

Der Einfluss der Chromatinfaltung auf die *Remodeling*-Aktivität der ATPase ISWI



Vorgelegt von

Nicola Hepp

2017

Aus dem Biomedizinischen Centrum
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Adolf-Butenandt-Institut

Lehrstuhl Molekularbiologie

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Peter Becker

Der Einfluss der Chromatinfaltung auf die *Remodeling*-Aktivität der ATPase ISWI

Dissertation

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

vorgelegt von

Nicola Hepp

aus Bad Waldsee

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Peter Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl

Prof. Dr. Alexander Faussner

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Felix Müller-Planitz

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2017

Eidesstattliche Versicherung

Hepp, Nicola

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Der Einfluss der Chromatinfaltung auf die Remodeling-Aktivität der ATPase ISWI

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Kopenhagen, den 23.08.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	2
1 EINLEITUNG	3
1.1 AUFBAU UND STRUKTUR VON CHROMATIN	3
1.1.1 <i>Stufen der Chromatin-Kondensation</i>	4
1.1.2 <i>Euchromatin und Heterochromatin</i>	8
1.2 PRINZIPIEN DER STRUKTURREGULATION IN CHROMATIN	8
1.3 ATP-ABHÄNGIGE CHROMATIN-REMODELING-KOMPLEXE	8
1.4 ISWI-FAMILIE DER CHROMATIN-REMODELING-KOMPLEXE	10
1.4.1 <i>Aufbau und Funktionsmechanismus der ATPase ISWI</i>	10
1.4.2 <i>Einflüsse des H4-Schwanz auf die Remodeling-Aktivität von ISWI</i>	12
1.5 ZIELE	12
2 MATERIALIEN UND METHODEN	14
2.1 MATERIALIEN	14
2.1.1 <i>Technische Geräte</i>	14
2.1.2 <i>Chemikalien</i>	14
2.1.3 <i>Materialien für die Filtration, Dialyse und Proteinreinigung</i>	15
2.1.4 <i>E.coli Stämme</i>	16
2.1.5 <i>Enzyme, Kits, DNA-Marker, Protein-Marker und Enzypuffer</i>	16
2.1.6 <i>Oligonukleotide (Primer)</i>	17
2.1.7 <i>Plasmide</i>	18
2.1.8 <i>PCR-Amplifikate</i>	19
2.2 PUFFER UND LÖSUNGEN	20
2.2.1 <i>Färbung von Proteingelen</i>	20
2.2.2 <i>Puffer für Agarose- und Proteingele</i>	20
2.2.3 <i>Puffer zur Proteinreinigung von Histonen</i>	21
2.2.4 <i>Puffer zur Rekonstitution von Oktameren</i>	21
2.2.5 <i>Puffer zur Proteinreinigung von ISWI_{FL}</i>	21
2.2.6 <i>Puffer zur Proteinreinigung der Taq-Polymerase</i>	21
2.2.7 <i>Puffer zur Herstellung von Nukleosomen-Arrays</i>	22
2.2.8 <i>Puffer der Chromatin-Remodeling-Assays</i>	22
2.2.9 <i>Sonstige Puffer und Lösungen</i>	22
2.3 METHODEN ZUR VERMEHRUNG, QUANTIFIZIERUNG UND ANALYSE VON DNA	23

2.3.1	<i>Transformation kompetenter E. coli</i>	23
2.3.2	<i>Anzüchtung von Bakterienkulturen</i>	23
2.3.3	<i>Aufreinigung von DNA-Plasmiden</i>	23
2.3.4	<i>Gelelektrophorese von Agarosegelen</i>	24
2.3.5	<i>Ethanol-fällung von DNA</i>	24
2.3.6	<i>DNA-Gelextrahierung</i>	24
2.3.7	<i>Konzentrationsbestimmung von DNA</i>	25
2.4	ENTWURF UND SYNTHESE DER PLASMIDE pFMP 226 UND pFMP 227.....	25
2.4.1	<i>Entwurf von 13-mer Sequenzen mit individuellen Restriktionsschnittstellen</i>	25
2.4.2	<i>Synthese der Plasmide pFMP 226 und pFMP 227</i>	26
2.5	HERSTELLUNG DER PLASMIDE pFMP 232 UND pFMP 233.....	26
2.5.1	<i>Isolierung der 12-mer WT 601 Sequenz</i>	27
2.5.2	<i>Klonierung der 13-mer Inserts der Plasmide pFMP 226 bzw. 227 in pUC18</i>	27
2.5.3	<i>Klonierung der Plasmide pFMP 232 und pFMP 233</i>	27
2.6	HERSTELLUNG VON DNA-FRAGMENTEN FÜR NUKLEOSOMEN-ARRAYS.....	28
2.6.1	<i>Herstellung der DNA-Fragmente für 13-mer Nukleosomen-Arrays</i>	29
2.6.2	<i>Herstellung der DNA-Fragmente für 25-mer Nukleosomen-Arrays</i>	29
2.7	METHODEN ZUR ANALYSE UND HERSTELLUNG VON PROTEINEN.....	30
2.7.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	30
2.7.2	<i>Expression rekombinanter Histone in chemisch kompetenten E. coli</i>	30
2.7.3	<i>Proteinaufreinigung der Histone H2A, H2B und gH4</i>	30
2.7.4	<i>Expression von ISWI_{FL} in chemisch kompetenten E.coli</i>	32
2.7.5	<i>Proteinaufreinigung von ISWI_{FL} (His₆-TEV, full length)</i>	32
2.8	REKONSTITUTION VON HISTONOKTAMEREN.....	33
2.9	REKONSTITUTION VON 13-MER UND 25-MER NUKLEOSOMEN-ARRAYS.....	34
2.9.1	<i>Assemblierung von DNA und Oktameren zu Nukleosomen-Arrays</i>	34
2.9.2	<i>Magnesiumfällung der Nukleosomen-Arrays</i>	35
2.9.3	<i>Qualitätskontrollen der 13-mer und 25-mer Nukleosomen-Arrays</i>	36
2.10	ANALYTISCHE MAGNESIUMFÄLLUNG VON NUKLEOSOMEN-ARRAYS.....	37
2.11	RESTRICTION-ENZYM-ACCESSIBILITY-ASSAYS.....	37
2.11.1	<i>Variation der MgCl₂ Konzentration in Chromatin-Remodeling-Assays</i>	38
2.11.2	<i>Variation der ISWI-Konzentration in Chromatin-Remodeling-Assays</i>	38
2.11.3	<i>Quantifizierung der Chromatin-Remodeling-Assays</i>	38
2.12	METHODEN ZUR HERSTELLUNG VON MONO- UND DINUKLEOSOMEN.....	39
2.12.1	<i>Herstellung der Monomer-DNA-Sequenzen</i>	39
2.12.2	<i>PCR zur Amplifikation der Sequenz PCRA 213</i>	39
2.12.3	<i>PCR zur Amplifikation der Sequenz PCRA 217</i>	40
2.12.4	<i>DrIII Verdau und Aufreinigung der PCR-Amplifikate</i>	40
2.12.5	<i>Ligation der PCR-Amplifikate PCRA 213 und 217</i>	41

2.12.6	<i>Herstellung von Dimer-DNA-Sequenzen</i>	41
2.12.7	<i>Rekonstitution von Mono- und Dinukleosomen</i>	42
2.12.8	<i>Qualitätskontrollen der Mononukleosomen</i>	42
2.12.9	<i>Qualitätskontrollen der Dinukleosomen</i>	43
2.12.10	<i>Dinukleosomen-Ligationsversuch</i>	43
2.13	EXPRESSION UND PROTEINAUFREINIGUNG DER TAQ-POLYMERASE.....	43
2.13.1	<i>Transformation und Expression der Taq-Polymerase</i>	43
2.13.2	<i>Induktionskontrollen der Taq-Polymerase pFMP 222</i>	44
2.13.3	<i>Chromatographische Proteinaufreinigung der Taq-Polymerase</i>	45
3	ERGEBNISSE	47
3.1	ASSEMBLIERUNG VON 13-MER NUKLEOSOMEN-ARRAYS MIT STÖCHIOMETRISCHEN MENGEN AN HISTONOKTAMEREN.....	47
3.1.1	<i>Qualitätskontrollen der 13-mer Arrays</i>	50
3.2	ETABLIERUNG EINES <i>RESTRICTION-ENZYME-ACCESSIBILITY-ASSAYS</i> ZUR ANALYSE VON <i>REMODELING</i> SPEZIFISCHER NUKLEOSOMEN IN 13-MER ARRAYS.....	51
3.3	VERGLEICH DER <i>REMODELING</i> -AKTIVITÄT VON ISWI ZWISCHEN EINER INTERNEN UND EXTERNEN NUKLEOSOMENPOSITION IN 13-MER ARRAYS.....	53
3.3.1	<i>ISWI remodelt interne und externe Nukleosomen mit ähnlicher Effizienz</i>	54
3.4	EVALUIERUNG DES <i>RESTRICTION-ENZYME-ACCESSIBILITY-ASSAYS</i>	54
3.4.1	<i>Überprüfung des Apyrase-Reaktionsstopps mittels Quench-Kontrollen</i>	55
3.4.2	<i>Überprüfung des Restriktionsenzymverdaus</i>	55
3.5	<i>REMODELING</i> IN ABHÄNGIGKEIT VON DER MAGNESIUMKONZENTRATION.....	57
3.6	ETABLIERUNG DER 25-MER NUKLEOSOMEN-ARRAYS.....	60
3.6.1	<i>Verlängerung der 13-mer Insert-Sequenzen zu 25-mer Sequenzen</i>	60
3.6.2	<i>Kontrollen der 25-mer Verlängerung</i>	62
3.6.3	<i>Assemblierung und Qualitätskontrollen der 25-mer Arrays</i>	64
3.7	25-MER NUKLEOSOMEN-ARRAYS PRÄZITIEREN BEI NIEDRIGEREN MAGNESIUMKONZENTRATIONEN ALS 13-MER NUKLEOSOMEN-ARRAYS.....	66
3.8	<i>REMODELING</i> DER NUKLEOSOMEN DREI UND ELF IN 25-MER ARRAYS.....	66
3.9	EINFLUSS DER MAGNESIUMIONENKONZENTRATION IN <i>REMODELING</i> -ASSAYS MIT 25-MER ARRAYS.....	69
3.10	VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER ISWI KONZENTRATIONEN IN <i>REAA</i> S MIT 25-MER ARRAYS.....	71
3.11	ENTWICKLUNG EINES DINUKLEOSOMEN-MODELLSUBSTRATS MIT WT- UND GH4-OKTAMEREN.....	72
3.11.1	<i>Erfolgreiche Präparation von DNA-Monomeren zur Ligation eines Dimer-Konstrukts</i>	73
3.11.2	<i>Ergebnisse der Assemblierung von Mononukleosomen</i>	75
3.11.3	<i>Ergebnisse und Qualitätskontrollen der Dinukleosomen Herstellung</i>	77
3.11.4	<i>Übersicht der produzierten Mono- und Dinukleosomen</i>	79
3.11.5	<i>Ligationsversuch zur Herstellung heterogener Dinukleosomen</i>	80
4	DISKUSSION	82
4.1	KRITISCHE BETRACHTUNG DES 13- UND 25-MER ARRAY-SUBSTRATS.....	82

4.2	EIN HOHES MAß AN CHROMATIN-EIGENDYNAMIK SCHEINT DIE EFFIZIENZ VON <i>REMODELING</i> -ENZYMEN ZU UNTERSTÜTZEN	84
4.3	UNKLARER EINFLUSS DER MAGNESIUMIONENKONZENTRATION AUF DIE ATPASE-AKTIVITÄT VON ISWI UND DIE <i>ARRAY</i> -KONFIGURATION.....	84
4.4	PROBLEMLÖSUNG DES DINUKLEOSOMEN-MODELLSUBSTRATS.....	86
4.5	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN CHROMATIN- <i>REMODELING</i> -KOMPLEXEN UND KREBSENTSTEHUNG ...	87
4.6	AUSBLICK	88
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	90
6	LITERATURVERZEICHNIS	92
7	ANHANG.....	99
7.1	PLASMIDKARTEN.....	99
7.1.1	<i>Plasmidkarte pFMP 213</i>	99
7.1.2	<i>Plasmidkarte pFMP 217</i>	99
7.1.3	<i>Plasmidkarte pFMP 226</i>	100
7.1.4	<i>Plasmidkarte pFMP 227</i>	100
7.1.5	<i>Plasmidkarte pFMP 232</i>	101
7.1.6	<i>Plasmidkarte pFMP 233</i>	101
7.1.7	<i>Plasmidkarte pFMP 236</i>	102
7.1.8	<i>Plasmidkarte pFMP 237</i>	102
7.2	ERGEBNISSE UND DATEN.....	103
7.2.1	<i>Restriction-Enzyme-Accessibility Assays mit 13-mer Arrays</i>	103
7.2.2	<i>Restriction-Enzyme-Accessibility Assays mit 25-mer Arrays</i>	108
7.2.3	<i>Ergebnisse der Magnesiumfällung mit 13-mer und 25-mer Arrays</i>	113
7.3	<i>ALIGNMENT</i> DER MT UND WT 601 SEQUENZEN (197 BP)	114
8	DANKSAGUNG	115

Zusammenfassung

Das eukaryotische Genom organisiert sich in einem hoch kompakten Nukleoprotein-Komplex namens Chromatin. Chromatin faltet und schützt das Genom und ermöglicht eine Genregulation. Auf mikroskopischer Ebene betrachtet besteht Chromatin aus DNA, die sich mit circa zwei Windungen um einen Ball aus Histon-Proteinen schlingt. Diese Einheit wird als Nukleosom bezeichnet. Wiederholende Einheiten von Nukleosomen formen sich zu Chromatinfasern. Diese wiederum falten sich zu höher organisierten, kompakten Strukturen. Das bei der Mitose gebildete Chromosom ist die kompakteste Form von DNA, die eine Zelle erzeugen kann. Neben dieser starken Kompaktheit muss Chromatin jedoch über eine gewisse Zugänglichkeit und Dynamik verfügen. Dies ist essentiell, da wichtige zelluläre Mechanismen, wie DNA-Reparatur und Transkription nackte DNA als Angriffspunkt benötigen. ATP-abhängige Chromatin-*Remodeling*-Komplexe tragen dazu bei, die Zugänglichkeit von Chromatin zu erhöhen. *Remodeling*-Faktoren der ISWI-Familie beispielsweise sind in der Lage, Histon-DNA Kontakte zu unterbrechen und Nukleosomen entlang von DNA zu verschieben. Dieser Mechanismus wird als *nucleosome sliding* bezeichnet. Es ist jedoch nicht klar, wie ISWI die Barriere einer kompakt gefalteten Chromatinfaser überwinden kann. Beginnt *nucleosome sliding* bevorzugt an zugänglichen, externen Positionen einer Chromatinfaser oder ist die intrinsische Dynamik einer Chromatinfaser ausreichend, sodass *Remodeling*-Faktoren direkt interne Bereiche einer Faser angreifen können? Um *Remodeling* zwischen einer internen und externen Nukleosomenposition zu unterscheiden, wurde für diese Arbeit eine DNA-Sequenz geschaffen, die aus dreizehn repetitiven Einheiten einer Nukleosomen positionierenden Sequenz besteht. Jede repetitive Einheit besitzt eine individuelle Restriktionsschnittstelle. Nach erfolgter Histon-Aufreinigung konnten entlang dieser Sequenz Nukleosomen assembliert werden. ISWI war in der Lage die Chromatinfasern zu *remodeln*. Es wurden Veränderungen der DNA-Zugänglichkeit einer internen und externen Nukleosomenposition der Chromatinfaser verglichen. Meine Daten zeigten, dass ISWI erstaunlicherweise interne und externe Nukleosomen einer Chromatinfaser mit annähernd gleicher Effizienz zu *remodeln* vermag. Diese Ergebnisse wurden anhand einer weiterentwickelten, aus fünfundzwanzig Nukleosomen bestehenden Chromatinfaser reproduziert. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine Chromatinfaser über eine weitaus höhere Eigendynamik verfügt, als oftmals angenommen wird. Ein solch hohes Maß an Eigendynamik könnte wiederum erklären, dass selbst dicht gepacktes Heterochromatin effizient repariert, repliziert und transkribiert werden kann.

