCF-abhängige Insulatoren auch für die T-Zell-Rezeptor Gene diskutiert. Eine putative Bindestelle befindet sich dabei zwischen V β 11-3 und V β 12-3, 1756 bp stromaufwärts des V β 12-3 Promotors. Sie liegt damit innerhalb des Fragmentes B, welches im Insulator-Testsystem untersucht wurde (Abb. 4.22). Zwei weitere putative CTCF-Bindestellen liegen zwischen E β und V β 30. Eine

grenzt direkt an den 3'-Bereich des 330 bp Enhancers, eine weitere befindet sich 43 bp stromaufwärts des 2. Exons von V β 30.

Ob Insulator-Elemente eine Rolle bei der TCR β -Genregulation spielen, wurde mittels stabil replizierender Plasmid-Vektoren und Luziferase-Reporter-Analysen untersucht. Hinweise auf ein Insulator-Element zwischen V β 11-3 und V β 12-3 bzw. zwischen V β 12-3 und V β 30 wurden nicht gefunden. Die getesteten intergenischen DNA-Konstrukte zeigten vielmehr Transkriptionsaktivierung. Diese Transkriptionsaktivierung war ohne PMA-Behandlung stärker, als der durch E β vermittelte Enhancer-Effekt. Möglicherweise sind die stromaufwärts von V β 12-3 liegenden DNA-Fragmente A und B in der Lage Faktoren zu binden, die die Transkription des Luziferase-Reporters verstärken. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von E β wurde die Transkriptionsaktivierung von A und B stark reduziert. Diese Reprimierung könnte durch die Aktivität von E β und seiner gebundenen Faktoren erklärt werden. Ob die in dieser Arbeit beschriebenen reprimierenden Transkriptionsfaktorbindenden Bereiche von E β (Myb) daran beteiligt sind, ist nicht geklärt. Die untersuchten DNA-Elemente zwischen V β 12-3 und E β haben eine stärkere Reporter-Expression bewirkt, als die Fragmente A und B. Möglicherweise können diese Elemente verschiedene aktivierende Faktoren binden, was auch durch die offenen Chromatinstrukturen im rekombinierten Allel gespiegelt ist (H3K4 Dimeth.; Abb. 5.2).

Insulatoren sind in der Lage unterschiedliche Chromatinbereiche im Bezug auf ihre Histon-Modifikation zu etablieren und aufrechtzuerhalten (Cuvier, Hart et al., 2002). DNA-Bereiche mit Übergängen von transkriptionsaktivem und repressiven Chromatin können somit auf einen Insulator hinweisen (Bell und Felsenfeld, 1999). Die untersuchten Histon-Modifikationen im TCR β -Lokus geben jedoch keinen Hinweis auf Insulator-Elemente und bestätigen somit die Ergebnisse der Insulator-Analysen. Insulatoren wirken durch die Bildung spezieller Chromatinstrukturen und Chromatinschleifen (Bulger und Groudine, 1999) (Yusufzai und Felsenfeld, 2004). Es ist möglich, dass die im EBV-System untersuchten Elemente des TCR β -Lokus eine abweichende Chromatinstruktur gegenüber dem rekombinierten TCR β -Allel aufweisen. Im Gegensatz zum Hühner- β -Globin-Insulator können diese Unterschiede die Funktion putativer Insulatoren des TCR β -Lokus beeinträchtigt haben.

5.8 Funktionelle Analyse konservierter Elemente der TCR β -Polyadenylierungsstellen

Mittels Transkriptanalysen episomaler EBV-Plasmid-Vektoren wurden Sequenzelemente der TCR β -Polyadenylierungsstellen untersucht. Dabei zeigten drei zuvor identifizierte konservierte Sequenzelemente der ersten und zweiten polyA-Region einen negativen Einfluß auf die Transkripte des Episoms (Abb. 4.30). Das AAUAAA-Motiv, welches fast alle polyadenylierten Transkripte tierischer Zellen zeigen, ist essentiell für die Spaltung und Polyadenylierung (Wahle und Keller, 1992). Die Mutation dieses Hexanukleotides führte in den Mutationsanalysen zu einer starken Reduktion der episomalen Transkripte und demonstriert damit die beschriebene Bedeutung für die Prozessierung naszierender Transkripte. Das konservierte Element 1 der TCR β polyA-Region befindet sich direkt stromaufwärts des AAUAAA-Motives. Das untersuchte Mutationskonstrukt führte zu einem Anstieg der Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt. In der Literatur sind weitere Sequenzen stromaufwärts und stromabwärts des AAUAAA-Motives beschrieben, welche regulatorische Faktoren rekrutieren und das AAUAAA-Motiv in einer offenen, zugänglichen Struktur halten (Zhao, Hyman et al., 1999). Eine der stromaufwärts liegenden Hilfssequenzen ist das USE-Element, welches charakteristisch für virale und einige zelluläre Transkripte ist (Moreira, Takagaki et al., 1998). Im Unterschied zum Mutationskonstrukt 1 wirken USE-Elemente jedoch positiv auf die Prozessierung von Transkripten und sollten zu einer Steigerung episomaler Transkripte führen. Ein Sequenz-Element stromaufwärts des AAUAAA-Motives, welches negativ auf naszierende Transkripte wirkt, ist bislang noch nicht beschrieben wurden.

Ungefähr 30 Nukleotide stromabwärts des für die Spaltung der Transkripte notwendigen CA-Dinukleotides, befinden sich die DSEs der Polyadenylierung. Sie sind nur schwach konserviert und häufig U/GU-reich (Zhao, Hyman et al., 1999). Mutationen und Deletionen der DSEs zeigen dementsprechend nur schwache Effekte, können jedoch die Stelle der Spaltung und die Effizienz der Spaltung beeinflussen (Zhao, Hyman et al., 1999). Die untersuchten konservierten Elemente 2 und 3 liegen einige Basen stromaufwärts typischer DSE-Positionen. Auch enthält nur das zweite konservierte Element zwei GT-Dinukleotide. Im Gegensatz zu DSE-Elementen wirken die untersuchten Elemente 2 und 3, ebenso wie das Mutationskonstrukt 1, negativ auf die Anzahl episomaler Transkripte. Somit zeigen die Elemente 2 und 3 nicht die Wirkweise von DSE-Elementen.

Die Transkription naszierender RNA geht einher mit der Prozessierung von Transkripten. Aufgrund der Kombinatorik der Prozessierungsmechanismen kann die negative Wirkung der konservierten Elemente auf die episomalen Transkript-Fließgleichgewichte bislang nicht eingeordnet werden. Jedoch wurden erstmalig in einer funktionellen Analyse Sequenz-Elemente beschrieben, die negativ auf die entstehenden Transkripte wirken. Diese neuartigen Elemente humaner polyA-Regionen binden wahrscheinlich Faktoren, welche negativ die Transkription und/oder die Prozessierung von Transkripten beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine weiteren Analysen zu diesen Faktoren durchgeführt. Zukünftige Arbeiten könnten Ergebnisse liefern zur Bestimmung und zur funktionellen Analyse der bindenden Faktoren. In den Analysen zu den konservierten Elementen der polyA-Region wurde der Einfluß dieser Elemente auf ungespleißte Transkripte episomaler EBV-Plasmid-Vektoren untersucht. Der Einfluß auf gespleißte Transkripte konnte jedoch nicht untersucht werden, da nur eine sehr geringe Anzahl gespleißter Transkripte nachgewiesen werden konnte. Der episodale EBV-Plasmid-Vektor kann in weiterführenden Analysen um weitere Elemente des V β 12-3 ORFs erweitert werden, um auch die Wirkung der untersuchten Fragmente auf gespleißte Transkripte zu untersuchen.