Abstract

The eukaryotic genome is stored in a highly compacted form called chromatin. Chromatin folds and protects the genome and allows for gene regulation. At the microscopic level, chromatin is composed of DNA wrapped approximately twice around a 'ball' of histone proteins, forming a structure called the nucleosome. Adjacent nucleosomes can further fold into chromatin fibers, which themselves fold into even more compact structures. The familiar shape of a mitotic chromosome is the most compact DNA structure that the cell can form. Despite the strong compaction, chromatin must maintain a very dynamic structure to be able to react to different developmental or environmental cues. For example, important cellular mechanisms like transcription and DNA repair require access to naked DNA. ATP-dependent chromatin remodeling factors are involved in keeping the chromatin structure fluid. The ISWI class of remodeling factors, for example, can disrupt DNA/histone interactions and move nucleosomes to neighboring parts of DNA. This process is termed *nucleosome sliding*. However, it is not clear how ISWI can overcome the steric barrier caused by the tightly arranged nucleosomal fiber. Does nucleosome sliding start preferably on accessible external positions of the chromatin fibers or is the fiber's intrinsic dynamics high enough, to allow ISWI to target also internal positions? To distinguish between external and internal chromatin remodeling, I designed a DNA sequence that contains thirteen repeats of a strong nucleosome positioning sequence. Each repeat was designed to harbor a unique restriction site. After purifying histone proteins, I assembled nucleosomes along this DNA. ISWI was allowed to remodel the resulting nucleosomal fiber. External remodeling was distinguished from internal remodeling by measuring changes in the accessibility of the unique restriction enzyme sites, located at external and internal positions of the DNA. My data show that internal nucleosomes can be remodeled similarly well as external ones. In addition the same investigations were performed on an enlarged nucleosomal fiber, containing twenty-five nucleosomes. Those experiments confirmed the previous observations: The DNA accessibilities and remodeling velocities didn't differ significantly between the internal and external nucleosome of nucleosomal arrays. Apparently, the nucleosomal fiber is more flexible than commonly assumed. Such a high flexibility of the fiber would explain the observation that even "tight" heterochromatin can be efficiently repaired, replicated and transcribed.

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Struktur von Chromatin

Im Zellkern befindet sich das eukaryotische Genom, das in Form von Chromatin verpackt und organisiert wird. Chromatin ist zum größten Teil aus DNA und Histon-Proteinen aufgebaut und komplex organisiert. Auf mikroskopischer Ebene betrachtet besteht Chromatin aus DNA, die sich um Proteinbälle aus Histonoktameren schlingt [1, 2].

Oktamere sind Proteine, die sich aus jeweils zwei Einheiten der *Core*-Histone H2A, H2B, H3 und H4 zusammensetzen [3]. Alle Histone besitzen ein globuläres Zentrum, das in der zentralen Masse des Oktamers beherbergt ist. Zusätzlich enthalten die Histone N-terminal lokalisierte Aminosäureschwänze (*Tails*). Diese flexiblen Histonschwänze bieten eine Angriffsfläche für Histonmodifikationen und spielen eine wichtige Rolle bei der Chromatinfunktion. Bei hohen Salzkonzentrationen (2 M NaCl) assemblieren die Histone zu Oktameren [4]. Ein Oktamer besteht aus einem zentralen H3/H4 Tetramer, das von zwei H2A/H2B Dimeren umgeben ist [4, 5].

Eine Einheit aus DNA und Oktamer wird als Nukleosom bezeichnet. Genauer betrachtet handelt es sich hierbei um eine 147 bp lange Sequenz, die sich mit 1,65 subhelikalen Windungen um ein Oktamer schlingt [2, 6]. Nicht alle existierenden Sequenzen besitzen dieselbe Affinität und positionieren Nukleosomen unterschiedlich gut [5]. DNA-Sequenzen, die zwischen einzelnen Nukleosomen liegen, werden als Linker-DNA bezeichnet und können abhängig von der Spezies eine Länge von circa 7-90 bp aufweisen [7, 8]. An den Enden dieser DNA-Abschnitte binden *in vivo* die Linker-Histone (H1 oder H5 Subtypen), welche mit dem *Core*-Nukleosom und den Linker-Regionen interagieren [4, 9]. Dadurch wird ein Chromatosom mit einer DNA-Gesamtlänge von 167 bp komplettiert [10-12]. Sich wiederholende Einheiten von Nukleosomen und Linker-DNA formen sich schließlich zu einer kompakten Chromatinfaser [13-15]. Linker-Histone stabilisieren das Nukleosom und können die Kompaktheit und die Organisation einer Chromatinfaser unterstützen bzw. erhöhen [16-18].

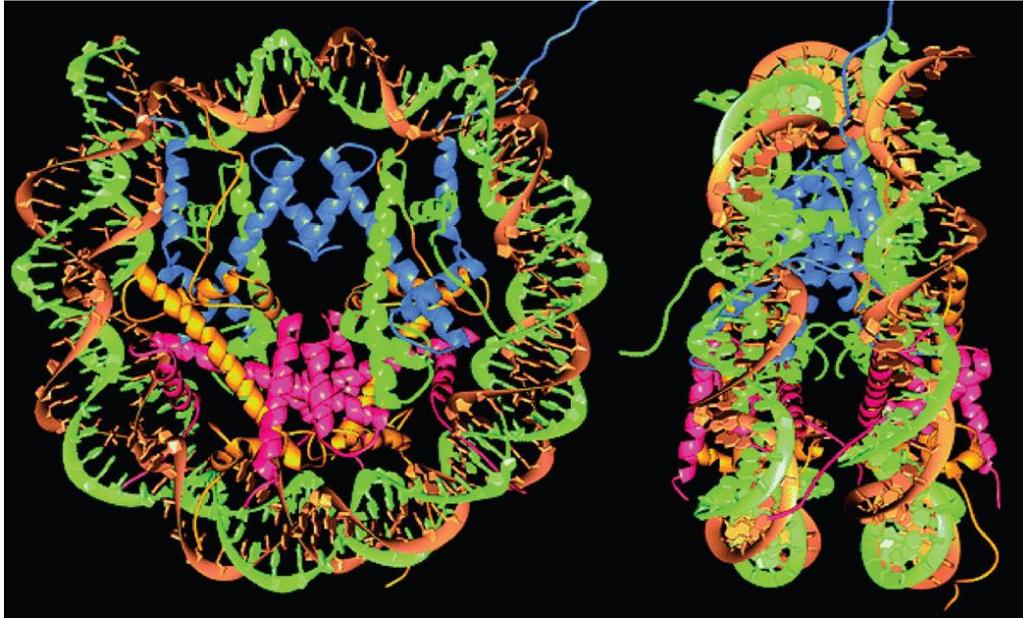


Abb. 1: Strukturaufbau des Nukleosoms. Mittels Röntgen-Kristall-Struktur konnte die Struktur des Nukleosoms identifiziert werden [19]. In der Mitte bilden die Histone (gelb, blau, rosa und grün) das Oktaeder, das von zwei Strängen einer DNA-Doppelhelix (rot und grün) umwunden wird. Seitlich stehen die flexiblen Histonschwänze ab (übernommen von Luger et al., Nature, 1997) [19].

1.1.1 Stufen der Chromatin-Kondensation

Nukleosomen, welche durch Linker-DNA miteinander verbunden sind nehmen eine einfache „beads on a string“ Konfiguration an [20, 21]. Diese 10 nm starke Chromatinfaser zeigt das Bild einer perlschnurartigen Aufreihung von Nukleosomen auf der DNA (Abb. 2A) [1, 17]. Unter physiologischen Salzbedingungen (100 mM) hingegen steigt das Maß der Chromatinorganisation und Nukleosomen-Arrays bilden eine 30 nm Chromatinfaser (siehe Abb. 2A) [15, 18, 22-24].

Es existieren zwei Modellsubstrate von 30 nm Chromatinfasern, die auf Elektronenmikroskopischen Untersuchungen (EM) *in vitro* beruhen [15]. Es wird zwischen dem „Solenoid-Modell“ und dem „Zig-Zag-Modell“ unterschieden [25]. Das „Solenoid-Modell“ besteht aus miteinander interagierenden Nukleosomen, die eine helixartige Struktur ausbilden und damit eine Krümmung von Linker-Histonen voraussetzen (Abb. 2B) [15, 23, 26]. Beim zweiten Modell („Zig-Zag“) wird angenommen, dass zwei Reihen von Nukleosomen zick-zack-artig angeordnet sind und eine Zwei-Säulen-Helix bilden, bei der die Linker-Histone gerade angeordnet sind (Abb. 2C) [12, 15, 27, 28].

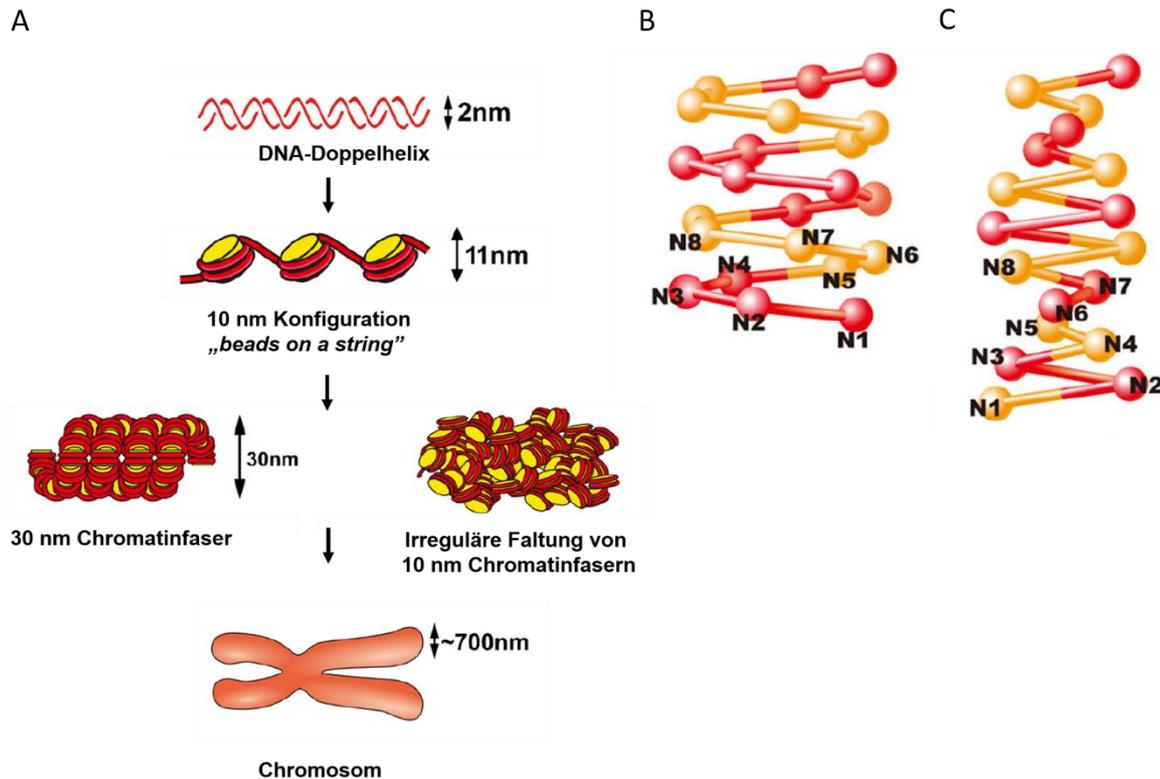


Abb. 2: Struktur und Kondensationsordnung einer Chromatinfaser. (A) Schematische Darstellung der Stufen der Chromatinorganisation mit dem Modell einer irregulär gefalteten Chromatinfaser nach Maeshima et al. [29, 30]. (B) Darstellung des „Solenoid-Modells“ einer 30 nm Chromatinfaser. (C) Visualisierung des „Zig-Zag-Modells“. Die unterschiedliche Stellung der Linker-Histone (orange und rot gefärbt) wird jeweils hervorgehoben (die Abbildungen A, B und C und wurden von Maeshima et al., Chromosoma, 2014 übernommen und sind teilweise modifiziert) [29].

Eine publizierte Studie konnte anhand eines *in vitro* assemblierten Chromosomen-Modells zeigen, dass die 30 nm Chromatinfaser eine heterogene Konfiguration aufwies. In dieser publizierten Arbeit wurde beobachtet, dass eine kompakte 30 nm Chromatinfaser sowohl gekrümmte als auch gerade Formationen der Linker-Histone beinhaltete [25, 31]. Diese Untersuchung konnte die Annahme unterstützen, dass in einer Chromatinfaser „Zig-Zag“ Konfigurationen und Anteile des „Solenoid-Modells“ gleichzeitig vertreten sein könnten [15, 25, 31].

Eine weitere Publikation von Grigoryev et al. beschreibt jedoch ein neuartiges Chromatinmodell, bei dem Nucleosomenketten eine hierarchische Schleifenanordnung annehmen und überwiegend in der „Zig-Zag“ Konfiguration vorliegen sollen [32]. Diese Erkenntnisse wurden mittels *EMANIC* (*EM-assisted nucleosome interaction capture*) ermittelt und für *in vitro* Nucleosomen-Arrays als auch für Mitose- und Interphasechromosomen nachgewiesen [32].

Das Rhode-Labor konnte in zwei publizierten Arbeiten zeigen, dass die Formation und Kondensation von Nukleosomen-Arrays durch die Länge der Linker-DNA beeinflusst werden kann [12, 33]. Dabei konnte anhand von Nukleosomen-Arrays ohne Linker-Histone demonstriert werden, dass Arrays mit einer 197 bp langen repetitiven nukleosomalen Sequenz weniger stark kondensieren, als Arrays mit 167 bp langen repetitiven Sequenzen [33].

In den letzten Jahren wurden jedoch mehrere Arbeiten publiziert, die das Vorhandensein einer 30 nm Chromatinfaser *in vivo* als auch *in vitro* in Frage stellen [21, 34-36].

Das Maeshima-Labor führte Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) Untersuchungen mit mitotischen Chromosomen *in vivo* durch und konnte dabei keine 30 nm Chromatinfasern nachweisen [21, 34-36]. Vielmehr zeigten die Daten der Kryo-EM Analysen, dass mitotische Chromosomen aus ungeordneten, ineinander greifenden 10 nm Chromatinfasern bestehen [21, 29]. Zusätzlich wurde die Struktur von Interphasechromatin und mitotischen Chromosomen mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS = *small angle x-Ray scattering*) analysiert. Hierbei konnten neben 11 nm und 6 nm Peaks auch 30 nm Peaks nachgewiesen werden [34, 35, 37]. Nachdem jedoch die Ribosomen von der Oberfläche des zu untersuchenden Chromatins entfernt wurden, konnten die 30 nm Peaks nicht mehr demonstriert werden. Aus den SAXS-Experimenten konnte geschlossen werden, dass in Interphasechromatin und mitotische Chromosomen *in vivo*, keine bedeutenden Mengen an höher organisierten Strukturen über 10 nm existieren [21, 29, 34, 35, 37]. Eine Ausnahme stellen jedoch Hühnererythrozyten [38-40] und Seesternspermazellen dar, da in deren Zellkernen 30 nm Chromatinfasern nachgewiesen wurden [29, 39, 41].

Eine große Menge an Daten haben jedoch das Vorkommen einer 30 nm Chromatinfaser *in vitro* demonstriert [37]. Es wird vermutet, dass solche Zustände durch spezifische oder niedrige Salzkonzentrationen *in vitro* hervorgerufen werden [29, 30]. Hierbei wird angenommen, dass Nukleosomen innerhalb eines Arrays unter spezifischen Bedingungen miteinander interagieren und so die Konstellation einer 30 nm Chromatinfaser begünstigen [21, 29, 30]. Unter steigenden Salzkonzentrationen bilden Nukleosomen zwischen den einzelnen Chromatinfasern Verbindungen aus, die zu einer reversiblen Oligomerisation von Chromatinfasern führen [18, 37]. Der H4-Histonschwanz der Oktamere ist sowohl an der Ausbildung von *inter-fiber* sowie *intra-fiber* Kontakten zwischen einzelnen Nukleosomen beteiligt [29, 42].

Vor kurzen gelang es der Maeshima Arbeitsgruppe den Aufbau von Nukleosomen-Arrays *in vitro* näher zu untersuchen. Experimentelle Präzipitationsversuche mit 12-mer Nukleosomen-Arrays demonstrierten, dass diese unter zunehmenden Magnesiumkonzentrationen (≥ 3 mM

MgCl₂) miteinander agieren und es zur reversiblen Ausbildung von globulären Oligomeren kommt [30]. Die Struktur dieser Oligomere wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) und Transmissionselektronen-Mikroskopie (TME) näher analysiert. Die Ergebnisse der TME und FM Untersuchungen ließen vermuten, dass *Array*-Oligomere unter Magnesiumkonzentrationen von $\geq 4,5$ mM eine Größe von bis zu 1000 nm annehmen [30]. Darüber hinaus haben SAXS (Kleinwinkel-Röntgenstreuung) Experimente gezeigt, dass diese Oligomere überwiegend 10 nm große Chromatinfasern aufweisen [30].

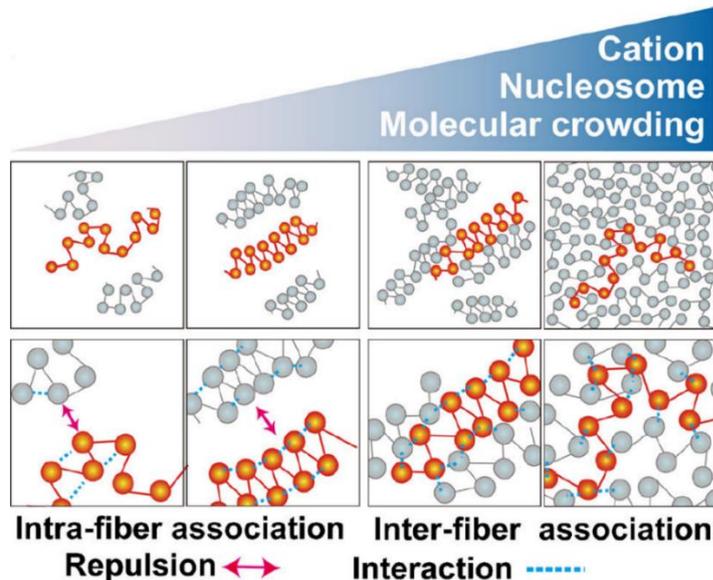


Abb. 3: Schematische Darstellung des „polymer-melt“ Modells nach Maeshima et al. Mit zunehmender Kationen- und Nucleosomenkonzentration nimmt die Interaktion zwischen den Chromatinfasern zu (*Inter-fiber interaction*), sodass sich eine Verschmelzung von 10 nm Chromatinfasern ausbilden kann (übernommen von Maeshima et al., Chromatosoma, 2014) [21, 29, 30].

Maeshima et al. haben basierend auf ihren oben genannten Versuchsdaten die Theorie eines „polymer-melt“ Zustands entwickelt. Nach diesem Modell verschmelzen fraktale, 10 nm große Chromatinfasern zu einer dynamischen, irregulär gefalteten Chromatinfaser (siehe Abb. 2A und Abb. 3) [21, 29, 35, 36].

Der Aufbau und die Struktur von Chromatin sind noch nicht völlig aufgeklärt und werden kontrovers diskutiert.

1.1.2 Euchromatin und Heterochromatin

In eukaryotischen Zellen liegt das Genom in zwei strukturell unterschiedlichen Chromatinformen vor: Euchromatin und Heterochromatin. Diese Unterscheidung beruht auf dem Grad der Chromatin-Kondensation. Euchromatin liegt in einem weitgehend dekondensierten, lockeren Zustand vor und ist dadurch leicht zugänglich für DNA regulierende Faktoren [43]. Als Heterochromatin werden DNA-Abschnitte bezeichnet, welche stark kondensiert und dicht gepackt sind. Diese Einteilung dient jedoch als Modell und darf nicht starr betrachtet werden, da Chromatin eine sehr dynamische Struktur ist. Es konnte gezeigt werden, dass Heterochromatin eine sehr gemischte Struktur aufweist und dass es fließende Übergänge zwischen kondensierten und dekondensierten DNA-Bereichen gibt [44].

1.2 Prinzipien der Strukturregulation in Chromatin

Chromatin unterliegt gewissen Mechanismen, die die Struktur innerhalb des Chromatins regulieren. Dies ist notwendig, um die Zugänglichkeit von DNA und der genetischen Information zu ermöglichen. DNA-Zugänglichkeit ist essentiell für zelluläre Mechanismen wie Transkription, Replikation und DNA-Reparaturmechanismen, da diese Mechanismen nackte DNA als Angriffspunkt benötigen [45]. Auch dicht gepackte Chromatinbereiche, wie das Heterochromatin unterliegen Genregulation und können transkribiert und repariert werden [46-50]. Zu den Mechanismen, die eine gezielte Genregulation in der Zelle ermöglichen zählen: DNA-Methylierung, die Inkorporation spezifischer Histon-Varianten, posttranslationale Modifikationen von Histonen und ATP-abhängige Chromatin-*Remodeling*-Komplexe [51]. Der zuletzt aufgeführte Faktor wird in dieser Arbeit näher untersucht und noch ausführlicher erläutert werden.

1.3 ATP-abhängige Chromatin-*Remodeling*-Komplexe

ATP-abhängige Chromatin-*Remodeling*-Komplexe können die Energie aus der ATP-Hydrolyse nutzen, um DNA-Histon Bindungen zu verändern und Nucleosomen entlang von DNA zu verschieben [45]. Dieser Mechanismus wird als *nucleosome sliding* bezeichnet [52-54]. Manche *Remodeling*-Komplexe sind zudem in der Lage, Nucleosomen auszuwerfen (*nucleosome ejection*) oder H2A/H2B Dimere gegen Dimere mit Histon-Varianten auszutauschen (Abb. 4) [45, 55]. All diese *Remodeling*-Mechanismen verändern die Zugänglichkeit nukleosomaler DNA und ermöglichen DNA-Bindeproteinen wie Transkriptions-faktoren DNA zu binden [45].

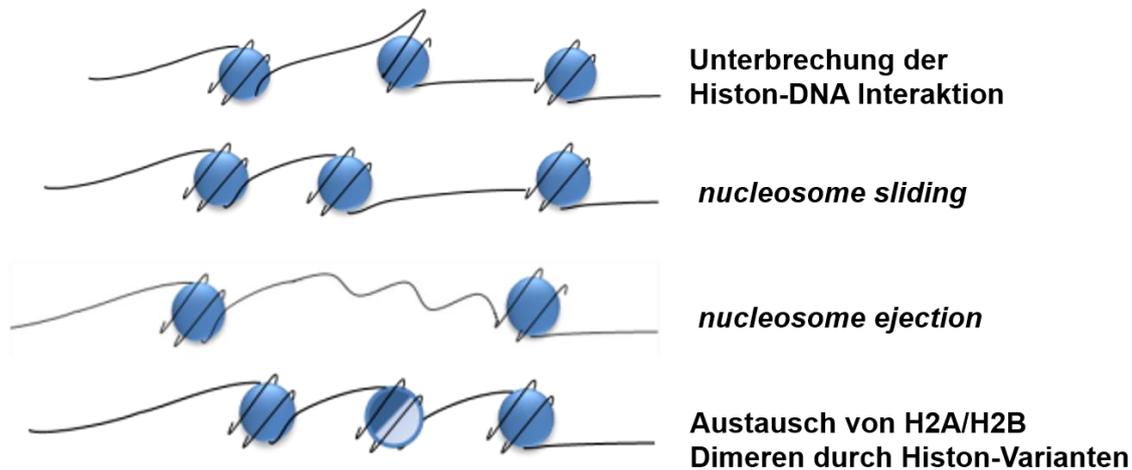


Abb. 4: Schematische Darstellung der *Remodeling*-Mechanismen durch ATP-abhängige *Remodeling*-Komplexe. (Modifiziert nach Xu et al., InTech, 2013 und gedruckt mit der Erlaubnis von InTech).

Chromatin-*Remodeling*-Komplexe existieren in allen Eukaryonten und werden in vier große Subfamilien unterteilt [56]. Alle *Remodeler* besitzen eine DNA-abhängige ATPase [45]. Die ATPase Untereinheit aller *Remodeler* entstammt der Gruppe der SF2-Helikasen und enthält eine DExx- und eine HELICc-Domäne [57]. Die Einteilung der *Remodeling*-Familien beruht auf dem Vorhandensein zusätzlicher Domänen auf der ATPase Einheit [57]. Unterschieden werden die SWI/SNF-, ISWI-, CHD- und die INO80-Familie (Abb. 5A). Die ATPase der SWI/SNF-Familie beinhaltet eine HSA-Domäne und eine C-terminale Bromodomäne. Die Bromodomäne erkennt acetylierte Lysine an Histonen und anderen Proteinen [45, 57]. *Remodeler* dieser Familie sind dazu befähigt Nucleosomen auszuwerfen (*ejection*) und zu verschieben (*sliding*) [57].

Anhand des SWI/SNF *Remodeling*-Komplexes wurde die Beeinflussung benachbarter Nucleosomen durch *Remodeling* untersucht. In einer publizierte Arbeit mit Di- und Trinucleosomen wurden Daten demonstriert, die vermuten lassen, dass ein Nucleosom präferiert *remodelt* und gegen das benachbarte Nucleosom verschoben wird [58-60]. Bei diesem Vorgang soll das benachbarte Nucleosom destabilisiert und ausgeworfen werden [58-60]. Darüber hinaus konnte die Owen-Hughes-Arbeitsgruppe zeigen, dass benachbarte Nucleosomen die DNA des anderen Nucleosoms verlagern, und es dabei zur Überlappung von benachbarten Nucleosomen positionierenden Sequenzen kommt [58-61]. Wie benachbarte Nucleosomen durch die ATPase ISWI *remodelt* werden ist bisher nicht bekannt.

Die ISWI-ATPase besitzt eine SANT- und SLIDE- Domäne, deren Bedeutung im nächsten Kapitel näher erläutert wird. Die CHD-Familie zeichnet sich durch ihre zwei Tandem konfigurierten Chromodomänen aus. Die ATPase der INO80-Familie ist durch die lange

Insertion zwischen der DExx- und HELICc-Domäne charakterisiert [57]. *Remodeling*-Komplexe aus der INO80-Familie katalysieren *sliding* von Nukleosomen, den Austausch von H2A/H2B Dimeren durch Histonvarianten und ermöglichen die Entstehung von DNA-Reparaturvorgängen und Transkription in Eukaryonten [45, 62].

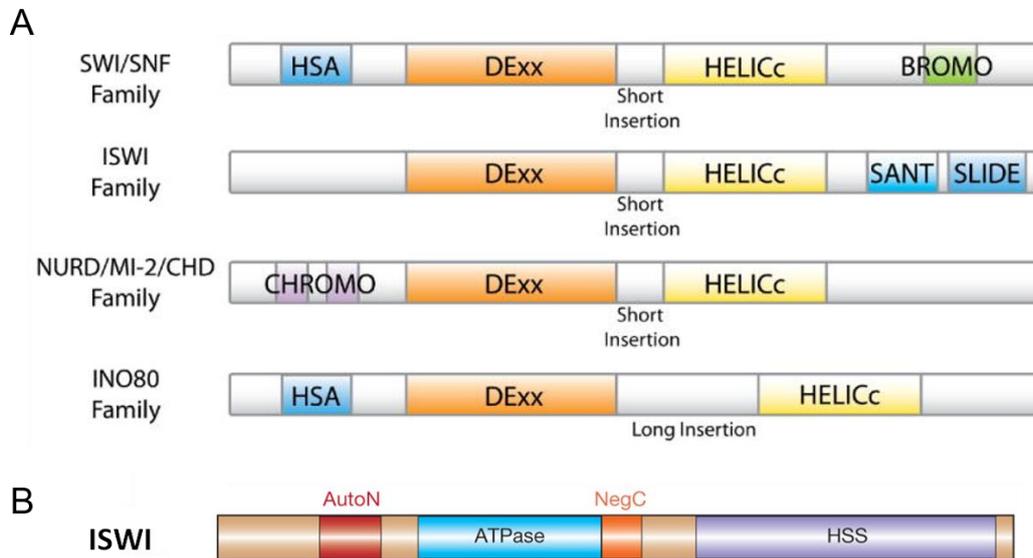


Abb. 5: Übersicht des Aufbaus der ATPasen der unterschiedlichen *Remodeling*-Familien [57]. (A) Klassifikation der Chromatin-*Remodeling*-Komplexe anhand der ATPase Untereinheit (übernommen von Tang et al., Prog Biophys Mol Biol., 2010) [57]. (B) Schematische Darstellung des Aufbaus der ATPase ISWI in *Drosophila melanogaster* mit der ATPase Einheit, HSS-Domäne und den *Remodeling* negativ regulatorischen Elementen AutoN und NegC, nach dem Modell von Clapier et al. (übernommen von Clapier and Cairns, Nature, 2012) [63].

1.4 ISWI-Familie der Chromatin-*Remodeling*-Komplexe

Die ATPase ISWI kommt in allen Eukaryoten vor und ist Bestandteil vieler *Remodeling*-Komplexe, die zur ISWI-Familie der Chromatin-*Remodeling*-Komplexe gerechnet werden. *In vitro* ist ISWI allein in der Lage Nukleosomen zu *remodeln*. *In vivo* hingegen liegt ISWI zusammen mit verschiedenen Untereinheiten vor, welche zusammen einen *Remodeling*-Komplex bilden. Die *Remodeling*-Komplexe dieser Familie besitzen die Fähigkeit Nukleosomen entlang von DNA zu verschieben [45, 53, 60]. In *D.melanogaster* beispielsweise, konnten sechs unterschiedliche *Remodeling*-Komplexe der ISWI-Familie identifiziert werden: CHRAC, ACF, NURF, RSF, TorC und NoRC [45, 64].

1.4.1 Aufbau und Funktionsmechanismus der ATPase ISWI

ISWI besteht aus einer ATPase Einheit und den C-terminal lokalisierten Domänen HAND, SANT und SLIDE (HSS). Die ATPase Einheit bindet an einer zentralen Stelle des

Nukleosoms DNA. Diese Region wird als SHL2 bezeichnet und befindet sich zwei helikale Windungen von der nukleosomalen Dyade-Achse entfernt [65, 66]. In einer Arbeit mit ISW2 aus der Bäckerhefe konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Schwanz des Histons H4 benötigt wird, um den Kontakt zwischen ISW2 und der nukleosomalen DNA (20 bp von der Dyade-Achse entfernt) herzustellen [67].

Die HSS-Domäne von ISW2 bindet extranukleosomale Linker-DNA [68, 69]. Eine publizierte Studie demonstrierte, dass die Bindung der SLIDE-Domäne an extranukleosomale DNA die *Remodeling*-Aktivität von ISW2 regulieren kann, ohne die Bindung der ATPase Domäne am Nukleosom zu beeinflussen [70]. Diese Studie bekräftigt zudem die Theorie, dass der *Remodeling*-Vorgang durch die SLIDE-Domäne unterstützt wird, indem diese DNA in das Nukleosom einschleust, die dann durch die ATPase Einheit weiter befördert wird [70, 71].

Zwei Publikationen zeigten jedoch, dass die SF2-ATPase Einheit allein dazu in der Lage ist ATP zu hydrolysieren und Nukleosomen zu *remodeln* [63, 72]. Hierbei wurde nachgewiesen, dass eine ISWI-Mutante (*D.melanogaster*) ohne HSS-Domäne die eigenständige Fähigkeit besitzt Nukleosomen zu binden, mit dem H4 N-Terminus zu interagieren, DNA-Histon Bindungen zu verändern und Nukleosomen zu verschieben [64, 72]. Diese Erkenntnisse stützen die Idee eines *Remodeling*-Mechanismus, bei dem die ATPase Domäne als elementarer *Remodeling*-Motor fungiert [54, 72] (Abb. 6).