5.8.1 Episomale Transkripte werden nur ineffizient gespleißt

Die V β 12-3 Transkripte des rekombinierten Allels werden sehr effizient prozessiert und liegen primär in der gespleißten Form vor. Im Gegensatz dazu wurden fast ausschließlich ungespleißte episodale V β 12-3 Transkripte nachgewiesen. Gespleißte Transkripte konnten nur im Bereich der Nachweisgrenze detektiert werden. Das zeigt, dass das Spleißen dieser Transkripte möglich ist, jedoch nur sehr ineffizient erfolgt. Den episomalen Transkripten fehlen Elemente stromabwärts des zweiten variablen Exons. Fraglich ist, welche Elemente für das effiziente Spleißen notwendig sind. Durch Deletionen verschiedener Introne bzw. Intronkombinationen des Triosephosphat-Isomerase-Gens (TPI) wurde gezeigt, dass nicht alle Introne gleichermaßen zur Prozessierung von Transkripten beitragen. In dem Fall des TPI ORFs, kommt dem letzten von sechs Intronen eine Sonderrolle zu, welches bei der 3'-Prozessierung der Transkripte benötigt wird (Nesic, Cheng et al., 1993). Auch wurden intronische und exonische Spleiß-Enhancer (ESE) beschrieben, die Sequenz-Bereiche von 4-18 bp umfassen (Fairbrother, Yeh et al., 2002). Mehrere hundert exonische Spleiß-Enhancer konnten bisher identifiziert werden, die jedoch in Abhängigkeit von ihrer Position

im Exon, entweder als Spleiß-Enhancer oder als Spleiß-Silencer fungieren (Goren, Ram et al., 2006). Durch Sequenzanalysen und weiterführende *in vivo* Experimente wurden zehn Motive exonischen Spleiß-Enhancern zugeordnet (Fairbrother, Yeh et al., 2002). Im Gegensatz zum Kugel- und Zebrafisch, sind in humanen und murinen Intronen in der Nähe von Spleißsignalen GGG bzw. CCC Basen-Triplets angereichert (Yeo, Hoon et al., 2004). Stromabwärts von Vβ12-3 wurden im ersten Exon des konstanten Gen-Bereiches Hexamer-Sequenzmotive sowie Basentriplets vom CCC-Typ identifiziert. Mittels vergleichender Sequenzanalysen des Vβ12-3 ORFs und des dupliziertem Gen-Bereiches wurden konservierte Sequenzen stromaufwärts und stromabwärts des ersten konstanten Exons gefunden (Abb. 5.4).

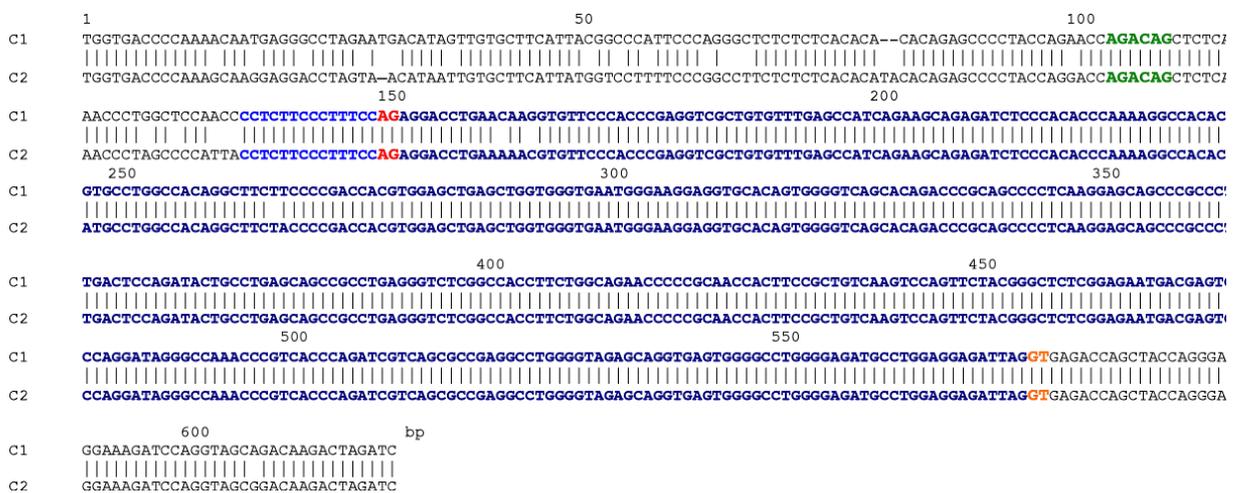


Abbildung 5.4: Vergleichende Sequenzanalysen aus dem Bereich des ersten konstanten Exons.

Das Exon ist gegen ber den angrenzenden konservierten intronischen Bereichen dunkelblau hervorgehoben. Die Verzweigungsstelle (gr n), der Poly-Pyrimidin-Bereich (hellblau) sowie die 5'- (rot) und 3'-Spleißsignale (hellrot) sind farblich gekennzeichnet.

Stromaufwärts des Exons zeigen 155 bp hohe Konservierung, stromabwärts des Exons 50 bp. Die stromaufwärts liegende Sequenz zeigt eine Homologie von 95 %, die Sequenz stromabwärts des Exons zeigt eine Homologie von 99 %. Diese Elemente konnten nicht in dem murinen Ortholog identifiziert werden, sondern sind spezifisch für den humanen TCRβ-Lokus. Innerhalb des humanen Gens wurden keine weiteren konservierten Intron-Bereiche identifiziert. Durch evolutionären Druck werden regulatorische DNA-Elemente deutlich langsamer verändert als nicht funktionale DNA-Bereiche (Blanchette und Tompa,

2002). Möglicherweise sind die konservierten Intron-Bereichen für die Prozessierung der Transkripte von Bedeutung oder sind Teil intronischer Spleiß-Enhancer. Durch einen weiteren schrittweisen Aufbau des V β 12-3 ORFs im Episom, kann die Bedeutung konservierter Intron-Bereiche sowie anderer Sequenzelemente für das Spleißen untersucht werden.

5.9 Analysen zur Interaktion von E β mit dem V β 12-3 Corepromoter

Die Mechanismen der Promotor-Enhancer-Wechselwirkung unterliegen einer hoch komplexen Regulation. Wie die Bindungsstellen von E β für die Transkriptionsfaktoren zeigen, sind verschiedene Faktoren an der Enhancer-Funktion beteiligt. Multiple Aktivatoren ermöglichen es der Zelle verschiedene Signalkaskaden miteinander zu verbinden. Neben der kombinatorischen Kontrolle spielt bei der Enhancer-Funktion auch Kooperativität eine Rolle (Carey, 1998). Mittels stabil replizierender EBV-Plasmid-Vektoren wurden die Transkriptionsfaktor-Bindestellen der Protein-bindenden Bereiche (T β 2-T β 5) von E β untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die LEF/TCF-Bindungsstelle des Enhancer-Moduls T β 5 zu der Enhancer vermittelten Transkriptionsaktivierung des Promotors beiträgt. Die Punktmutation ist eine *down*-Mutation, welche die Bindungseigenschaften von Lef verschlechtert. Dieses Ergebnis widerspricht transienten Transfektions-Analysen, die dem Enhancer-Modul T β 5 keine Bedeutung bei der Enhancer-Funktion zuschreiben (Gottschalk und Leiden, 1990). Es steht jedoch im Einklang mit den bereits durchgeführten Analysen zur Promotor-Enhancer-Interaktion, bei der die LEF-Bindungsstelle des Promotors deletiert wurde (Haus-Seuffert, Halle et al., 1999).