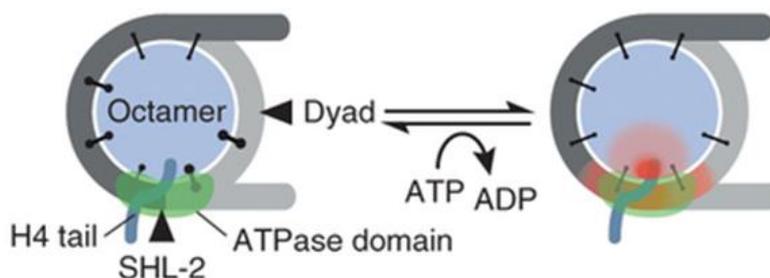


Abb. 6: Darstellung des *Remodeling*-Mechanismus mit der ATPase Einheit als zentraler *Remodeling*-Motor [72]. Die ATPase Einheit des *Remodeler* ISWI erkennt den H4-Terminus und bindet an dieser Stelle nukleosomale DNA (SHL2). DNA-Histon Kontakte werden mittels Energie aus der ATP-Hydrolyse durchbrochen und die Positionierung von DNA und dem Oktamer im Nukleosom verändert (übernommen von Müller-Planitz et al., Nature Structural & Molecular Biology, 2013) [72].

Die HSS-Domäne hingegen scheint einen modulatorischen Einfluss auf den *Remodeling*-Mechanismus auszuüben. Daten zeigten, dass diese Domäne die Affinität und Spezifität zu Nukleosomen erhöht [72], eine wichtige Rolle bei der Richtungsweisung von *Remodeling* einnimmt und die Fähigkeit besitzt, Untereinheiten von *Remodeling*-Komplexen zu binden [70].

Eine Publikation über die Struktur von *Drosophila*-ISWI berichtete von der Entdeckung zweier neuer Sequenzelemente, welche eine negativ regulatorische Funktion erfüllen sollen. Die N-terminale, als AutoN bezeichnete Region soll eine hemmende Wirkung auf die ATP-Hydrolyserate haben [63, 64]. Eine als NegC identifizierte Region zwischen der ATPase und der HSS-Domäne inhibiere hingegen die *Remodeling*-Funktion durch Entkopplung von ATPase-Aktivität und DNA-Translokation (siehe Abb. 5B). ISWI Mutanten ohne HSS-Domäne und ohne die neu beschriebenen Regionen sind in der Lage Nukleosomen zu *sliden* [63]. Diese Beobachtung unterstützt ebenfalls das Modell einer intrinsisch aktiven ATPase-Domäne. Die HSS-Domäne übe wiederum eine negative Kontrolle auf die NegC-Region aus [63]. Die Rolle der HSS-Domäne als Selektivitätsfaktor oder Regulator der ATPase-Domäne wird neben den unterschiedlichen *Remodeling*-Funktionsmechanismen kontrovers diskutiert [71].

1.4.2 Einflüsse des H4-Schwanz auf die *Remodeling*-Aktivität von ISWI

Nukleosomen, die keinen N-terminalen Histonschwanz am Histon H4 besitzen (gH4) können nicht effizient *remodelt* werden [73]. Am Ende des H4-*Tails* konnte ein sogenanntes *basic patch* identifiziert werden, das aus den Aminosäuren R₁₇H₁₈R₁₉ besteht. Experimente demonstrierten, dass Histidin₁₈ nukleosomale DNA bindet [74, 75]. Der N-terminale Proteinschwanz des Histons H4 spielt somit eine wichtige Rolle bei der Interaktion von ISWI mit nukleosomaler DNA [67]. Studien zeigen, dass die ATPase-Domäne von ISWI den H4 Schwanz in Anwesenheit von DNA erkennt und die ATPase-Aktivität zunimmt [72, 74, 76]. Das *basic patch* und die DNA bilden somit einen wichtigen Angriffspunkt für ISWI. Diese Funktion konnte nur nachgewiesen werden, wenn der H4-Aminosäureschwanz am globulären Zentrum des Histons H4 lokalisiert war [74]. ISWI selbst besitzt eine dem H4 *basic patch* ähnliche Region (AutoN). Eine Mutation dieser Region reduziert die *Sliding*-Effizienz, jedoch nicht die ATPase-Aktivität, was eine Rolle des H4-*Tails* bei der Kopplung der ATPase-Aktivität und der Translokation von DNA vermuten lässt [54, 63].

1.5 Ziele

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Chromatinfaltung auf die *Remodeling*-Aktivität von ISWI untersucht. Ziel war es zunächst ein *in vitro* Chromatin-Modellsubstrat zu entwerfen, mit dem *Remodeling* gezielt zwischen internen und externen Nukleosomenpositionen einer Chromatinfaser unterschieden werden kann. Anhand dieser Chromatinfaser sollte dann mittels eines enzymatischen Assays die *Remodeling*-Aktivität von ISWI zwischen einer internen und externen Nukleosomenposition der Chromatinfaser verglichen werden. Ein weiteres Ziel war es ein Nukleosomensubstrat zu etablieren, mit dem überprüft werden kann,

ob sich benachbarte Nukleosomen in ihrer Mobilität während des *nucleosome slidings* beeinflussen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Technische Geräte

Autoklav	Thermo Scientific
Bakterienschüttler	Infors HT Multitron
Elutrap-Elektroelutionssystem	Whatman
FPLC	Amersham Pharmacia Biotech
<i>French Press</i>	Thermo Spectronic
Inkubator	Memmert
Gelkassetten	Invitrogen
Lyophilisator	Alpha 1-2 LDplus, Fisher Bioblock Scientific
PCR-Maschine	2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems
pH-Meter	Inolab pH 720, WTW
<i>Phosphorimager FLA 3000</i>	Fujifilm
Photospektrometer	Nanodrop ND 1000, Peqlab
Skalpelle	Schreiber® Instrumente
Ultraschallgerät	Branson Digital Sonifier S-250D
UV Lampe	Ultra Violet Products Inc., USA
Zentrifugen:	Heraeus PICO 17
	Heraeus Cryofuge 6000i
	Sorvall RC6 Plus
	Megafuge 2.0 Heraeus
	Eppendorf 5810R
	Sorvall RC-5B

2.1.2 Chemikalien

Die meisten herkömmlichen Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth und Sigma bezogen. Wichtige Chemikalien und Ausnahmen werden hier gelistet.

Acrylamid Rotiphorese Gel ® 30 (37,5:1)	Roth
Acrylamis Rotiphorese Gel ® (PAA 29:1)	Roth
Agarose ME	Biozym
Ampicillin	Roth
Aprotinin	Sigma

APS	Sigma
ATP	Sigma
Benzamidine	Calbiochem, USA
BME	Sigma
Bromphenolblau	Merck
BSA (Serum Albumin), 89% pur	Sigma
BSA (gereinigt in Lösung)	NEB
β-Mercaptoethanol	Sigma
Chloramphenicol	Roth
Comassie Brilliant Blue G 250	SERVA
dNTP-Mix	NEB
DTT (Dithiothreitol)	Roth
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Guanidium-Cl	Sigma
Hepes	Roth
IPTG	Roth
LB Medium Puder	Serva
LB Agar Puder	Serva
Leupeptin	Genaxxon
NADH	Sigma
NP 40 (Igepal CA-630)	Sigma
Orange G	Sigma
PEP	Sigma
Pepstatin	Genaxxon
Phenol	Roth
PMSF	Sigma
SDS	Serva
TEMED	Roth
Tween 20	Sigma

2.1.3 Materialien für die Filtration, Dialyse und Proteinreinigung

Amicon Ultra Filter Units	Millipore
Miracloth	VWR
Spritzen Filter 0,45 µm	VWR
Dialyse Membranschläuche	Spectrum Laboratories Inc., USA

TLC PEI Cellulose F25	Merck
HiTrap SP FF 5 ml	GE Healthcare
HiTrap Q HP 1 ml	GE Healthcare
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare
MonoS 5/50	GE Healthcare
HisTrap HP 5 ml	GE Healthcare
HiTrap TM DEAE FF 5 ml	GE Healthcare

2.1.4 *E.coli* Stämme

DH5α	Labor Stamm
BL21-Gold (DE3)	Stratagene

2.1.5 Enzyme, Kits, DNA-Marker, Protein-Marker und Enzympuffer

Apyrase (50 U/ml)	NEB
<i>Alkaline Phosphatase, shrimp</i>	Roche
Benzonase	Merck
Gel-Extraktionskit	Qiagen
Giga Prep Kit	Macherey Nagel
LDH/PK (1300 U/ml)	Sigma
<i>Lysozyme (chicken egg white 183000 U/mg)</i>	Serva
MaXtract High Density 2 ml	Qiagen
Plasmid Mini, Maxi, Giga Kits	Qiagen
Proteinase K (10 mg/ml)	Roche
Restriktionsenzyme	NEB
T4 Ligase (400 U/μl)	NEB
T4 Ligase (2000 U/μl)	NEB
Taq-Polymerase (500 U/μl)	NEB
Taq-Ploymerase pFMP 222	Siehe 2.13
1 kb DNA-Marker	NEB
100 bp DNA-Marker	NEB
PeqGOLD Protein-Marker	Peqlab Biotechnologie
Thermopol Puffer	NEB
Puffer 1; 2; 3; 4	NEB
T4 Ligase Puffer	NEB
Elutionspuffer	Qiagen

2.1.6 Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) hergestellt.

Tab. 1: Auflistung der für die Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Oligo Name	Oligo Beschreibung	Sequenz (5' - 3')
oFMP 296	fw Primer für die Herstellung (PCR) des PCRA 217	CCATTTGAGGGGACAATGGGACTCTGG GACCAGGAGTATATATCTGACACGTGC CTGG
oFMP 297	rv Primer für die Herstellung (PCR) des PCRA 217 (Dralll RES)	CTCAATCACCCCGTGGACGCTATACGC GGCCGC
oFMP 298	fw Primer für die Herstellung (PCR) des PCRA 213 (Dralll RES)	ATTGAGCACGGGGTGGAGGTCGCTGTT CAATACATGCAC
oFMP 299	rv Primer für die Herstellung (PCR) des PCRA 213 (CY5 am 5' Ende)	TACGGAATTAGAGCCCTCAATGGACGA GCCTGGAGAATCCCGGTGC
oFMP 296_dimer	fw Primer für die Herstellung (PCR) des Dimer PCRA 217+213	CCATTTGAGGGGACAATGGGACTC
oFMP 299_dimer	rv Primer für die Herstellung (PCR) des Dimer PCRA 217+213 (CY5 am 5' Ende)	TACGGAATTAGAGCCCTCAATGGAC
oFMP 300	fw Primer für die Sequenzierung des PCRA 213 (DRAIII)	CCATTTGAGGGGACAATGGGACTCTGG GAC
oFMP 301	fw Primer für die Sequenzierung des PCRA 217 (Dralll)	TACGGAATTAGAGCCCTCAATGGACGA G
oFMP 304	rv Primer, Sequenzierung pFMP 232 (insert 601 WT)	GCGGTGCTATCGCGA
oFMP 305	rv Primer, Sequenzierung pFMP 232 und pFMP 233 (AfeI)	GCGGTGCTAACCGGT
oFMP 306	rv Primer, Sequenzierung pFMP 232 und pFMP 233 (BamHI)	GTTTAAGCGGTGCTAGGATCC
oFMP 307	fw Primer, Sequenzierung pFMP 232 und pFMP 233 (NgoMIV)	GGTCGTAGCGCCGGC
oFMP 308	fw Primer, Sequenzierung pFMP 232 und pFMP 233 (NsiI)	CAATTGGTCGTAGCATGC AT
oFMP 309	fw Primer, Sequenzierung pFMP 232 und pFMP 233 (AfeI)	GGTCGTAGCAGCGCT
oFMP 310	rv Primer, Sequenzierung pFMP 233 (Insert 601 WT)	CAATTGGTCGTAGCTGTACA
oFMP 311	fw Primer, Sequenzierung pFMP 232 und pFMP 233 (BglII)	CAATTGGTCGTAGCAGATCT

2.1.7 Plasmide

Tab. 2: Auflistung der für die Arbeit verwendeten Plasmide.

Name	Funktion	Vektor	Insert	Resistenz	Quelle
pFMP 128	Proteinexpression	pET15b	H2A	Amp	Müller-Planitz Labor
pFMP 129	Proteinexpression	pET15b	H2B	Amp	Müller-Planitz Labor
pFMP 166	12-mer 197 bp 601 WT Isolierung	pUC18	25-mer 197 bp 601 WT	Amp	D. Rhodes Labor
pFMP 210	Proteinexpression	unbekannt	ISWI _{FL}	Amp/ Chloramphenicol	Müller-Planitz Labor
pFMP 213	PCR <i>Template</i> : Herstellung des PCRA 213	pUC18	Monomer 197 bp 601 WT	Amp	Diese Arbeit
pFMP 217	PCR <i>Template</i> : Herstellung des PCRA 217	unbekannt	Monomer 197 bp 601, modifiziert	Amp	Bartholomew Labor
pFMP 222	Proteinexpression	unbekannt	Taq-Polymerase	Amp	Narlikar Labor
pFMP 226	Herstellung der 13-mer <i>Arrays</i> /13-mer Verlängerung	pUC57	13-mer 197 bp 601 MT	Amp	GenScript, USA
pFMP 227	13-mer Verlängerung	pUC57	13-mer 197 bp 601 MT	Amp	GenScript, USA
pFMP 232	Herstellung der 25-mer <i>Arrays</i>	pUC18	25-mer 197 bp 601 MT BamHI intern	Amp	Diese Arbeit
pFMP 233	Herstellung der 25-mer <i>Arrays</i>	pUC18	25-mer 197 bp 601 MT BamHI extern	Amp	Diese Arbeit
pFMP 236	13-mer Verlängerung	pUC18	13-mer 197 bp 601 MT	Amp	Diese Arbeit
pFMP 237	13-mer Verlängerung	pUC18	13-mer 197 bp 601 MT	Amp	Diese Arbeit

2.1.8 PCR-Amplifikate

Tab. 3: PCR-Amplifikate zur Herstellung von Mono- und Dinukleosomen.

PCRA Name	PCRA Beschreibung	Sequenz (5' - 3')	Primer	Template
PCRA 213	<p>PCRA zur Herstellung von Mononukleosom 213</p> <p>CY5-Marker am 3' Ende</p> <p><u>DRAIII</u> <u>Schnittstelle</u> am 5' Ende</p> <p>Nukleosomen positionierende Sequenz</p>	<p>ATTGAGCACGGGGTGG AGGTCGCTGTTCAATAC ATGCACAGGATGTATAT ATCTGACACGTGCCTG GAGACTAGGGAGTAAT CCCCTTGGCGGTTAAA ACGCGGGGGACAGCG CGTACGTGCGTTTAAAG CGGTGCTAGAGCTTGC TACGACCAATTGAGCG GCCTCGGCACCGGGAT TCTCCAGGCTCGTCCAT TGAGGGCTCTAATTCCG TA -CY5</p>	<p>oFMP 296 + oFMP 297</p>	pFMP 213
PCRA 217	<p>PCRA zu Herstellung von Mononukleosom 217</p> <p><u>DRAIII</u> <u>Schnittstelle</u> am 3' Ende</p> <p>Nukleosomen positionierende Sequenz</p>	<p>CCATTTGAGGGGACAAT GGGACTCTGGGACCAG GACGTATATATCTGACA CGTGCCTGGCGACTAG GGAGCGATCCCCTTGG CGGTAAAACGCGGGG GACAGCGCGTACGTGC GTTTAAAGCGGTGCTAG AGCTGTCTACGACCAA TTGAGCGGCCTCGGCA CCGGGATTCTCCAGGG CGGCCGCGTATAGCGT CCACGGGGTGATTGAG</p>	<p>oFMP 298 + oFMP 299</p>	pFMP 217
PCRA 213+217	<p>PCRA zur Herstellung von Dinukleosom 213+217</p> <p>CY5-Marker am 3' Ende</p> <p><u>DRAIII</u> <u>Schnittstelle</u> mittig lokalisiert</p>	<p>CCATTTGAGGGGACAAT GGGACTCTGGGACCAG GACGTATATATCTGACA CGTGCCTGGCGACTAG GGAGCGATCCCCTTGG CGGTAAAACGCGGGG GACAGCGCGTACGTGC GTTTAAAGCGGTGCTAG AGCTGTCTACGACCAA TTGAGCGGCCTCGGCA CCGGGATTCTCCAGGG CGGCCGCGTATAGCGT CCACGGGGTGAGGTC GCTGTTCAATACATGCA</p>	<p>oFMP 296_dimer + oFMP 299_dimer</p>	Ligationsprodukt von PCRA 213 und PCRA 217 (siehe 2.12.5)