Die Luziferase-Reporter-Analysen haben gezeigt, dass die putative Myb-Bindestelle negativ auf die Promotoraktivität wirkt. Bisher ist keine negative Funktion von Myb im Rahmen von Promotor-Enhancer-Interaktionen beschrieben wurden. Möglicherweise ist diese Funktion nur zell- oder entwicklungspezifisch. Die DNA-Bindedomäne DBD (**DNA binding domain**) von c-Myb (**cellular Myb**) kann die N-terminalen Histon H3-Schwänze binden. Diese Interaktion ist für die Acetylierung von K18 und K23 in einer p300 abhängigen Weise notwendig (Mo, Kowenz-Leutz et al., 2005). Auch wurde gezeigt, dass das retrovirale Onkoprotein v-Myb (**viral Myb**) des *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV) dominant negative Funktion zeigt. Die Analysen zur Promotor-Enhancer-Interaktion wurde in leukämischen, humanen T-Zellen (Jurkat6) durchgeführt. Diese Zelllinie ist polyploid

und aufgrund von Defekten während der Mitose entstanden. Die Jurkat-Zellen wurden nicht durch AMV onkogen transformiert, sodaß die reprimierende Wirkung von v-Myb ausgeschlossen werden kann.

In transienten Luziferase-Reporter-Analysen wurden einige der hier eingesetzten Konstrukte bereits untersucht (Dissertation S.Sanner). Dabei zeigten die kleinsten Konstrukte mit der geringsten Anzahl an Bindestellen die niedrigste Expression des Reporters. Das steht im Gegensatz zu den Ergebnissen stabil replizierender EBV-Plasmid-Vektoren. Myb zeigt Chromatin-verändernde Funktion die möglicherweise auf die Kooperation mit anderen Faktoren angewiesen ist (Mo, Kowenz-Leutz et al., 2005). Auch E β kann Chromatinstrukturen verändern (Beresford und Boss, 2001; Elefant, Su et al., 2000). Im Unterschied zu episomalen Plasmid-Vektoren erfahren transient transfizierte Plasmid-Vektoren eine weniger komplexe Chromatinverpackung. Die Chromatin-modulierenden Eigenschaften von Myb kommen möglicherweise bei stark vereinfachten Systemen nicht zum Tragen. Das würde erklären, warum die Ergebnisse transientser Analysen nicht den hier gefundenen Ergebnissen entsprechen.

In den Analysen zur Interaktion des V β 12-3 Corepromotors mit den Deletionskonstrukten von E β wurde gezeigt, dass E β neben aktivierenden Elementen auch reprimierende Funktion zeigt. Bisher wurde in der Literatur keine reprimierende Funktion von Enhancer-Elementen beschrieben. Somit wurde erstmalig die negative Wirkung eines Enhancer-Elementes auf die Transkription des Zielpromotors demonstriert. Bisher kann diese Funktion von E β jedoch noch nicht in den Kontext des TCR β -Lokus eingeordnet werden.

5.10 Der TCR β -Lokus wird auf der Ebene der Transkription und der Prozessierung reguliert

E β ist das Schlüsselement der Genregulation des TCR β -Lokus. Durch die Wechselwirkung von E β mit dem V β 12-3 Zielpromotor wird dessen Transkription stark stimuliert (Abb. 5.5). Die Transkriptanalysen, in denen mindestens 3000 mal mehr Transkripte an V β 12-3 gegenüber V β 11-3 detektiert wurden, spiegeln den aktivierenden Einfluß von E β auf die Transkription des Zielpromotors. Auch wurde durch diese Analysen gezeigt, dass auch an nicht rekombinierten Gensegmenten Transkription stattfinden kann.

Die geringe Transkriptionsrate des nicht rekombinierten Gensegmentes V β 11-3 ist auf die mangelnde Interaktion dieses Promotors mit dem Enhancer E β zurückzuführen.

Neben der Regulation der Transkription wird der TCR β -Lokus auch auf der Ebene der Prozessierung von Transkripten reguliert. Dabei bilden die *antisense* Transkripte des Gegenstranges einen Transkript-Schwellenwert. Dieser Schwellenwert sorgt dafür, dass kodierende Transkripte nicht funktionaler Gensegmente bis zur Höhe des *antisense* Schwellenwertes eins-zu-eins RNA-Komplexe bilden. Aufgrund der Komplexbildung sind diese Transkripte für Spleißfaktoren maskiert und können nicht prozessiert werden (Abb. 5.5). Kodierende Transkripte die über den *antisense* Schwellenwert hinaus gehen werden jedoch nicht maskiert und können dementsprechend gespleißt werden. Somit werden die hoch exprimierten funktionalen Transkripte des rekombinierten V β 12-3 Gensegmentes nicht infolge Maskierung an der Besetzung mit Spleißfaktoren gehindert, sodass die Prozessierung dieser Transkripte nicht negativ beeinflusst wird. Die *antisense* RNA des rekombinierten TCR β -Allels verhindert somit, dass nicht funktionale Transkripte prozessiert werden und trägt dazu bei, dass nur funktionale V β 12-3 Transkripte ein Genprodukt bilden können.

Im gesamten TCR β -Lokus wurden nicht kodierende Transkripte des Gegenstranges nachgewiesen. Dabei wurden nur im Bereich zwischen V β 12-3 und E β mehr *sense* als *antisense* Transkripte detektiert. Im ORF von V β 12-3 liegt das Gleichgewicht der Transkripte besonders stark auf Seiten der kodierenden Transkripte. Die hohe V β 12-3 Transkription infolge der Wechselwirkung mit E β minimiert den Effekt von RNA-Duplex-Strukturen auf die funktionalen Transkripte. Die ermittelten *antisense* Transkripte im V β 12-3 ORF ergeben, dass durch RNA-Duplexbildung lediglich 2 % der gesamten V β 12-3 Transkripte maskiert werden können. Im Gegensatz dazu zeigen die Transkript-Fließgleichgewichte an V β 11-3 und V β 30, dass die Anzahl der *antisense* Transkripte mindestens so hoch ist, wie die der kodierenden *sense* Transkripte. Somit können die V β 11-3 und V β 30 Transkripte des kodierenden Stranges infolge der RNA-Duplexbildung vollständig für Prozessierungsfaktoren maskiert werden.

In Analysen zum Gen des Thyroid-Hormon-Rezeptors in B-Zellen wurde gezeigt, dass Transkripte für Prozessierungsfaktoren infolge von RNA-Duplexen maskiert werden können. Dabei wird das alternative Spleißen durch RNA Maskierung durch *antisense* Transkripte reguliert (Munroe und Lazar, 1991). Die Bildung von *antisense* Transkripten am

Gen des Thyroid-Hormon-Rezeptors führt zu einer Maskierung der antagonistischen Spleißvariante, indem der Zugang regulatorischer *cis*-Elemente zur RNA blockiert wird (Lavorgna, Dahary et al., 2004).

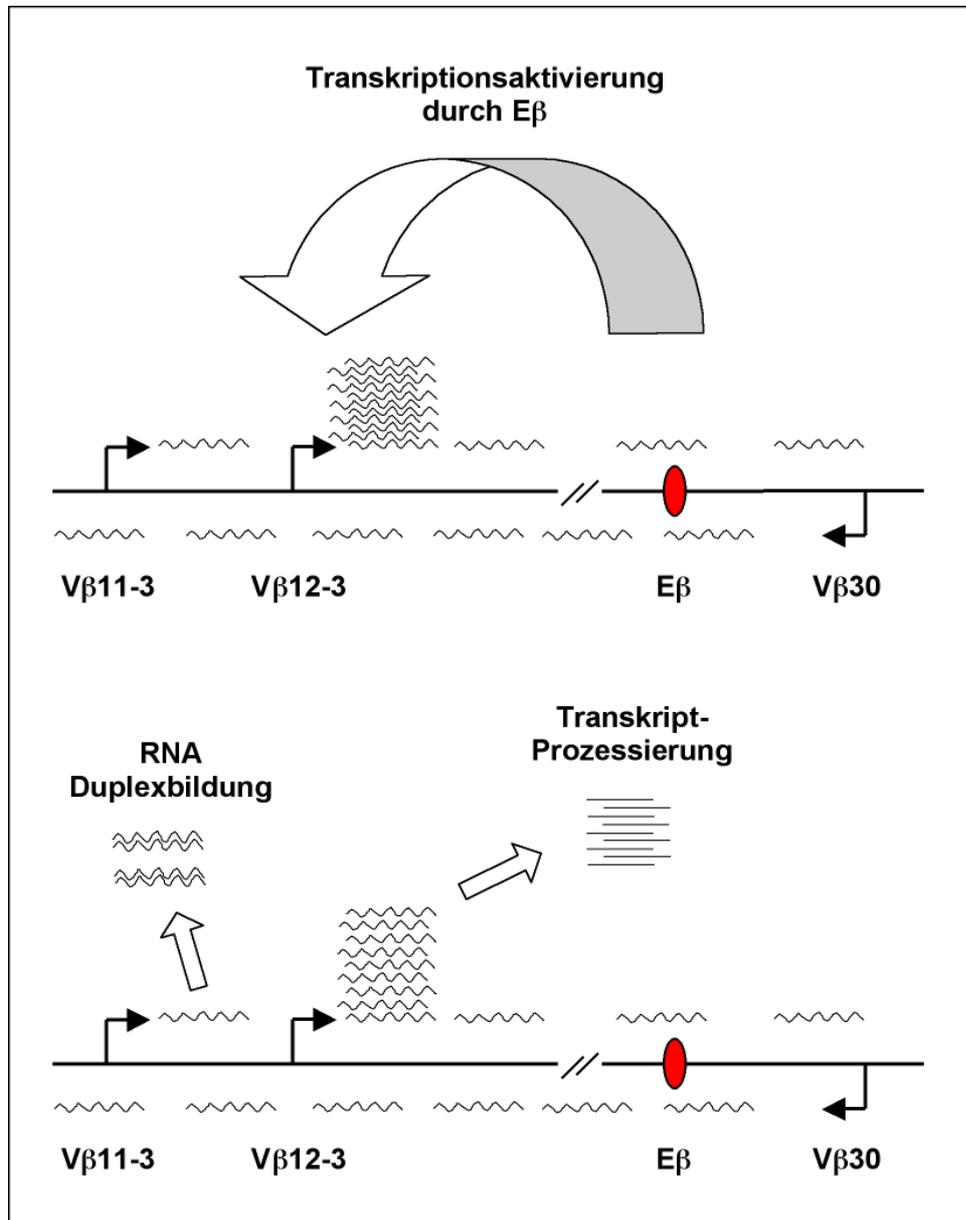


Abbildung 5.5: Mechanismen der Transkription und der Prozessierung definieren das funktionale Gensegment Vβ12-3. Eβ verstärkt die Transkription seines Zielpromotors. *Antisense* RNA führt zu RNA Duplex-Strukturen, wodurch kodierende Transkripte für Faktoren der Prozessierung maskiert werden. Nur Vβ12-3 Transkripte können somit gespleißt werden.

6 Zusammenfassung

Das menschliche Immunsystem ist in der Lage 10^{12} verschiedene T-Zell-Rezeptoren (TCR) zu produzieren. Die T-Zell-Rezeptoren sind Teil der zellulären Immunantwort und werden durch komplexe Multigenfamilien kodiert. Aufgrund der Größe von mehr als 680 kb und der durch 65 verschiedene Gensegmente gekennzeichneten Struktur ist die Expression funktionaler TCR β -Transkripte hochgradig reguliert. Das Schlüsselement der Genregulation des TCR β -Lokus ist dabei der distale Enhancer E β .

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das regulatorische Netzwerk sowohl am rekombinierten, als auch am nicht rekombinierten Allel in Jurkat-T-Zellen untersucht. Es wurden Transkriptanalysen und Untersuchungen mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) durchgeführt. Dabei wurde das funktionale, rekombinierte V β 12-3 Gensegment mit den angrenzenden nicht kodierenden Gensegmenten verglichen. Der Vergleich der drei Gensegmente zeigt die Sonderstellung des rekombinierten Gensegmentes durch eine hohe Abundanz der V β 12-3 Transkripte infolge der Wechselwirkung mit E β . Auch wurden verschiedene Marker aktiven Chromatins besonders an V β 12-3 nachgewiesen, was die Ergebnisse der Transkriptanalysen bestätigt. Durch die Transkriptanalysen wurden intergenische und nicht kodierende *antisense* Transkripte des Gegenstranges identifiziert. Die kodierenden Transkripte sind dabei ausschließlich an V β 12-3 um Größenordnungen höher abundant, als die komplementären *antisense* Transkripte. Auch werden gespleißte Transkripte nur an V β 12-3 gebildet. Das hier entwickelte Modell beschreibt erstmalig die Prozessierung als Teil der Lokusregulation rekombinierter Gene. Demzufolge bilden die *antisense* Transkripte einen Schwellenwert, bis zu dem die *sense* Transkripte mit den komplementären *antisense* Transkripten Duplex-Strukturen ausbilden. Diese Duplex-Strukturen sind für Prozessierungsfaktoren unzugänglich, sodass ausschließlich die hochexprimierten V β 12-3 Transkripte gespleißt werden. Somit tragen Prozessierungsmechanismen dazu bei, dass nur an V β 12-3 reife Transkripte entstehen die zu Genprodukten führen.

Polyadenylierung stellt einen weiteren Prozessierungsmechanismus dar. In Analysen zu Elementen der Polyadenylierungsstellen des Lokus wurden mittels stabil replizierender

EBV-Plasmid-Vektoren konservierte Sequenz-Elemente identifiziert. Diese neuartigen Elemente der polyA-Region zeigen eine negative Rolle auf die Bildung naszierender Transkripte. Mit vergleichbaren Reporter-Analysen verschiedener Enhancer-Konstrukte konnten außerdem erstmalig Elemente identifiziert werden, die negativ auf die Transkription ihres Zielpromotors wirken. Diese negative Wirkung steht im Kontrast zu den aktivierenden Eigenschaften bisher charakterisierter Enhancer.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen neben den neu identifizierten Elementen des TCR β -Lokus und den erstmalig beschriebenen Transkripten des Gegenstranges eine neue Regulationsebene der Lokuskontrolle rekombinierter Gene. Die Begrenzung der Transkript-Prozessierung auf das funktionale Gensegment mittels RNA-Duplex-Strukturen trägt dazu bei, dass T-Zellen nur eine funktionale T-Zell-Rezeptor- β -Kette exprimieren.

7 Literatur-Verzeichnis

Agalioti, T., Chen, G., und Thanos, D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* *111*, 381-392.

Agelopoulos, M., und Thanos, D. (2006). Epigenetic determination of a cell-specific gene expression program by ATF-2 and the histone variant macroH2A. *Embo J* *25*, 4843-4853.

Aguilera, A. (2005). Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 242-250.

Ahn, S. H., Kim, M., und Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* *13*, 67-76.

Allison, L. A., Wong, J. K., Fitzpatrick, V. D., Moyle, M., und Ingles, C. J. (1988). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and mammals: a conserved structure with an essential function. *Mol Cell Biol* *8*, 321-329.

Anderson, J. T. (2005). RNA turnover: unexpected consequences of being tailed. *Curr Biol* *15*, R635-638.

Anderson, L., und Seilhamer, J. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* *18*, 533-537.

Anderson, S. J., Chou, H. S., und Loh, D. Y. (1988). A conserved sequence in the T-cell receptor beta-chain promoter region. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 3551-3554.