Nukleosomen positionierende Sequenz	CAGGATGTATATATCTG ACACGTGCCTGGAGAC TAGGGAGTAATCCCCT TGGCGGTAAAACGCG GGGACAGCGCGTACG TGCGTTAAGCGGTGC TAGAGCTTGCTACGAC CAATTGAGCGGCCTCG GCACCGGGATTCTCCA GGCTCGTCCATTGAGG GCTCTAATTCCGTA - CY5
--	---

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 Färbung von Proteingelen

Fixing solution

50 % (v/v) Ethanol

10 % (v/v) Essigsäure

Staining solution

5 % (v/v) Ethanol

7,5 % (v/v) Essigsäure

Coomassie Blue Solution

0,25 % (w/v) Comassie

Brilliant Blue (G-250)

in Ethanol

2.2.2 Puffer für Agarose- und Proteingele

1x TAE

40 mM Tris-acetate

1 mM EDTA pH 8,0

5x TB pH 8,3

25 mM Tris-base

445 mM Borsäure

5x TBE pH 8,3

455 mM Tris-base

455 mM Borsäure

10 mM EDTA pH 8,0

SDS Laufpuffer

25 mM Tris

190 mM Glycine

0,1 % (w/v) SDS

2.2.3 Puffer zur Proteinreinigung von Histonen

Sau 0 Puffer	Sau 200 Puffer	Sau 1000 Puffer
8 M Urea	8 M Urea	8 M Urea
40 mM NaOAc pH 5,2	40 mM NaOAc pH 5,2	40 mM NaOAc pH 5,2
1 mM EDTA pH 8,0	1 mM EDTA pH 8,0	1 mM EDTA pH 8,0
5 mM BME	5 mM BME	5 mM BME
10 mM Lysine	10 mM Lysine	10 mM Lysine
	200 mM NaCl	1000 mM NaCl

2.2.4 Puffer zur Rekonstitution von Oktameren

Entfaltungspuffer	Refaltungspuffer
7 M Guanidium	2 M NaCl
20 mM Tris pH 7,5	10 mM Tris pH 7,5
10 mM DTT	1 mM EDTA pH 8,0
	5 mM BME

2.2.5 Puffer zur Proteinreinigung von ISWI_{FL}

HisB Puffer	MonoSB Puffer	S200 Puffer
50 mM Tris Cl pH 7,4	15 mM Tris Cl pH 8,0	50 mM Hepes KOH pH 7,6
300 mM NaCl	1 mM BME	0,2 mM EDTA
400 mM Imidazole pH 7,4	2 mM NaCl	200 mM KOAc
0,06 % (v/v) Tween 20		10 mM BME
10 % (v/v) Glycerol		

2.2.6 Puffer zur Proteinreinigung der Taq-Polymerase

A Puffer	B 1000 Puffer	Storage Puffer
50 mM Tris HCL pH 7,9	10 mM Tris HCL pH 7,9	10 mM Tris HCL pH 7,9
50 mM Dextrose	1 mM EDTA	0,1 mM EDTA
1 mM EDTA	0,5 mM Benzamidine	100 mM KCl
	0,5 % (v/v) Tween 20	50 % (v/v) Glycerol
	0,5 % (v/v) NP-40	0,5 mM Benzamidine
	1000 mM KCl	1 mM DTT

2.2.7 Puffer zur Herstellung von Nukleosomen-Arrays

Low Salt Puffer

10 mM Tris HCl pH 7,6
50 mM NaCl
1 mM EDTA pH 8,0
0,01 % NP-40
1 mM DTT

High Salt Puffer

10 mM Tris HCl pH 7,6
2 M NaCl
1 mM EDTA pH 8,0
0,01 % NP-40
1 mM DTT

No Salt Puffer

10 mM Tris HCl pH 7,6
1 mM EDTA pH 8,0
0,01 % NP-40
1 mM DTT

2.2.8 Puffer der Chromatin-Remodeling-Assays

1x Remodeling-Puffer A

25 mM Hepes pH 7,6
1 mM MgCl₂
0,1 mM EDTA
50 mM NaCl
10 % (v/v) Glycerol
0,2 mg/ml BSA

1x Remodeling-Puffer B

25 mM Hepes pH 7,6
50 mM NaCl
10 % (v/v) Glycerol
0,2 mg/ml BSA

2.2.9 Sonstige Puffer und Lösungen

Laemmli Puffer (5x)

0,225 M Tris pH 6,8
50 % (v/v) Glycerol
5 % (w/v) SDS
0,05 % (w/v) BPB
10 % (v/v) BME

BPB Loading Dye

0,1 mM EDTA pH 8,0
50 % (v/v) Glycerin
0,5 % (v/w) Bromphenolblau

TE Puffer

10 mM Tris HCl pH 8,0
0,1 mM EDTA pH 8,0

EX 50 Puffer

10 mM Hepes pH 7,6
50 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
0,5 mM EGTA pH 8,0

Quick-Ligation Puffer (QL)

66 mM Tris HCl
10 mM MgCl₂
1 mM DTT
1 mM ATP
6 % (v/v) PEG 6000 pH 7,6

2.3 Methoden zur Vermehrung, Quantifizierung und Analyse von DNA

2.3.1 Transformation kompetenter *E. coli*

Dreißig μl kompetente *E. coli* Zellen (DH5 α oder BL21(D3)) wurden mit 0,5 μl Plasmid-DNA versetzt. Handelte es sich um eine Transformation nach erfolgter Klonierung, wurde dieser Reaktionsansatz mit 50 μl DH5 α -Zellen und 5 μl Ligationsprodukt gebildet. Nach einer Verweildauer von 10 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Die Zellen ruhten danach 1 min auf Eis. Im Fall einer zuvor erfolgten Klonierung, wurden zum Transformationsansatz 500 μl LB-Medium beigefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer Minute Zentrifugation bei 2000 rpm in einer Tischzentrifuge wurden 450 μl des Überstands verworfen. Die Zellen wurden nach der Transformation auf einer Agarplatte mit Antibiotikaresistenz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.2 Anzucht von Bakterienkulturen

Eine einzelne Kolonie einer bewachsenen Bakterienplatte wurde gepickt und in 5 ml LB-Medium angeimpft. Bakterienkulturen wurden in unterschiedlichen Maßstäben herangezogen. Fünf ml für Mini-, 200 ml für Maxi- und 4 l für Giga-Plasmidaufreinigungen. Alle Bakterienkulturen wurden in LB-Medium angezogen. Die Kulturen enthielten verschiedene Antibiotikaresistenzen mit unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tab. 4). Die Inkubation erfolgte in einem Bakterienrührer bei 200 rpm und 37 °C. Bei einer gemessenen OD₆₀₀ zwischen 1,0 und 2,0 erfolgte die Ernte der *E. coli* Zellen mittels Zentrifugation in der Heraeus Cryfuge 6000i Zentrifuge bei 4 °C und 3500 rpm für 15 min.

Tab. 4: Antibiotikaresistenzen mit der verwendeten Konzentration.

Antibiotikaresistenz	Konzentration
Ampicillin	100 $\mu\text{g/ml}$
Chloramphenicol	33 $\mu\text{g/ml}$
Ampicillin/Chloramphenicol	200 $\mu\text{g/ml}$ / 33 $\mu\text{g/ml}$

2.3.3 Aufreinigung von DNA-Plasmiden

Zur Gewinnung von DNA-Plasmiden aus Bakterienzellen dienen die Qiagen Mini, Maxi und Giga Kits. Für einige Gigaprep-Aufreinigungen wurde das NucleoBond® PC 10000 Kit der Firma Machery Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Protokollen der Hersteller.

2.3.4 Gelelektrophorese von Agarosegelen

Die Agarose Gelelektrophorese wurde genutzt, um DNA-Banden ihrer Größe nach aufzutrennen, zu quantifizieren und zu analysieren [77]. Abhängig von der Größe und Menge der DNA-Banden dienten hierzu Agarosegele unterschiedlicher Konzentrationen (0,7-1,2 %) und Längen (7,0 und 20,0 cm). Für Standard DNA-Analysen wurden die kurzen Gele verwendet. Zur Analyse der *Remodeling-Assays* und zur Trennung großer DNA-Banden kamen die langen Gele zum Einsatz. Die dazu nötige Menge an Agarose wurde abgewogen und in 0,5x TBE oder 1x TAE Puffer aufgekocht. EtBr wurde in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml beigefügt. Der für die Gele verwendete Puffer diente auch als Laufpuffer. Als Standardmarker wurde der 1 kb sowie der 100 bp DNA-Marker von NEB verwendet. Nach Anlegen der Spannung wurden die DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt, mit UV-Licht visualisiert und mittels Geldog abfotografiert.

2.3.5 Ethanolfällung von DNA

Um DNA zu präzipitieren, wurden zu einem Volumen DNA 1/10 Volumen 3 M NaOAc pH 5,2 beigemischt. Zu diesem Gemisch wurden dann 2,5 Volumen Ethanol zugefügt. Diese Flüssigkeit wurde über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Morgen folgte eine Zentrifugation im Rotor SS34 (19000 rpm; 4 °C; 30 min). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, 15 min zentrifugiert und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in TE Puffer oder 10 mM Tris Cl pH 8,5 gelöst.

2.3.6 DNA-Gelextrahierung

Um einzelne DNA-Fragmente zu isolieren, wurden diese mittels Gelelektrophorese getrennt, mit UV Licht der Wellenlänge 365 nm visualisiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Je nach DNA-Menge im Gel wurden zur Extraktion unterschiedliche Methoden angewendet.

2.3.6.1 DNA-Gelextraktionskit

Zur Extrahierung kleiner Mengen DNA aus Agarosegel wurde das Gelextraktionskit von Qiagen verwendet. Die Anwendung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

2.3.6.2 Elutrap-Elektroelutionssystem

Um DNA im großen Maßstab aus Gelen zu eluieren, kam das Elutrap-Elektroelutionssystem der Firma Whatman zum Einsatz. Dieses bestand aus einer Elutionskammer, die durch eine semipermeable Membran (BT2) von der Probenkammer getrennt wurde. Die Probenkammer enthielt die Gelstücke. Zum Verschluss dieser zwei Kammersysteme diente jeweils eine

undurchlässige Membran (BT1). Der Elutionspuffer (1x TAE) wurde gleichmäßig in beide Kammern eingebracht, sodass alle Gelstücke von Puffer umspült wurden. Durch das Anlegen einer Spannung von 200 V migrierte die DNA durch die semipermeable BT2 Membran und wurde in der Elutionskammer gesammelt. Dieser Vorgang dauerte je nach Größe der DNA-Fragmente zwischen zwei und acht Stunden. Die eluierte DNA wurde im Abstand von zwei Stunden geerntet und mittels Ethanolfällung präzipitiert (siehe 2.3.5).

2.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dies erfolgte mit dem NanoDrop® des Herstellers Peqlab. Es wurde angenommen, dass eine Absorptionseinheit bei 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Zur Blindprobenmessung wurde der Puffer verwendet, in dem die DNA gelöst war.

2.4 Entwurf und Synthese der Plasmide pFMP 226 und pFMP 227

Um *Remodeling* zwischen einzelnen Nukleosomen eines Nukleosomen-Arrays zu unterscheiden, wurden DNA-Sequenzen entworfen, die auf jeder Nukleosomen positionierenden Sequenz eine individuelle Restriktionsschnittstelle besitzen. Der Entwurf dieser barkodierten Sequenzen wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

2.4.1 Entwurf von 13-mer Sequenzen mit individuellen Restriktionsschnittstellen

Das Plasmid pFMP 166 enthält fünfundzwanzig Wiederholungen einer 197 bp langen 601 *nucleosome positioning sequence* [78, 79]. Jede 197 bp Einheit dieser Sequenz enthält eine Nukleosomen positionierende Sequenz (147 bp) und eine Linker-Region (50 bp). Alle Nukleosomen positionierenden Sequenzen besitzen eine AluI Schnittstelle und die Linker-Regionen eine Aval Schnittstelle [79]. Basierend auf dieser 197 bp langen 601 *nucleosome positioning sequence* [78] wurden zwei DNA-Sequenzen entworfen, die aus dreizehn Wiederholungen der 197 bp langen Einheit bestehen [72]. Jede Nukleosomen positionierende Sequenz der 13-mer DNA-Sequenzen (147 bp) sowie die Linker-Regionen (50 bp) beherbergten im Gegensatz zu den Aval bzw. AluI Schnittstellen individuelle Restriktionsschnittstellen. In Abbildung 7 sind diese 13-mer Sequenzen anhand eines 2D-Nukleosomen-Modells dargestellt. Diese 13-mer Sequenzen wurden in zwei unterschiedlichen Ausfertigungen entworfen. Eine einzelne Aval Schnittstelle wurde der 13-mer Insertsequenz des Plasmids pFMP 226 am 3' Ende angefügt. Der 13-mer Sequenz des Plasmids pFMP 227 wurde diese Aval Schnittstelle am 5' Ende eingebaut. Somit lag die Aval Schnittstelle einer 13-mer Sequenz benachbart zur Restriktionsschnittstelle NruI (Abb. 7A),

und im anderen Fall war diese Aval Schnittstelle neben der BsrGI Restriktionsschnittstelle lokalisiert (Abb. 7B). Die Plasmidkarten sind im Kapitel 7.1.3 und 7.1.4 abgebildet.

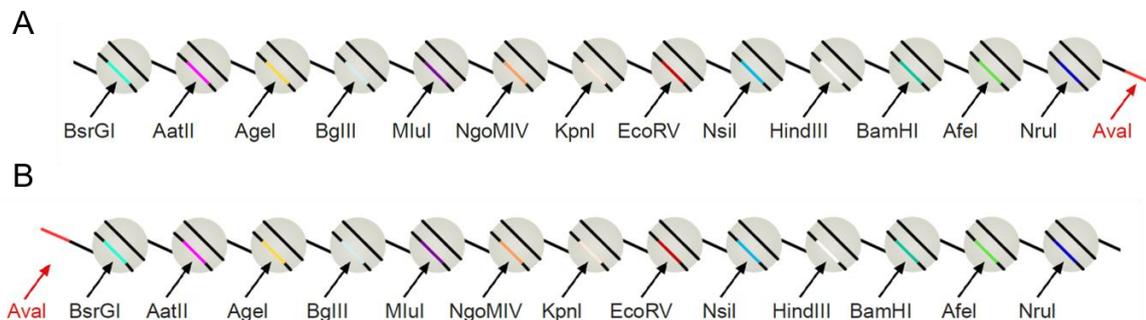


Abb. 7: 2D-Nukleosomen-Modell der 13-mer Insert-Sequenzen der Plasmide pFMP 226 und 227.

(A) Die 13-mer Insert-Sequenz des Plasmids pFMP 226 enthielt eine einzige Aval Schnittstelle, die benachbart zur Nrul Schnittstelle der dreizehnten Nukleosomen positionierenden Sequenz platziert war. (B) Die Insert-Sequenz des Plasmids pFMP 227 beinhaltete eine individuelle Aval Restriktionsschnittstelle, die benachbart zur BsrGI Schnittstelle der ersten Nukleosomen positionierenden Sequenz lag. Die dreizehn individuellen Restriktionsschnittstellen der Nukleosomen positionierenden Sequenzen sind mit unterschiedlichen Farben markiert. Die einzelnen Restriktionsschnittstellen der Linker-Regionen wurden in dieser Abbildung nicht visualisiert. Die Plasmidkarten sind im Anhang aufgeführt (siehe 7.1.3 und 7.1.4).

2.4.2 Synthese der Plasmide pFMP 226 und pFMP 227

Die Synthese und Klonierung der Plasmide pFMP 226 und pFMP 227 erfolgte durch die Firma GenScript. Die Plasmide basierten auf dem Vektor pUC57. Die Sequenzierung der Plasmide wurde durch die Firma GenScript bewerkstelligt. Die Plasmide wurden mittels Gigapräp (siehe 2.3.3) gereinigt.

2.5 Herstellung der Plasmide pFMP 232 und pFMP 233

Um Sequenzen zu generieren, die aus fünfundzwanzig repetitiven Einheiten der 197 bp langen Nukleosomen positionierenden Sequenz bestehen, wurden die in Kapitel 2.4.1 beschriebenen 13-mer Sequenzen zu 25-mer Sequenzen verlängert. Diese Verlängerung erfolgte durch eine Klonierungsstrategie, bei der die einzelne Aval Schnittstelle der Plasmide pFMP 236 und 237 eine entscheidende Rolle spielte (Abb. 27).

Die 13-mer langen Insert-Sequenzen der Plasmide pFMP 226 und 227 wurden in den Vektor pUC18 umkloniert. Im Gegensatz zu den Plasmiden pFMP 226 und 227 besaßen die dadurch entstandenen Plasmide pFMP 236 und 237 nur eine einzelne Aval Schnittstelle. Durch eine Klonierung an der Aval Schnittstelle (siehe Abb. 27) wurden die 13-mer Insert-

Sequenzen der Plasmide pFMP 236 und 237 mit einer 12-mer langen WT-Sequenz (12x 197 bp) verlängert [80]. Das 12-mer Fragment stammte aus der WT 601 Sequenz (pFMP 166). Die verlängerten 25-mer Sequenzen unterschieden sich lediglich durch die Lokalisation der dreizehn individuellen Restriktionsschnittstellen der barkodierten 13-mer Sequenzen. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Schritte der 25-mer Verlängerung näher erläutert.

2.5.1 Isolierung der 12-mer WT 601 Sequenz

Die 12-mer WT 601 Sequenz (12x 197 bp Einheiten) wurde mittels eines partiellen Aval Restriktionsverdau aus dem Plasmid pFMP 166 (siehe Tab. 2) isoliert. 56 µg des Plasmids pFMP 166 wurden mit 84 U Aval 45 min bei 37 °C verdaut. Die DNA-Konzentration während des Restriktionsverdaus betrug 170 ng/µl. Als Enzympuffer wurde der Puffer 4 (NEB) verwendet. Nach erfolgter Ethanol-fällung (siehe 2.3.5) wurden die DNA-Banden des partiellen Verdaus mit Hilfe eines Agarosegels (0,9 %; 0,5x TBE; 20,0 cm) separiert. Das 12-mer Fragment mit einer Länge von 2364 bp konnte unter UV-Licht (365 nm) identifiziert, ausgeschnitten und mit Hilfe der Elektroelutionsmethode (siehe 2.3.6.2) aufgereinigt werden.

2.5.2 Klonierung der 13-mer Inserts der Plasmide pFMP 226 bzw. 227 in pUC18

Um die 13-mer Insert-Sequenzen der Plasmide pFMP 226 und pFMP 227 (siehe Tab. 2) in den Vektor pUC18 umzuklonieren, wurden der Vektor pUC18 sowie die Plasmide pFMP 226 und pFMP 227 vollständig mit den Restriktionsenzymen XbaI, EcoRI und AseI in Puffer 2 (NEB) verdaut. Der verdaute Vektor pUC18 und die geschnittenen 13-mer Inserts, wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (0,7 %; 1x TAE; 7,0 cm) und dem Gelextraktionskit von Qiagen (siehe 2.3.6.1) gereinigt und anschließend ligiert. Die Ligationsansätze (10 µl) enthielten den geschnittenen und gereinigten pUC18 (10 ng), die Inserts sowie 5,0 µl 1x Ligationspuffer (QLB, siehe 2.2.9) und 200 U T4 Ligase (NEB). Die Masse der Inserts für die Ligationen wurde mit folgender Formel berechnet: $6x$ (Länge des Insert in bp/Vektorgröße in bp)* 10 ng. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 22 °C folgte die Transformation (siehe 2.3.1). Die transformierten und umklonierten Plasmide wurden selektiert, angezüchtet und aufgereinigt (siehe 2.3.2 und 2.3.3). Die Plasmide erhielten die Bezeichnung pFMP 236 bzw. pFMP 237 (siehe Tab. 2). Die Plasmidkarten sind im Anhang abgebildet (siehe 7.1.7 und 7.1.8).

2.5.3 Klonierung der Plasmide pFMP 232 und pFMP 233

Um DNA-Sequenzen zu generieren, die aus fünfundzwanzig 197 bp langen repetitiven Einheiten bestehen, wurde das 12-mer 601 Fragment (siehe 2.5.1) in die Aval Schnittstelle der Plasmide pFMP 236 und pFMP 237 (siehe Tab. 2) kloniert [80]. Die Plasmide pFMP 236

und 237 wurden Aval verdaut. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 5,7 µg Plasmid, 100 U Aval und Puffer 2 (NEB). Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37 °C, wurde zur Dephosphorylierung 30 µl *Alkaline Phosphatase shrimp* mit passendem Puffer beigemischt. Nach 4 h Inkubation folgte 20 min eine Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 80 °C. Die linear geschnittenen Plasmide wurden anschließend gelgereinigt (0,8 % Agarose; 1x TAE; 20,0 cm) und mit dem Gelextraktionskit von Qiagen extrahiert (siehe 2.3.6.1). Der Ligationsansatz für die Verlängerung erfolgte mit einer Insertmasse des 12-mer Fragments von: $12x (\text{Insertlänge in bp}/\text{Vektorgröße in bp})^* 10 \text{ ng}$. Neben der daraus resultierenden Insertmenge von 54 ng enthielten die 10 µl Ligationsansätze 10 ng der gereinigten, linearisierten Plasmide (pFMP 236 und 237), 1x Ligationspuffer (QLB) und 400 U T4-Ligase (NEB). Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 22 °C wurde der Ligationsansatz transformiert (siehe 2.3.1). Zur Kontrolle des Klonierungserfolges wurden einzelne Klone angezchtet, Plasmide isoliert, sequenziert und mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut (siehe 3.6.2). Die erfolgreich klonierten Plasmide (pFMP 232 und pFMP 233) konnten mittels Gigapräp (siehe 2.3.3) gereinigt werden. Die entsprechenden Plasmidkarten werden im Abschnitt 7.1.5 und 7.1.6 gezeigt. Die Lokalisation der individuellen Restriktionsschnittstellen innerhalb der 25-mer Insert-Sequenzen der Plasmide pFMP 232 und pFMP 233 wird in der folgenden Abbildung verdeutlicht (Abb. 8A und B).

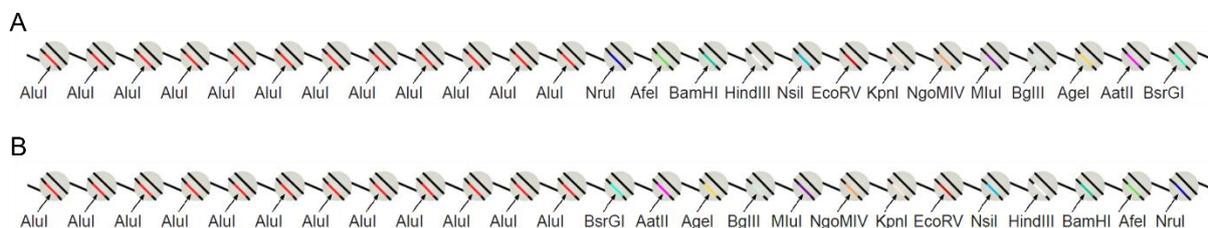


Abb. 8: 2D-Nukleosomen-Modell der 25-mer Inserts der Plasmide pFMP 232 und pFMP 233. (A) 25-mer Insert-Sequenz des Plasmids pFMP 232. Zwölf der Nukleosomen positionierenden Sequenzen beherbergten eine AluI Restriktionsschnittstelle. Die restlichen dreizehn Nukleosomen positionierenden Sequenzen besaßen an dieser Stelle eine individuelle Enzymschnittstelle. Die individuelle BamHI Restriktionsschnittstelle befand sich an einer internen Nukleosomenposition. (B) Beim 25-mer Insert des Plasmids pFMP 233 war die individuelle BamHI Restriktionsschnittstelle extern lokalisiert. Die entsprechenden Plasmidkarten sind im Anhang visualisiert (siehe 7.1.5 und 7.1.6).

2.6 Herstellung von DNA-Fragmenten für Nukleosomen-Arrays

Um Nukleosomen-Arrays *in vitro* herzustellen, mussten zunächst die Nukleosomen positionierenden 13-mer und 25-mer Insert-Sequenzen aus den jeweiligen Plasmiden herausgeschnitten werden.

2.6.1 Herstellung der DNA-Fragmente für 13-mer Nukleosomen-Arrays

Für die Herstellung von 13-mer Nukleosomen-Arrays wurde das Plasmid pFMP 226 mit den Enzymen EcoRI, HincII, AseI und ApaLI verdaut. Durch die Enzyme EcoRI und HincII wurde das 13-mer Insert vom Vektor getrennt [79]. Die restlichen Enzyme (ApaLI und AseI) dienten dazu, den Vektor in Fragmente von 54 bis 751 bp zu zerkleinern. Diese Fragmente wurden als *Competitor-DNA* bezeichnet [79, 81]. Plasmid-DNA (2,5 mg) wurde mit 2500 U EcoRI, 2500 U HincII, 2500 U AseI und 25000 U ApaLI verdaut. Der Verdau (60 ml) enthielt Puffer 2 (NEB) und BSA (100 µg/ml). Inkubiert wurde für vier Stunden im Wasserbad bei 37 °C. Eine analytische Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarosegels; 0,5x TBE; 7,0 cm; 150 ng DNA) bestätigte die Vollständigkeit des Verdau. Der Verdau wurde Ethanol gefällt (siehe 2.3.5). Um die DNA von Proteinen und anderen Verunreinigungen zu separieren, folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion [79]. Hierzu wurde das *MaXtract High Density Kit* von Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen. Nach dieser Extraktion folgte eine erneute Ethanolfällung (siehe 2.3.5). Das DNA-Pellet wurde in 10 mM Tris HCl pH 8,5 gelöst.

2.6.2 Herstellung der DNA-Fragmente für 25-mer Nukleosomen-Arrays

Um die *Array-DNA* für die 25-mer Nukleosomen-Arrays herzustellen, wurden jeweils 1,5 mg der Plasmide pFMP 232 und pFMP 233 mit 600 U EcoRI und HincII für zwei Stunden bei 37 °C verdaut (1 mg DNA/ml) [79, 81]. Grundlage des Verdau waren Puffer 2 (NEB) und BSA (100 µg/ml). Nach einer Hitzeinaktivierung von 20 min bei 65 °C folgte ein Verdau mit 900 U AseI für sechs Stunden. Nach erneuter Hitzeinaktivierung wurden 7450 U ApaLI zugegeben und über Nacht verdaut (37 °C). Vor Zugabe von ApaLI erfolgte eine Volumenerhöhung des Restriktionsgemischs mit Puffer 2 (NEB) von 1,5 ml auf 3 ml. Qualitätskontrollen erfolgten nach jedem einzelnen Schritt des Enzymverdau wie in 2.6.1 beschrieben. Die DNA Extraktion mittels Phenol-Chloroform erfolgte wie folgt: Zu 3 ml des Verdau wurde 1 Volumen Phenol-Chloroform zugefügt. Dieses Gemisch wurde gut durchmischt und bei 4 °C und 2000 rpm für 15 min abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 2.0). Gemäß der daraus entstandenen Phasentrennung wurde der wässrige Überstand mit der DNA von der organischen Phase abpipettiert und erneut Phenol-Chloroform extrahiert. Die am Ende des Vorgangs im Überstand enthaltene DNA wurde mittels Ethanol gefällt (siehe 2.3.5) und in 10 mM Tris HCl pH 8,5 gelöst.

2.7 Methoden zur Analyse und Herstellung von Proteinen

2.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Quantifizierung und Analyse von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [82]. Die untere Schicht der SDS-Gele bestand aus einem Trenngel (6 ml), das je nach Größe der Proteine eine Acrylamidprozentigkeit von 10-18 % besaß. Als oberste Schicht diente ein 4 % Sammelgel (2 ml). Die Novex *Mini Cell* Gelkassetten des Herstellers Invitrogen waren die verwendete Gelform für die Proteingele. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer Laemmli (siehe 2.2.9) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach erfolgreicher Trennung der Proteine wurde das Gel für 10 min in Suspensionspuffer (siehe 2.2.1) fixiert und für einige Sekunden in der Mikrowelle erhitzt. Danach folgte eine Färbung für 30 min in 50 ml *Staining Solution* (siehe 2.2.1).

2.7.2 Expression rekombinanter Histone in chemisch kompetenten *E. coli*

Die Histone H2A, H2B (*D.melanogaster*) und gH4 (*X.laevis*) wurden jeweils getrennt exprimiert und gereinigt. Um Histone im großen Maßstab zu exprimieren, waren die Plasmide mit der jeweiligen Histonsequenz (siehe Tab. 2) in BL21(D3)-Zellen transformiert und in Vorkulturen (5 ml) angezüchtet worden (siehe 2.3.1) [83]. Die Anzüchtung von gH4 erfolgte mittels einer Spatelspitze des gH4-Glycerolstocks in einer Vorkultur. Mit den Vorkulturen wurden 500 ml LB-Medien (Zwischenkulturen) angeimpft und über Nacht inkubiert. (siehe 2.3.2). Zwei l große LB-Medien wurden durch Zugabe der jeweiligen Zwischenkultur auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,05 verdünnt. Alle verwendeten LB-Medien enthielten Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml. Bei einer OD_{600} von 0,6 konnte die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert werden [83]. Nach weiteren drei Stunden Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, in Puffer Sau 200 resuspendiert, mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Um eine erfolgreiche Expression nachzuweisen, wurden kleine Mengen der Zellen auf ein 18 % SDS-PAGE aufgetragen und analysiert [83]. Die Expression der Histone H2A, H2B und gH4 erfolgte auf diese Art und Weise. Die Histone H3 und H4 (*D.melanogaster*) wurden freundlicherweise von Dr. Catherine Regnard zur Verfügung gestellt.

2.7.3 Proteinaufreinigung der Histone H2A, H2B und gH4

Die Bakterienzellen der Histone H2A, H2B und gH4 (siehe 2.7.2) wurden in warmem Wasser aufgetaut und mit Puffer Sau 200 versetzt (8 M Urea, 200 mM NaCl). Zu diesem Gemisch wurden 1 mM PMSF, Aprotinin, Leupeptin sowie Pepstatin hinzugegeben. Anschließend folgte die Aufschließung der Zellen mittels der *French Press* (3x 1500 PSI). Die Zellmasse

erhielt danach eine zweiminütige Ultraschallbehandlung bei einer Amplitude von 30 % (15 s *on*/30 s *off*) [83]. Für das gH4 erfolgte eine intensiviertere Ultraschallbehandlung für 5 min bei einer Amplitude von 30 % (10 s *on*/10 s *off*). Dieser Vorgang diente dem Zellaufschluss und der Scherung von DNA. Die Zellmasse wurde im SS34-Rotor bei 4 °C und 19.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Mira Cloth und einem 0,45 µm Filter gefiltert.

Der Überstand aus der Zentrifugation wurde auf eine 5 ml SP-Sepharose Säule (HiTrap SP FF) geladen. Diese Säule fungierte als Kationenaustauscher und wurde mit 20 % bzw. 10 % (bei gH4) Sau 1000 (200 bzw. 100 mM NaCl) äquilibriert. Dieser Kationenaustauscher bindet positiv geladene Proteine wie die Histone. Um die Histone von der Säule zu eluieren, wurde über 40 ml ein Salzgradient von 250-600 mM NaCl angelegt [83]. Da gH4-Histone bei niedrigeren Salzkonzentrationen eluieren, wurde bei dieser Aufreinigung ein Gradient von 150-600 mM NaCl angelegt. Die Fraktionen, welche die Histone enthielten wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt und in einem 6-8 kDa MWCO 1,7 ml/cm durchlässigen Membranschlauch dialysiert. Dialysiert wurde gegen ddH₂O (4 °C) über Nacht. Das Dialysat wurde im SS34-Rotor bei 19.000 rpm für 20 min abzentrifugiert.