Anderson, S. J., Miyake, S., und Loh, D. Y. (1989). Transcription from a murine T-cell receptor V beta promoter depends on a conserved decamer motif similar to the cyclic AMP response element. *Mol Cell Biol* *9*, 4835-4845.

Ast, G. (2004). How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* *5*, 773-782.

Beelman, C. A., und Parker, R. (1995). Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* *81*, 179-183.

Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E., und Sauer, F. (2002). Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* *419*, 857-862.

Bell, A. C., und Felsenfeld, G. (1999). Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev* *9*, 191-198.

Bender, M. A., Byron, R., Ragozy, T., Telling, A., Bulger, M., und Groudine, M. (2006). Flanking HS-62.5 and 3' HS1, and regions upstream of the LCR, are not required for beta-globin transcription. *Blood* *108*, 1395-1401.

- Beresford, G. W., und Boss, J. M. (2001). CIITA coordinates multiple histone acetylation modifications at the HLA-DRA promoter. *Nat Immunol* 2, 652-657.
- Berg, J. M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2003). *Biochemie*, Fifth Edition edn (Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH).
- Berget, S. M. (1995). Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem* 270, 2411-2414.
- Bergman, Y. (1999). Allelic exclusion in B and T lymphopoiesis. *Semin Immunol* 11, 319-328.
- Bernstein, B. E., Humphrey, E. L., Erlich, R. L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J. S., Kouzarides, T., und Schreiber, S. L. (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8695-8700.
- Bernstein, E., und Allis, C. D. (2005). RNA meets chromatin. *Genes Dev* 19, 1635-1655.
- Bird, G., Fong, N., Gatlin, J. C., Farabaugh, S., und Bentley, D. L. (2005). Ribozyme cleavage reveals connections between mRNA release from the site of transcription and pre-mRNA processing. *Mol Cell* 20, 747-758.
- Blanchette, M., und Tompa, M. (2002). Discovery of regulatory elements by a computational method for phylogenetic footprinting. *Genome Res* 12, 739-748.
- Bommhardt, U., Beyer, M., Hunig, T., und Reichardt, H. M. (2004). Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci* 61, 263-280.
- Bouvier, G., Watrin, F., Naspetti, M., Verthuy, C., Naquet, P., und Ferrier, P. (1996). Deletion of the mouse T-cell receptor beta gene enhancer blocks alphabeta T-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7877-7881.
- Bulger, M., und Groudine, M. (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* 13, 2465-2477.
- Burley, S. K., und Roeder, R. G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* 65, 769-799.
- Butler, J. E., und Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16, 2583-2592.
- Butler, J. S. (2002). The yin and yang of the exosome. *Trends Cell Biol* 12, 90-96.
- Calvo, O., und Manley, J. L. (2003). Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes Dev* 17, 1321-1327.
- Carey, M. (1998). The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* 92, 5-8.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., et al. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559-1563.

- Carter, D., Chakalova, L., Osborne, C. S., Dai, Y. F., und Fraser, P. (2002). Long-range chromatin regulatory interactions in vivo. *Nat Genet* 32, 623-626.
- Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H. H., Kapranov, P., Sekinger, E. A., Kampa, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A. J., et al. (2004). Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 116, 499-509.
- Chan, H. M., und La Thangue, N. B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* 114, 2363-2373.
- Chapman, R. D., Palancade, B., Lang, A., Bensaude, O., und Eick, D. (2004). The last CTD repeat of the mammalian RNA polymerase II large subunit is important for its stability. *Nucleic Acids Res* 32, 35-44.
- Chen, J., Sun, M., Kent, W. J., Huang, X., Xie, H., Wang, W., Zhou, G., Shi, R. Z., und Rowley, J. D. (2004). Over 20% of human transcripts might form sense-antisense pairs. *Nucleic Acids Res* 32, 4812-4820.
- Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G., et al. (2005). Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308, 1149-1154.
- Chesnut, J. D., Stephens, J. H., und Dahmus, M. E. (1992). The interaction of RNA polymerase II with the adenovirus-2 major late promoter is precluded by phosphorylation of the C-terminal domain of subunit I α . *J Biol Chem* 267, 10500-10506.
- Cho, E. J., Takagi, T., Moore, C. R., und Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 11, 3319-3326.
- Cho, H., Kim, T. K., Mancebo, H., Lane, W. S., Flores, O., und Reinberg, D. (1999). A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev* 13, 1540-1552.
- Chung, J. H., Bell, A. C., und Felsenfeld, G. (1997). Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 575-580.
- Coleman, R. A., Taggart, A. K., Burma, S., Chicca, J. J., 2nd, und Pugh, B. F. (1999). TFIIA regulates TBP and TFIID dimers. *Mol Cell* 4, 451-457.
- Conaway, J. W., Shilatfard, A., Dvir, A., und Conaway, R. C. (2000). Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 25, 375-380.
- Conaway, R. C., und Conaway, J. W. (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 62, 161-190.
- Cooke, C., Hans, H., und Alwine, J. C. (1999). Utilization of splicing elements and polyadenylation signal elements in the coupling of polyadenylation and last-intron removal. *Mol Cell Biol* 19, 4971-4979.

- Corcoran, A. E. (2005). Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin Immunol* *17*, 141-154.
- Corden, J. L. (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* *15*, 383-387.
- Cramer, P. (2004). RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Curr Opin Genet Dev* *14*, 218-226.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., und Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* *292*, 1863-1876.
- Cramer, P., Pesce, C. G., Baralle, F. E., und Kornblihtt, A. R. (1997). Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11456-11460.
- Custodio, N., und Carmo-Fonseca, M. (2001). Quality control of gene expression in the nucleus. *J Cell Mol Med* *5*, 267-275.
- Cuvier, O., Hart, C. M., Kas, E., und Laemmli, U. K. (2002). Identification of a multicopy chromatin boundary element at the borders of silenced chromosomal domains. *Chromosoma* *110*, 519-531.
- de Laat, W., und Grosveld, F. (2003). Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. *Chromosome Res* *11*, 447-459.
- Dean, A. (2006). On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends Genet* *22*, 38-45.
- Deng, X., Sun, G. R., Zheng, Q., und Li, Y. (1998). Characterization of human TCR Vbeta gene promoter. Role of the dodecamer motif in promoter activity. *J Biol Chem* *273*, 23709-23715.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., und Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* *399*, 491-496.
- Diaz, M., und Lawrence, C. (2005). An update on the role of translesion synthesis DNA polymerases in Ig hypermutation. *Trends Immunol* *26*, 215-220.
- Dimaano, C., und Ullman, K. S. (2004). Nucleocytoplasmic transport: integrating mRNA production and turnover with export through the nuclear pore. *Mol Cell Biol* *24*, 3069-3076.
- 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.
- Elefant, F., Su, Y., Liebhaber, S. A., und Cooke, N. E. (2000). Patterns of histone acetylation suggest dual pathways for gene activation by a bifunctional locus control region. *Embo J* *19*, 6814-6822.