Der Überstand wurde erneut gefiltert und auf eine mit Puffer QA (15 mM Tris Cl pH 8,0) äquilibrierte 1 ml Q-Sepharose Säule (HiTrap Q HP) aufgetragen [83]. Da es sich hierbei um einen Anionenaustauscher handelt, wurden die positiv geladenen Histone mit dem Durchfluss eluiert. Die hierbei gesammelten Histonfraktionen wurden vereinigt. Die Konzentration konnte bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und mittels des jeweiligen histonspezifischen Extinktionskoeffizienten bestimmt werden (siehe Tab. 5). Die Histone wurden in 0,6-1 mg Portionen aliquotiert, mit Flüssigstickstoff blitzgefroren und bei -80 °C gelagert [83]. Die Histone H3 und H4 wurden nicht wie beschrieben für diese Arbeit aufgereinigt, sondern freundlicherweise von Dr. Catherine Regnard zur Verfügung gestellt.

Tab. 5: Spezifische Extinktionskoeffizienten der Histone H2A, H2B, H3, H4 (*D.melanogaster*) und gH4 (*X.laevis*). Die Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe des Serviceprogramms *ProtParam tool* der Firma *SIB Swiss Institute of Bioinformatics* bestimmt. Dieses Programm ist über folgende Webseite verfügbar: <http://web.expasy.org/protparam/> [83, 84].

Histon	MW (kD)	ϵ_{280} (cm ² l/g)
H2A	13362	0.335
H2B	13696	0.544
H3	15388	0.290
H4	11381	0.524
gH4	9521	0.626

2.7.4 Expression von ISWI_{FL} in chemisch kompetenten *E.coli*

Das Plasmid pFMP 210 wurde in BL21(D3)-Zellen transformiert (siehe 2.3.1 und Tab. 2). Eine Vorkultur wurde angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Selektionsmedien dienten Ampicillin (200 µg/ml) und Chloramphenicol (33 µg/ml). Mittels Vorkultur wurden insgesamt 6 l Hauptkultur beimpft und bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,2 wurde die Kultur auf 20 °C abgekühlt und weiter inkubiert. Die Proteinexpression konnte bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 0,2 mM IPTG induziert werden [76]. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht wurden die Zellen aus insgesamt 6 l Hauptkultur geerntet (SLA3000, 4000 rpm, 10 min, 4 °C) und bei - 80 °C gelagert.

2.7.5 Proteinaufreinigung von ISWI_{FL} (His₆ -TEV, full length)

Um ISWI_{FL} aufzureinigen, wurden die geernteten Zellpellets aus insgesamt 6 l Kultur (siehe ISWI-Expression 2.7.4) aufgetaut und 0,5 mM BME, 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF sowie eine Tablette EDTA *complete free* (Roche) hinzugefügt. Zum Zellaufschluss folgten drei Durchläufe in der *French Press* (1500 PSI). Die anschließende Ultraschallbehandlung fand bei einer Amplitude von 15 % (6x 10 s *on*/10 s *off*) statt [76]. Danach wurden 24 µl Benzonase zugegeben und das Gemisch mit 5 % HisB Puffer (siehe 2.2.5) aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation im SS34-Rotor bei 19.000 rpm und 4 °C für 30 min.

Das ISWI-Konstrukt ISWI_{FL} (*His₆ -TEV, full length*) enthält einen His₆-Tag. Dies bedeutet, dass an den N-Terminus sechs Histidinmoleküle angehängt wurden. Diese Eigenschaft ermöglicht, dass dieses Protein von einer mit Nickel beschichteten Säule (HisTrap Hp) gebunden werden kann. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde mit einem 45 µm Filter filtriert und auf eine HisTrap Hp 5 ml Säule geladen, die mit 5 % HisB (siehe 2.2.5) äquilibriert wurde [76]. Durch Imidazol konnten die gebundenen Proteine eluiert werden. Die beladene Säule wurde mit 5 %, 10 % und 20 % HisB (siehe 2.2.5) gewaschen. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min und einem Gradienten von 20-100 % HisB (siehe 2.2.5) wurde ISWI_{FL} eluiert [76]. Die dabei gewonnenen Fraktionen wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt und die eluierte Proteinmenge mittels Bradford-Reaktion bestimmt.

Um die His₆-Tags abzuspalten, wurde die TEV-Protease (C.Müller, EMBL, Heidelberg) zum gereinigten ISWI_{FL} hinzugegeben [76]. Die Proteasenmenge entsprach etwa 1 % der zuvor bestimmten Proteinmasse. Dialysiert wurde das Gemisch in 150 mM NaCl, 15 mM Tris pH 8,0 sowie 10 mM Imidazol und 1 mM BME bei 4 °C über Nacht. Das Dialysat wurde erneut abzentrifugiert und der Überstand auf eine HisTrap Hp 5 ml Säule aufgetragen. ISWI_{FL} wurde nicht von der Säule gebunden, sondern mit dem Durchfluss eluiert und gesammelt [76]. Somit wurde ISWI_{FL} von der TEV-Protease und nicht His₆-Tag gespaltenen Proteinen

getrennt. Der Durchfluss wurde zur Kationenaustauschchromatographie auf eine MonoS 5/50 GL 1 ml Säule gegeben. Eluiert wurde bei einem Gradienten von 5-30 % Puffer MonoSB (siehe 2.2.5). ISWI_{FL} löste sich bei circa 15 % MonoSB (siehe 2.2.5) von der Säule. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt.

Beim letzten Schritt, der Gelfiltration, wurde die Superdex 200 10/300 Säule in S200 Puffer (siehe 2.2.5) äquilibriert. Die zuvor gesammelten ISWI_{FL}-Fraktionen, mit einem Molekulargewicht von 120 kDa wurden auf diese Säule geladen und von anderen Proteinen getrennt und fraktioniert [76]. Das aufgereinigte ISWI_{FL} wurde mittels dem *Amicon* 30000 MWCO *ultra centrifugal* Filter (Millipore) konzentriert [76]. Die Konzentrationsmessung erfolgte mit dem NanoDrop® (Peqlab) sowie dem spezifischen Extinktionskoeffizienten von ISWI_{FL} (ϵ_{280} : 119950 cm⁻¹ M⁻¹). Die aliquotierten Enzyme wurden mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei - 80 °C aufbewahrt.

2.8 Rekonstitution von Histonoktameren

Histonoktamere wurden aus jeweils zwei Molekülen H2A, H2B, H3 und H4 bzw. gH4 gebildet. Es wurden neben Wildtyp-Oktameren auch Mutanten hergestellt, die an Stelle von H4 ein H4-Mutante (gH4) enthielten. Dem Histon gH4 fehlen die neunzehn N-terminale Aminosäuren des Histons H4 [72].

Jeweils 3 mg der aufgereinigten Histone H2A, H2B, H3, und H4 bzw. gH4 wurden lyophilisiert. Die lyophilisierten Histone wurden in einer Konzentration von 2 mg/ml separat in Entfaltungspuffer (siehe 2.2.4) aufgenommen. Diese Proben rotierten 30 min auf einem Drehrad bei Raumtemperatur [79, 83, 85]. Es folgte eine Konzentrationsmessung (NanoDrop®) und eine Gelkontrolle der Histone (18 % SDS-PAGE). Anhand der ermittelten Histon-Konzentrationen und Mengen, wurden die vier Histone in stöchiometrischem Verhältnis gemischt, wobei die Histone H2A und H2B im 1,5-fachen Überschuss beigefügt wurden. Dies hatte zum Zweck, dass die Zusammenlagerung von H3/H4 Tetrameren vermieden wurde, da diese im Gegensatz zu H2A/H2B Dimeren schlecht von Oktameren zu trennen sind (Abb. 9) [83]. Anschließend wurde das Histongemisch in einem Membranschlauch der Durchlässigkeit 6-8 kDa MWCO über Nacht bei 4 °C in Refaltungspuffer (siehe 2.2.4) dialysiert. Das Dialysat wurde danach 15 min bei 13.0000 rpm und 4 °C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Zur Gelfiltration wurde der Überstand auf eine in Refaltungspuffer (siehe 2.2.4) äquilibrierte Superdex 200 10/300 GL Säule geladen. Hierbei wurden Proteine bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min der Größe nach getrennt und eluiert (siehe Abb. 9) [79, 83, 85]. Die eluierten Oktamere wurden in 0,5 ml Fraktionen gesammelt.

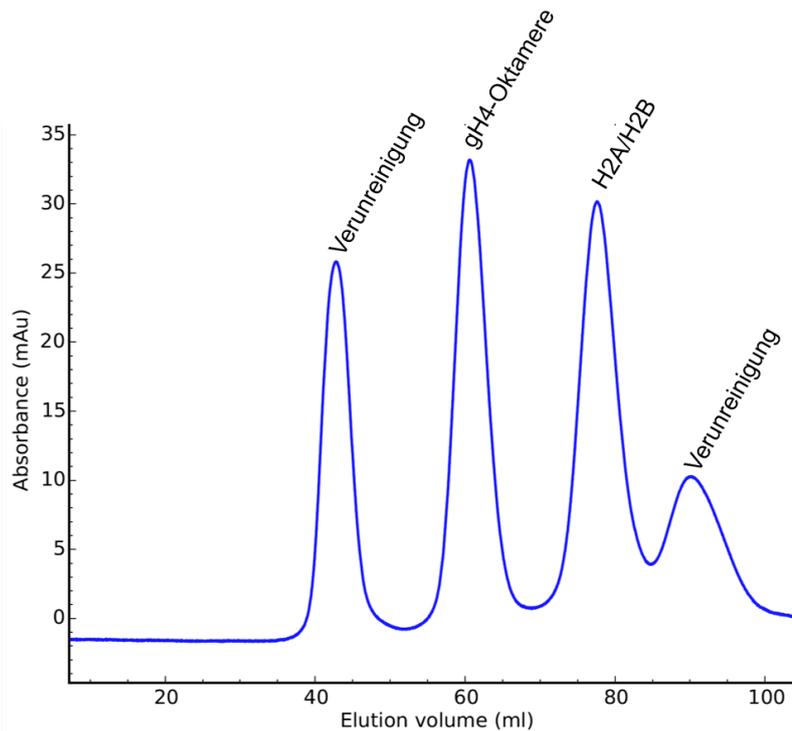


Abb. 9: Chromatogramm der Gelfiltration von gH4-Oktameren. Das Chromatogramm stellt die, bei der Gelfiltration von gH4-Oktameren separierten Proteinfractionen dar (Superdex 200 10/300 GL). Die eluierte Proteinmenge wird anhand der gemessenen UV-Absorption (*Absorbance*) bei 280 nm in Abhängigkeit des Elutionsvolumen (*Elution volume*) dargestellt. Bei einem Elutionsvolumen von circa 58-66 ml wurden die gH4-Oktamere eluiert. Bei circa 75-83 ml wurden die H2A/H2B Dimere gewonnen und konnten somit gut von den Oktameren getrennt werden. Die übrigen Fraktionen enthielten Proteinverunreinigungen.

Die zu Oktameren zusammengelagerten Histone sollten in einem stöchiometrischen Verhältnis vorliegen [12]. Um dies zu kontrollieren erfolgten Gelkontrollen (18 % SDS-PAGE) (siehe 3.1). Die eluierten Oktamer-Fractionen wurden gemischt und mit einem Amicon 30000 MWCO *ultra centrifugal* Filter (Millipore) konzentriert. Es folgte eine Konzentrationsmessung sowie eine spezifische Konzentrationsbestimmung der Oktamere mit Hilfe des jeweiligen Extinktionskoeffizienten (ϵ_{280}). Dieser Extinktionskoeffizient betrug $0,423 \text{ (cm}^2\text{I)/g}$ für die WT-Oktamere und $0,449 \text{ (cm}^2\text{I)/g}$ für gH4-Oktamere. Die Oktamere wurden in Flüssigstickstoff blitzgefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert [83].

2.9 Rekonstitution von 13-mer und 25-mer Nukleosomen-Arrays

2.9.1 Assemblierung von DNA und Oktameren zu Nukleosomen-Arrays

Die Assemblierung von DNA und Oktameren zu 13-mer und 25-mer Nukleosomen-Arrays erfolgte mit Hilfe einer graduellen Salzdialyse [12]. Hierfür wurden die in Kapitel (2.6) beschriebenen DNA-Fragmente und Oktamere (siehe 2.8) ausgehend von der Molarität in

einem äquimolaren Verhältnis in 2 M NaCl gemischt [86-88]. Das hierfür notwendige molare Verhältnis von DNA zu Oktameren wurde zuvor mittels Titration (molares Verhältnis von DNA zu Oktameren: 1:0,8/ 1:1,0/ 1:1,1/ 1:1,2) ermittelt [79]. Dreißig µg DNA und die dazu entsprechende Menge an Oktameren wurden in 300 µl (2 M NaCl; 10 mM Tris pH 7,6) vereinigt. Die ebenfalls in der DNA-Lösung enthaltene *Competitor*-DNA (siehe 2.6) wurde bei dieser Kalkulation nicht einbezogen. Die Salzdialyse der Proben erfolgte in einem hierfür speziell angefertigten Kammersystem bei 4 °C. Dieses bestand aus acht Kammern, die jeweils durch eine Membran (6-8 kDa MWCO; 25,5 mm; 5,1 ml/cm) in zwei Schichten unterteilt wurden. In den oberen Teil der Kammern wurden die Proben gegeben, und durch den unteren Teil floss der Puffer der graduellen Salzdialyse. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 2,0 ml/min wurden 3 l *Low Salt* Puffer in 1 l *High Salt* Puffer (siehe 2.2.7) gepumpt und gemischt. Dieses Gemisch wurde mit der gleichen Geschwindigkeit in das Kammersystem geleitet. Dieser Vorgang dauerte circa 25 Stunden [79]. Durch die graduelle Abnahme der Salzkonzentration lagerten sich die Nukleosomen positionierende Sequenzen (147 bp) der 13-mer und 25-mer Sequenzen auf die Oktamere und bildeten Nukleosomen bzw. 13-mer und 25-mer Nukleosomen-Arrays [12, 78]. Anschließend erfolgte eine Dialyse in *Low Salt* Puffer (siehe 2.2.7) für 2 Stunden. Die Proben aus der Salzdialyse wurden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und die Nukleosomen-Arrays mit dem Überstand abgenommen.

2.9.2 Magnesiumfällung der Nukleosomen-Arrays

Um die Nukleosomen-Arrays zu kompaktieren und von der *Competitor*-DNA zu trennen, erfolgte eine Magnesiumfällung der Array-Proben aus der Salzdialyse (siehe 2.9.1) [86, 89, 90]. Die zur Präzipitation notwendigen Konzentrationen an Magnesiumionen betragen für 13-mer Arrays 5 mM MgCl₂ bzw. 3,5 mM MgCl₂ für 25-mer Arrays [79, 81]. Zu einem Volumen Nukleosomen-Arrays wurde 1 Volumen 10 mM (13-mer) bzw. 7 mM (25-mer) MgCl₂ hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde vorsichtig vereinigt und 15 min auf Eis gelagert. Es folgte eine Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 4 °C und 13.000 rpm für 15 min. Das Pellet, welches die Arrays enthielt wurde in TE Puffer gelöst. Um mögliche Magnesiumverunreinigungen zu vermeiden, wurden die Arrays in 7.000 MWCO dialyze units (*Slyde-A-Lyzer*) über Nacht gegen einen Puffer bestehend aus 10 mM Tris pH 7,6 und 50 µM EDTA dialysiert. Die Konzentrationsbestimmung der Arrays erfolgte durch eine Konzentrationsmessung bei 260 nm (NanoDrop®, Peqlab). Um den Erfolg der Magnesiumfällung zu kontrollieren, wurden 200 ng des Überstands, des Pellets sowie des Inputs auf einem nativen Agarosegel (0,7 %; 0,2x TB; 7,0 cm) analysiert (siehe 3.1.1 und 3.6.3) [79, 81]. Die Gele wurde 30 min in 0,2x TB, 10x EtBr gefärbt und 15 min in Wasser entfärbt.