- Enriquez-Harris, P., Levitt, N., Briggs, D., und Proudfoot, N. J. (1991). A pause site for RNA polymerase II is associated with termination of transcription. *Embo J* 10, 1833-1842.
- Fairbrother, W. G., Yeh, R. F., Sharp, P. A., und Burge, C. B. (2002). Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297, 1007-1013.
- Fasken, M. B., und Corbett, A. H. (2005). Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 12, 482-488.
- Feaver, W. J., Gileadi, O., Li, Y., und Kornberg, R. D. (1991). CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b. *Cell* 67, 1223-1230.
- Fehling, H. J., und von Boehmer, H. (1997). Early alpha beta T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice. *Curr Opin Immunol* 9, 263-275.
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., und Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* 12, 1052-1058.
- Frankel, A., Yadav, N., Lee, J., Branscombe, T. L., Clarke, S., und Bedford, M. T. (2002). The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J Biol Chem* 277, 3537-3543.
- Furic, L., und Desgroseillers, L. (2005). [Post-transcriptional regulation of gene expression: another role for Staufen1]. *Med Sci (Paris)* 21, 571-573.
- Gaszner, M., und Felsenfeld, G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* 7, 703-713.
- Gerber, H. P., Hagmann, M., Seipel, K., Georgiev, O., West, M. A., Litingtung, Y., Schaffner, W., und Corden, J. L. (1995). RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature* 374, 660-662.
- Geyer, P. K., und Clark, I. (2002). Protecting against promiscuity: the regulatory role of insulators. *Cell Mol Life Sci* 59, 2112-2127.
- Gnatt, A. (2002). Elongation by RNA polymerase II: structure-function relationship. *Biochim Biophys Acta* 1577, 175-190.
- Goren, A., Ram, O., Amit, M., Keren, H., Lev-Maor, G., Vig, I., Pupko, T., und Ast, G. (2006). Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences--The complex definition of enhancers and silencers. *Mol Cell* 22, 769-781.
- Gottschalk, L. R., und Leiden, J. M. (1990). Identification and functional characterization of the human T-cell receptor beta gene transcriptional enhancer: common nuclear proteins interact with the transcriptional regulatory elements of the T-cell receptor alpha and beta genes. *Mol Cell Biol* 10, 5486-5495.

- Grosveld, F., van Assendelft, G. B., Greaves, D. R., und Kollias, G. (1987). Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* *51*, 975-985.
- Halle, J. P., Haus-Seuffert, P., Woltering, C., Stelzer, G., und Meisterernst, M. (1997). A conserved tissue-specific structure at a human T-cell receptor beta-chain core promoter. *Mol Cell Biol* *17*, 4220-4229.
- Hastings, M. L., Ingle, H. A., Lazar, M. A., und Munroe, S. H. (2000). Post-transcriptional regulation of thyroid hormone receptor expression by cis-acting sequences and a naturally occurring antisense RNA. *J Biol Chem* *275*, 11507-11513.
- Hatzis, P., und Talianidis, I. (2002). Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol Cell* *10*, 1467-1477.
- Haus-Seuffert, P., Halle, J. P., Sanner, S., und Meisterernst, M. (1999). Conserved cAMP responsive element and core promoter complex are critical for specificity of the distal T-cell receptor beta chain enhancer for its native promoter. *Gene* *236*, 209-219.
- Haussecker, D., und Proudfoot, N. J. (2005). Dicer-dependent turnover of intergenic transcripts from the human beta-globin gene cluster. *Mol Cell Biol* *25*, 9724-9733.
- Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., et al. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* *39*, 311-318.
- Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S., und Young, R. A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* *2*, 43-53.
- Holstege, F. C., Fiedler, U., und Timmers, H. T. (1997). Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *Embo J* *16*, 7468-7480.
- Howe, K. J., Kane, C. M., und Ares, M., Jr. (2003). Perturbation of transcription elongation influences the fidelity of internal exon inclusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* *9*, 993-1006.
- Hu, J., Lutz, C. S., Wilusz, J., und Tian, B. (2005). Bioinformatic identification of candidate cis-regulatory elements involved in human mRNA polyadenylation. *Rna* *11*, 1485-1493.
- Huang, F., Cabaud, O., Verthuy, C., Hueber, A. O., und Ferrier, P. (2003). Alpha beta T-cell development is not affected by inversion of TCR beta gene enhancer sequences: polar enhancement of gene expression regardless of enhancer orientation. *Immunology* *109*, 510-514.
- Ionov, Y., Nowak, N., Perucho, M., Markowitz, S., und Cowell, J. K. (2004). Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer Cells with microsatellite instability. *Oncogene* *23*, 639-645.

- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., und Maquat, L. E. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106, 607-617.
- Izaurralde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E., und Mattaj, I. W. (1994). A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* 78, 657-668.
- Izquierdo, J. M., und Valcarcel, J. (2006). Fas-activated serine/threonine kinase (FAST K) synergizes with TIA-1/TIAR proteins to regulate Fas alternative splicing. *J Biol Chem*.
- Jenuwein, T., und Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Johnson, J. M., Edwards, S., Shoemaker, D., und Schadt, E. E. (2005). Dark matter in the genome: evidence of widespread transcription detected by microarray tiling experiments. *Trends Genet* 21, 93-102.
- Kadonaga, J. T. (2004). Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 116, 247-257.
- Kaiser, K., und Meisterernst, M. (1996). The human general co-factors. *Trends Biochem Sci* 21, 342-345.
- Kampa, D., Cheng, J., Kapranov, P., Yamanaka, M., Brubaker, S., Cawley, S., Drenkow, J., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Helt, G., et al. (2004). Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res* 14, 331-342.
- Kapranov, P., Cawley, S. E., Drenkow, J., Bekiranov, S., Strausberg, R. L., Fodor, S. P., und Gingeras, T. R. (2002). Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. *Science* 296, 916-919.
- Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C. C., Suzuki, M., Kawai, J., et al. (2005). Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309, 1564-1566.
- Khoury, G., und Gruss, P. (1983). Enhancer elements. *Cell* 33, 313-314.
- Kim, A., Kiefer, C. M., und Dean, A. (2006). Distinctive signatures of histone methylation in transcribed coding and non-coding human β -globin sequences. *Mol Cell Biol*.
- Kim, T. H., Abdullaev, Z. K., Smith, A. D., Ching, K. A., Loukinov, D. I., Green, R. D., Zhang, M. Q., Lobanenko, V. V., und Ren, B. (2007). Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* 128, 1231-1245.
- Kouskouti, A., und Talianidis, I. (2005). Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *Embo J* 24, 347-357.
- Kuhn, E. J., und Geyer, P. K. (2003). Genomic insulators: connecting properties to mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 15, 259-265.

- Kyburz, A., Friedlein, A., Langen, H., und Keller, W. (2006). Direct interactions between subunits of CPSF and the U2 snRNP contribute to the coupling of pre-mRNA 3' end processing and splicing. *Mol Cell* 23, 195-205.
- Lachner, M., und Jenuwein, T. (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 14, 286-298.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., und Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-120.
- Lapidot, M., und Pilpel, Y. (2006). Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *EMBO Rep* 7, 1216-1222.
- Lavorgna, G., Dahary, D., Lehner, B., Sorek, R., Sanderson, C. M., und Casari, G. (2004). In search of antisense. *Trends Biochem Sci* 29, 88-94.
- Lazar, M. A. (1990). Sodium butyrate selectively alters thyroid hormone receptor gene expression in GH3 cells. *J Biol Chem* 265, 17474-17477.
- Leiden, J. M. (1993). Transcriptional regulation of T cell receptor genes. *Annu Rev Immunol* 11, 539-570.
- Lewis, J. D., Izaurralde, E., Jarmolowski, A., McGuigan, C., und Mattaj, I. W. (1996). A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site. *Genes Dev* 10, 1683-1698.
- Li, X., und Manley, J. L. (2005). Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell* 122, 365-378.
- Liang, G., Lin, J. C., Wei, V., Yoo, C., Cheng, J. C., Nguyen, C. T., Weisenberger, D. J., Egger, G., Takai, D., Gonzales, F. A., und Jones, P. A. (2004). Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7357-7362.
- Lindstrom, D. L., Squazzo, S. L., Muster, N., Burckin, T. A., Wachter, K. C., Emigh, C. A., McCleery, J. A., Yates, J. R., 3rd, und Hartzog, G. A. (2003). Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins. *Mol Cell Biol* 23, 1368-1378.
- Louie, M. C., Yang, H. Q., Ma, A. H., Xu, W., Zou, J. X., Kung, H. J., und Chen, H. W. (2003). Androgen-induced recruitment of RNA polymerase II to a nuclear receptor-p160 coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2226-2230.
- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J. M., und Reinberg, D. (1992). Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* 358, 641-645.
- Ludwig, M. Z. (2002). Functional evolution of noncoding DNA. *Curr Opin Genet Dev* 12, 634-639.

- Luna, R., Jimeno, S., Marin, M., Huertas, P., Garcia-Rubio, M., und Aguilera, A. (2005). Interdependence between transcription and mRNP processing and export, and its impact on genetic stability. *Mol Cell* 18, 711-722.
- Magdinier, F., Yusufzai, T. M., und Felsenfeld, G. (2004). Both CTCF-dependent and -independent insulators are found between the mouse T cell receptor alpha and Dad1 genes. *J Biol Chem* 279, 25381-25389.
- Mahmoudi, T., Katsani, K. R., und Verrijzer, C. P. (2002). GAGA can mediate enhancer function in trans by linking two separate DNA molecules. *Embo J* 21, 1775-1781.
- Malik, S., Gu, W., Wu, W., Qin, J., und Roeder, R. G. (2000). The USA-derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol Cell* 5, 753-760.
- Maquat, L. E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 89-99.
- Marks, P. A., Miller, T., und Richon, V. M. (2003). Histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol* 3, 344-351.
- Marmorstein, R. (2001). Structure and function of histone acetyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 58, 693-703.
- Martinez, E. (2002). Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol* 50, 925-947.
- Mathieu, N., Hempel, W. M., Spicuglia, S., Verthuy, C., und Ferrier, P. (2000). Chromatin remodeling by the T cell receptor (TCR)-beta gene enhancer during early T cell development: Implications for the control of TCR-beta locus recombination. *J Exp Med* 192, 625-636.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., und Bentley, D. L. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385, 357-361.
- Meininghaus, M., und Eick, D. (1999). Requirement of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II for the transcriptional activation of chromosomal c-fos and hsp70A genes. *FEBS Lett* 446, 173-176.
- Meisterernst, M., Roy, A. L., Lieu, H. M., und Roeder, R. G. (1991). Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell* 66, 981-993.
- Misteli, T., und Spector, D. L. (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell* 3, 697-705.
- Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Laumonier, Y., Xu, H., und Leutz, A. (2005). Histone H3 tail positioning and acetylation by the c-Myb but not the v-Myb DNA-binding SANT domain. *Genes Dev* 19, 2447-2457.

- Moore, M. J., Schwartzfarb, E. M., Silver, P. A., and Yu, M. C. (2006). Differential Recruitment of the Splicing Machinery during Transcription Predicts Genome-Wide Patterns of mRNA Splicing. *Mol Cell* 24, 903-915.
- Moreira, A., Takagaki, Y., Brackenridge, S., Wollerton, M., Manley, J. L., and Proudfoot, N. J. (1998). The upstream sequence element of the C2 complement poly(A) signal activates mRNA 3' end formation by two distinct mechanisms. *Genes Dev* 12, 2522-2534.
- Muller, H. P., und Schaffner, W. (1990). Transcriptional enhancers can act in trans. *Trends Genet* 6, 300-304.
- Munroe, S. H., und Lazar, M. A. (1991). Inhibition of c-erbA mRNA splicing by a naturally occurring antisense RNA. *J Biol Chem* 266, 22083-22086.
- Munroe, S. H., und Zhu, J. (2006). Overlapping transcripts, double-stranded RNA and antisense regulation: a genomic perspective. *Cell Mol Life Sci* 63, 2102-2118.
- Murasawa, S., Matsubara, H., Kizima, K., Maruyama, K., Mori, Y., und Inada, M. (1995). Glucocorticoids regulate V1a vasopressin receptor expression by increasing mRNA stability in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 26, 665-669.
- Naar, A. M., Lemon, B. D., und Tjian, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* 70, 475-501.
- Nesic, D., Cheng, J., und Maquat, L. E. (1993). Sequences within the last intron function in RNA 3'-end formation in cultured cells. *Mol Cell Biol* 13, 3359-3369.
- Ng, H. H., und Bird, A. (2000). Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem Sci* 25, 121-126.
- Ng, H. H., Robert, F., Young, R. A., und Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* 11, 709-719.
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E., und Kouzarides, T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561-565.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P., und Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* 16, 479-489.
- Odom, D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., et al. (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303, 1378-1381.
- Oelgeschlager, T. (2002). Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *J Cell Physiol* 190, 160-169.

- Ohkuma, Y., und Roeder, R. G. (1994). Regulation of TFIIF ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature* 368, 160-163.
- Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., Kondo, S., Nikaido, I., Osato, N., Saito, R., Suzuki, H., et al. (2002). Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* 420, 563-573.
- Orphanides, G., Lagrange, T., und Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* 10, 2657-2683.
- Ota, T., Suzuki, Y., Nishikawa, T., Otsuki, T., Sugiyama, T., Irie, R., Wakamatsu, A., Hayashi, K., Sato, H., Nagai, K., et al. (2004). Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 36, 40-45.
- Pauler, F. M., Stricker, S. H., Warczok, K. E., und Barlow, D. P. (2005). Long-range DNase I hypersensitivity mapping reveals the imprinted *Igf2r* and *Air* promoters share cis-regulatory elements. *Genome Res* 15, 1379-1387.
- Peterson, C. L., und Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14, R546-551.
- Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., Bell, G. W., Walker, K., Rolfe, P. A., Herbolsheimer, E., et al. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122, 517-527.
- Pozzoli, U., und Sironi, M. (2005). Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 62, 1579-1604.
- Proudfoot, N. J. (2003). Dawdling polymerases allow introns time to splice. *Nat Struct Biol* 10, 876-878.
- Proudfoot, N. J., Furger, A., und Dye, M. J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501-512.
- Rinn, J. L., Euskirchen, G., Bertone, P., Martone, R., Luscombe, N. M., Hartman, S., Harrison, P. M., Nelson, F. K., Miller, P., Gerstein, M., et al. (2003). The transcriptional activity of human Chromosome 22. *Genes Dev* 17, 529-540.
- Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21, 327-335.
- Rosok, O., und Sioud, M. (2004). Systematic identification of sense-antisense transcripts in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22, 104-108.
- Routledge, S. J., und Proudfoot, N. J. (2002). Definition of transcriptional promoters in the human beta globin locus control region. *J Mol Biol* 323, 601-611.
- Rowen, L., Koop, B. F., und Hood, L. (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272, 1755-1762.

- Sachs, A. B., Sarnow, P., und Hentze, M. W. (1997). Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89, 831-838.
- Sambrook, J. a. R., D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Third Edition edn (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., und Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411.
- Schadt, E. E., Edwards, S. W., GuhaThakurta, D., Holder, D., Ying, L., Svetnik, V., Leonardson, A., Hart, K. W., Russell, A., Li, G., et al. (2004). A comprehensive transcript index of the human genome generated using microarrays and computational approaches. *Genome Biol* 5, R73.
- Schneider, R., Bannister, A. J., Myers, F. A., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C., und Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* 6, 73-77.
- Schroeder, S. C., Schwer, B., Shuman, S., und Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* 14, 2435-2440.
- Scott, J. M., und Imperiale, M. J. (1996). Reciprocal effects of splicing and polyadenylation on human immunodeficiency virus type 1 pre-mRNA processing. *Virology* 224, 498-509.
- Selenko, P., Gregorovic, G., Sprangers, R., Stier, G., Rhani, Z., Kramer, A., und Sattler, M. (2003). Structural basis for the molecular recognition between human splicing factors U2AF65 and SF1/mBBP. *Mol Cell* 11, 965-976.
- Selinger, D. W., Cheung, K. J., Mei, R., Johansson, E. M., Richmond, C. S., Blattner, F. R., Lockhart, D. J., und Church, G. M. (2000). RNA expression analysis using a 30 base pair resolution Escherichia coli genome array. *Nat Biotechnol* 18, 1262-1268.
- Semon, M., und Duret, L. (2004). Evidence that functional transcription units cover at least half of the human genome. *Trends Genet* 20, 229-232.
- Shen, H., und Green, M. R. (2004). A pathway of sequential arginine-serine-rich domain-splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly. *Mol Cell* 16, 363-373.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., und Casero, R. A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shuman, S. (1997). Origins of mRNA identity: capping enzymes bind to the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12758-12760.
- Sleckman, B. P., Bassing, C. H., Bardon, C. G., Okada, A., Khor, B., Bories, J. C., Monroe, R., und Alt, F. W. (1998). Accessibility control of variable region gene assembly during T-cell development. *Immunol Rev* 165, 121-130.

- Soares, L. M., Zanier, K., Mackereth, C., Sattler, M., und Valcarcel, J. (2006). Intron removal requires proofreading of U2AF/3' splice site recognition by DEK. *Science* 312, 1961-1965.
- Soller, M. (2006). Pre-messenger RNA processing and its regulation: a genomic perspective. *Cell Mol Life Sci*.
- Spicuglia, S., Kumar, S., Yeh, J. H., Vachez, E., Chasson, L., Gorbach, S., Cautres, J., und Ferrier, P. (2002). Promoter activation by enhancer-dependent and -independent loading of activator and coactivator complexes. *Mol Cell* 10, 1479-1487.
- Staley, J. P., und Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315-326.
- Strahl, B. D., und Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Sugden, B., Marsh, K., und Yates, J. (1985). A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biol* 5, 410-413.
- Swinburne, I. A., Meyer, C. A., Liu, X. S., Silver, P. A., und Brodsky, A. S. (2006). Genomic localization of RNA binding proteins reveals links between pre-mRNA processing and transcription. *Genome Res* 16, 912-921.
- Szutorisz, H., Canzonetta, C., Georgiou, A., Chow, C. M., Tora, L., und Dillon, N. (2005). Formation of an active tissue-specific chromatin domain initiated by epigenetic marking at the embryonic stem cell stage. *Mol Cell Biol* 25, 1804-1820.
- Szutorisz, H., Dillon, N., und Tora, L. (2005). The role of enhancers as centres for general transcription factor recruitment. *Trends Biochem Sci* 30, 593-599.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T., und Shinkai, Y. (2001). Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem* 276, 25309-25317.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Troelstra, C., van Gool, A., de Wit, J., Vermeulen, W., Bootsma, D., und Hoeijmakers, J. H. (1992). ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 71, 939-953.
- Tsai, T. F., Wu, M. J., und Su, T. S. (1998). Usage of cryptic splice sites in citrullinemia fibroblasts suggests role of polyadenylation in splice-site selection during terminal exon definition. *DNA Cell Biol* 17, 717-725.
- Tsao, Y. P., Wu, H. Y., und Liu, L. F. (1989). Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from in vitro studies. *Cell* 56, 111-118.

- Turner, B. M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* *111*, 285-291.
- Ujvari, A., und Luse, D. S. (2004). Newly Initiated RNA encounters a factor involved in splicing immediately upon emerging from within RNA polymerase II. *J Biol Chem* *279*, 49773-49779.
- Vagner, S., Vagner, C., und Mattaj, I. W. (2000). The carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase interacts with U2AF 65 to couple 3'-end processing and splicing. *Genes Dev* *14*, 403-413.
- van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C., und Parker, R. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* *295*, 2262-2264.
- Vasudevan, S., Peltz, S. W., und Wilusz, C. J. (2002). Non-stop decay--a new mRNA surveillance pathway. *Bioessays* *24*, 785-788.
- Venkataraman, K., Brown, K. M., und Gilmartin, G. M. (2005). Analysis of a noncanonical poly(A) site reveals a tripartite mechanism for vertebrate poly(A) site recognition. *Genes Dev* *19*, 1315-1327.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* *291*, 1304-1351.
- Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I., und Martienssen, R. A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* *297*, 1833-1837.
- von Hippel, P. H. (2006). Transcriptional pausing caught in the act. *Cell* *125*, 1027-1028.
- Wahle, E., und Keller, W. (1992). The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* *61*, 419-440.
- Wahle, E., und Ruegsegger, U. (1999). 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* *23*, 277-295.
- Wang, H., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J., Tempst, P., und Zhang, Y. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* *293*, 853-857.
- Wang, Q., Zhang, Z., Blackwell, K., und Carmichael, G. G. (2005). Vigilins bind to promiscuously A-to-I-edited RNAs and are involved in the formation of heterochromatin. *Curr Biol* *15*, 384-391.
- Wang, X. J., Gaasterland, T., und Chua, N. H. (2005). Genome-wide prediction and identification of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol* *6*, R30.

- Yamada, K., Lim, J., Dale, J. M., Chen, H., Shinn, P., Palm, C. J., Southwick, A. M., Wu, H. C., Kim, C., Nguyen, M., et al. (2003). Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. *Science* 302, 842-846.
- Yamagoe, S., Kanno, T., Kanno, Y., Sasaki, S., Siegel, R. M., Lenardo, M. J., Humphrey, G., Wang, Y., Nakatani, Y., Howard, B. H., und Ozato, K. (2003). Interaction of histone acetylases and deacetylases in vivo. *Mol Cell Biol* 23, 1025-1033.
- Yeo, G., Hoon, S., Venkatesh, B., und Burge, C. B. (2004). Variation in sequence and organization of splicing regulatory elements in vertebrate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15700-15705.
- Yusufzai, T. M., und Felsenfeld, G. (2004). The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8620-8624.
- Zhao, J., Hyman, L., und Moore, C. (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 405-445.
- Zhou, J., Chau, C. M., Deng, Z., Shiekhattar, R., Spindler, M. P., Schepers, A., und Lieberman, P. M. (2005). Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication. *Embo J* 24, 1406-1417.
- Zhou, M., Halanski, M. A., Radonovich, M. F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D. H., und Brady, J. N. (2000). Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol* 20, 5077-5086.

8 Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	30. August 1975
Geburtsort	Halle/Saale
Familienstand	verheiratet

Ausbildung / Beruf

seit August 2006	Anstellung bei der Cephalon GmbH, Martinsried im wissenschaftlichen Außendienst
11/2002-07/2006	Promotionsstudium An der Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt an dem GSF – Forschungszentrum München „Molekularbiologische Analysen zur Regulation des T-Zell-Rezeptor- β -Lokus“ Prof. Dr. Michael Meisterernst
10/1997-09/2002	Studium der Biochemie An der Martin-Luther-Universität-Halle/S.; Diplom mit Note 1,3 Diplomarbeit: „Molekulargenetische Analyse des <i>mod(mdg4)</i> -Lokus von <i>Drosophila virilis</i> “ Prof. Dr. Gunther Reuter
11/1996-06/1999	Mitarbeiter in Beratung und Verkauf im E-Plus-Shop Halle/S.
10/1995-04/1997	Studium der Rechtswissenschaft an der Martin-Luther-Universität-Halle/S.
1994 – 1995	Grundwehrdienst als Sanitätssoldat in Hildesheim und Hannover
1990 – 1994	Gymnasium „Christian Wolff“ in Halle/S.; Abitur mit Note 1,6

Auslandserfahrung

07/2000-09/2000 Praktikum an der Tufts University (Boston, MA)
Im Department of Chemical and Biological Engineering
Prof. Dr. Eliana de Bernardez Clark