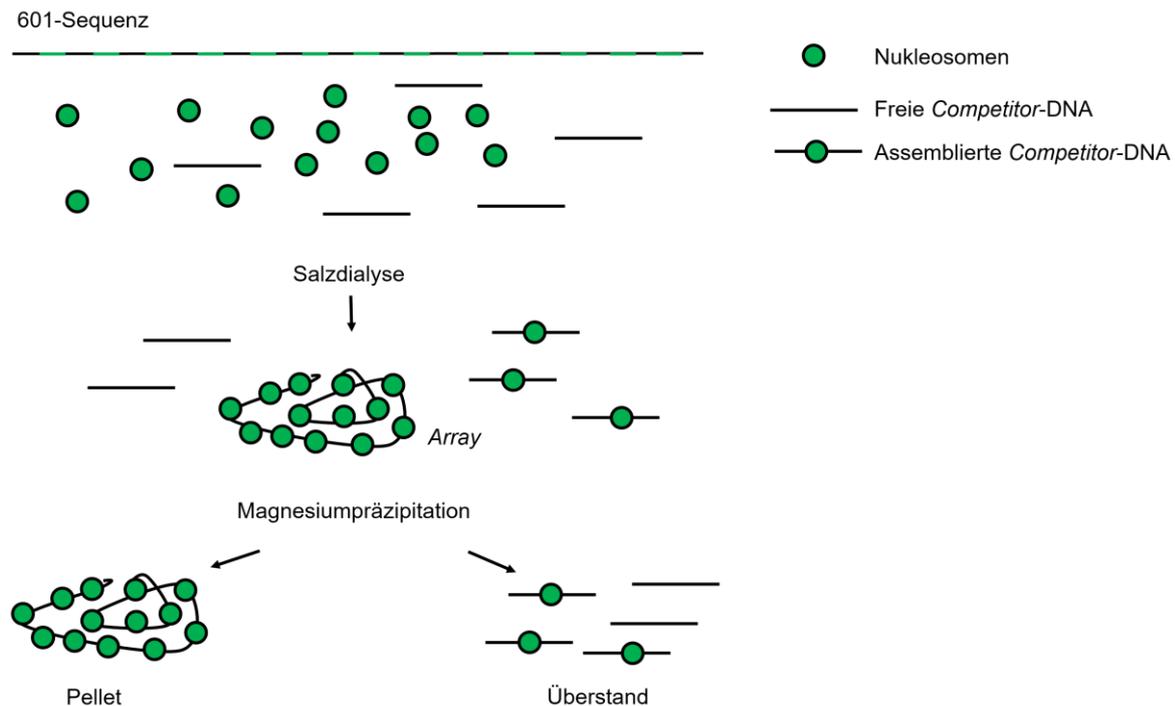


Abb. 10: Prinzip der Rekonstitution von Nucleosomen-Arrays. Nach der Assemblierung der Nucleosomen-Arrays durch die Salzdialyse folgte die Magnesiumfällung. Durch diesen Schritt wurden die Nucleosomen-Arrays präzipitiert, und von der freien *Competitor*-DNA sowie der mit Oktameren assemblierten *Competitor*-DNA separiert [79, 90]. Die Arrays waren im Pellet und die *Competitor*-DNA im Überstand enthalten.

2.9.3 Qualitätskontrollen der 13-mer und 25-mer Nucleosomen-Arrays

Um die Sättigung der Arrays zu überprüfen, wurden diese mit den Restriktionsenzymen BsiWI und NotI verdaut.

Jede Nucleosomen positionierende Einheit (147 bp) der 13-mer und 25-mer Sequenzen besitzt eine BsiWI Schnittstelle (siehe 3.1.1 und 3.6.3) [72]. In 20 µl Verdau wurden 250 ng der Arrays mit 20 U BsiWI in *Remodeling*-Puffer A (siehe 2.2.8) verdaut. Inkubiert wurde 1 Stunde bei 26 °C. Der Verdau wurde mit 20 mM EDTA gestoppt und anschließend mit 0,3 % SDS und 0,3 mg/ml Proteinase K gemischt und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert [79, 81]. Danach folgte eine Ethanolfällung (siehe 2.3.5). Die gefällte DNA wurde mit Probenpuffer (BPB) versetzt und auf einem 1 % Agarosegel (7,0 cm; 0,5x TBE) analysiert.

Die Linker-Regionen der 13-mer und 25-mer Sequenzen enthalten eine NotI Schnittstelle (siehe 3.1.1 und 3.6.3). 200 ng Arrays wurden mit 40 U NotI verdaut. Das Reaktionsvolumen betrug 15 µl und als Puffer diente EX 50 (siehe 2.2.9). Inkubiert wurde für 3 Stunden bei 26 °C. Die Proben wurden anschließend mit 3 µl *orange dye* versetzt und mittels nativem

Agarosegel (1,1 %; 7,0 cm; 0,2x TB) kontrolliert [79, 81]. Gefärbt wurde das native Gel wie in 2.9.2 beschrieben.

2.10 Analytische Magnesiumfällung von Nukleosomen-Arrays

Um die Kompaktheit und Faltung der 13-mer und 25-mer Nukleosomen-Arrays in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration zu ermitteln, wurde eine analytische Magnesiumfällung mit 13- und 25-mer Arrays durchgeführt. Arrays einer Konzentration von 0,1 µg/µl wurden mit Magnesiumkonzentrationen von 0 bis 3,5 mM bzw. 2,5 mM MgCl₂ versetzt. Die Proben hatten ein Gesamtvolumen von 10 µl. Als Puffer diente der *Remodeling*-Puffer B (siehe 2.2.8). Die Proben inkubierten für 30 min bei 26 °C und wurden anschließend in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (13.000 rpm; 4 °C; 15 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 10 µl TE gelöst. Die Konzentration des Pellets und des Überstands wurde bei 260 nm (NanoDrop®, Peqlab) gemessen.

2.11 Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays

Chromatin-*Remodeling*-Reaktionen wurden mit Hilfe eines *Restriction-Enzyme-Accessibility*-Assays analysiert [72, 79, 91]. Eine *Remodeling*-Reaktion enthielt Arrays in einer Mononukleosomen-Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M sowie 1x Regenerierungssystem (siehe Tab. 6), 1x *Remodeling*-Puffer A (siehe 2.2.8) und 5 µM ATP.

Tab. 6: ATP-Regenerierungssystem

20x Regenerierungssystem

120 mM Phosphoenolpyruvat

310 U/ml Pyruvatkinase-Laktatdehydrogenase

20 mM DTT

Die *Remodeling*-Reaktion wurde mit 200 nM ISWI gestartet und bei 26 °C inkubiert [79]. Nach 1, 3, 10, 30 und 90 bzw. 120 oder 180 min wurden Reaktionsproben entnommen und mittels Apyrase gestoppt (50 mU; 1 min; 26 °C) [72, 79]. Nach dem Apyrase-Stopp wurden die Zeitpunkte (20 µl *Timepoints*) mit dem jeweiligen Restriktionsenzym in einer Konzentration von 10 U/125 ng Array verdaut. Nach einer Inkubation von 90 min bei 26 °C wurde der Enzymverdau durch die Zugabe von 20 mM EDTA und 0,5 % SDS beendet. Anschließend folgte ein Verdau mit Proteinase K (Endkonzentration 0,5 mg/ml) bei 37 °C für 3 Stunden [79, 81]. Danach wurden die Proben mit Ethanol gefällt (siehe 2.3.5). Die geschnittenen und ungeschnittenen DNA-Banden (*Cut*-DNA und *Uncut*-DNA) wurden mittels Gelelektrophorese (Agarosegele; 0,5x TBE; 20,0 cm) getrennt [79, 81]. Zur Analyse der

Assays mit 13-mer *Arrays* sowie der zentralen Nukleosomenposition der 25-mer *Arrays* diente ein 0,9 % Agarosegel. Zur Gelelektrophorese der externen Nukleosomenposition der 25-mer *Arrays*, wurde ein 0,7 % Gel verwendet. Alle Gele sowie die Laufpuffer enthielten eine EtBr-Konzentration von 0,5 µg/ml.

2.11.1 Variation der MgCl₂ Konzentration in Chromatin-Remodeling-Assays

Um die Chromatin-Remodeling-Aktivität von ISWI in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration zu bestimmen, wurden Chromatin-Remodeling-Assays mit zwei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen durchgeführt und verglichen. In den Assays mit 13-mer *Arrays* entsprach dies MgCl₂ Konzentrationen von 0,3 mM und 2,5 mM. Für die *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* der 25-mer *Arrays* wurden Remodeling-Reaktionen mit einer Konzentration von 0,2 mM und 1,7 mM MgCl₂ verglichen. Um Magnesiumverunreinigungen zu beseitigen, wurden zuvor alle *Arrays* über Nacht in 10 mM Tris pH 7,6 dialysiert (4 °C). Als Puffer für diese Assays diente der *Remodeling-Puffer B* (siehe 2.2.7). Nach dem Apyrase-Reaktions-Stopp wurde die Magnesiumkonzentration der Reaktionsproben wieder angeglichen, sodass die Restriktionsenzymverdau unter einheitlichen Bedingungen abliefen. Die 13-mer *Array*-Proben wurden hiermit alle auf eine Konzentration von 2,5 mM MgCl₂, und die 25-mer *Array*-Proben auf eine Konzentration von 1,7 mM MgCl₂ angeglichen. Ansonsten wurden die Versuche genauso durchgeführt wie in Abschnitt 2.11 beschrieben.

2.11.2 Variation der ISWI-Konzentration in Chromatin-Remodeling-Assays

Es wurden Chromatin-Remodeling-Assays durchgeführt, bei denen die ISWI Konzentration variiert wurde (40 nM und 500 nM ISWI). Diese Versuche wurden mit einer Mononukleosomen-Konzentration von 400 nM durchgeführt. Als Puffer wurde *Remodeling-Puffer A* (siehe 2.2.7) verwendet. Die *Timepoints* dieser Versuchsreihen betragen 1, 3, 10, 30, 120 und 270 min. Die Durchführung der *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* erfolgte abgesehen von den oben beschriebenen Abweichungen wie in Kapitel 2.11 beschrieben.

2.11.3 Quantifizierung der Chromatin-Remodeling-Assays

Die Quantifizierung der *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* erfolgte mit der *AIDA Image Analyzer Software* [79, 81]. Anhand der Gelanalysen aus den *Remodeling-Assays* (siehe 2.11), wurde der prozentuale Anteil der geschnittenen DNA (*Cut-DNA*) mit Hilfe dieses Programms bestimmt [91]. Dieser Wert wurde als die maximal erreichte DNA-Zugänglichkeit (cut_{max}) der *Arrays* bewertet. Mit Hilfe des Programms *KaleidaGraph 4.0 (Synergy Software)* konnten die Zeitpunkte einer *Remodeling*-Reaktion gemeinsam zu einer Exponentialfunktion

geplottet werden: ($y = 100 * (1 - e^{-k_{obs} * t})$). Anhand der daraus resultierenden Funktionen, konnte die Reaktionsgeschwindigkeit (k_{obs}) von ISWI ermittelt werden.

2.12 Methoden zur Herstellung von Mono- und Dinukleosomen

Im folgenden Kapitel wird die Herstellung von Mono- und Dinukleosomen beschrieben.

2.12.1 Herstellung der Monomer-DNA-Sequenzen

Die DNA-Sequenzen zur Herstellung von Mononukleosomen wurden mittels PCR aus den Plasmiden pFMP 213 und pFMP 217 (siehe Tab. 2) amplifiziert. Die hierfür verwendete Taq-Polymerase wird in Kapitel 2.13 beschrieben. Ein quantitativer PCR-Mix wurde in einem Gesamtvolumen von 10 ml hergestellt.

Die PCR setzte sich aus folgenden Schritten zusammen: ① Initiale Denaturierung; ② Denaturierung; ③ *Annealing*; ④ Extension; ⑤ finale Extension und ⑥ *Hold*. Die Schritte ②-④ durchliefen 30 Zyklen.

Die PCR-Amplifikate PCRA 213 und 217 enthalten eine endständige DralIII Schnittstelle (siehe Tab. 3). Ziel war es, die beiden PCR-Amplifikate nach erfolgtem DralIII Verdau miteinander zu ligieren, um eine Dimer große Sequenz herzustellen [92]. Der Primer oFMP 199 enthielt am 5' Ende ein Cyanin Fluoreszenzmarker (CY5) (siehe Tab. 1), sodass die amplifizierte Sequenz PCRA 213 diesen CY5-Marker am 3' Ende beinhaltete (siehe Tab. 3).

2.12.2 PCR zur Amplifikation der Sequenz PCRA 213

Die Zusammensetzung des PCR-Mix zur Amplifikation des PCRA 213 wird in der folgenden Tabelle beschrieben.

Tab. 7: PCR Mix PCRA 213.

Primer 1	oFMP 298 (200 nM)
Primer 2	oFMP 299 (200 nM)
<i>Template</i>	pFMP 213 (200 ng)
Thermopol Puffer (NEB)	1x
dNTP (NEB)	10 mM
Taq-Polymerase pFMP 222	100 U
ddH ₂ O	auffüllen auf 10 ml

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

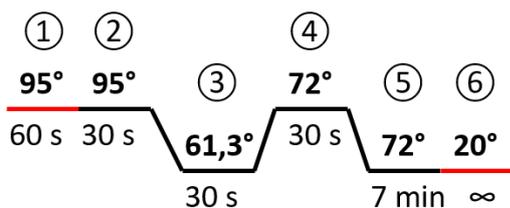


Abb. 11: Ablauf der PCR zur Herstellung des PCRA 213 (siehe 2.12.1). Die Temperaturen der jeweiligen PCR-Zyklen werden in Celsius (°C) angegeben.

2.12.3 PCR zur Amplifikation der Sequenz PCRA 217

Der PCR-Mix zur Amplifikation des PCRA 217 wird in der folgenden Tabelle beschrieben.

Tab. 8: PCR Mix Monomer PCRA 217

Primer 1	oFMP 296 (200 nM)
Primer 2	oFMP 297 (200 nM)
Template	pFMP 217 (200 ng)
Thermopol Puffer (NEB)	1x
dNTP (NEB)	10 mM
Taq-Polymerase pFMP 222	100 U
ddH ₂ O	auffüllen auf 10 ml

Die PCR lief unter folgenden Temperatur- (°C) und Zeitbedingungen ab:

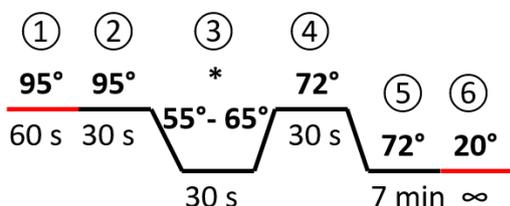


Abb. 12: Ablauf der PCR zu Herstellung des PCRA 217 (siehe 2.12.1). * Bei diesem Schritt erfolgte eine Temperaturerhöhung von 0,5 °C über 20 Zyklen.

2.12.4 Dralll Verdau und Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Nach der PCR wurden die Proben der PCR-Amplifikate PCRA 213 und 217 getrennt gesammelt, mittels Ethanol präzipitiert und in Elutionspuffer (Qiagen) aufgenommen (siehe 2.3.5). Verdünnte Mengen der gefällten PCR-Produkte wurden anhand von 100 bp Marker-Banden quantifiziert und die Konzentration bestimmt (1,2 % Agarosegel; 0,5x TBE; 7 cm). Es folgte ein Dralll Verdau beider PCR-Amplifikate.

Der Dralll Verdau enthielt eine DNA-Konzentration von 0,1 µg/µl. Ein µg DNA wurden mit 7 U Dralll in 1x Puffer 3 (NEB) verdaut. Inkubiert wurde 6 Stunden bei 37 °C. Es folgte eine

Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65 °C. Gelgereinigt wurden die geschnittenen DNA-Sequenzen mittels eines 20 cm langen, 1,4 % Agarosegels (1x TAE) (siehe 2.3.6). Die Gelelektrophorese wurde unter einer Spannung von 130 V durchgeführt. Die DNA-Banden konnten im unteren Drittel des Gels ausgeschnitten und mittels Elektroelution extrahiert werden (siehe 2.3.6.2). Anschließend wurde die DNA-Konzentration gemessen (siehe 2.3.7).

2.12.5 Ligation der PCR-Amplifikate PCRA 213 und 217

Um eine Dimer-Sequenz herzustellen, wurden die DralII geschnittenen und gereinigten PCR-Amplifikate PCRA 213 und 217 miteinander ligiert. Ein Ligations-Mix von 20 µl enthielt jeweils 2 pmol der Monomer-Sequenzen PCRA 213 und 217, 2000 U Ligase (2000 U/µl; NEB), 1x T4 Puffer (NEB) und ddH₂O [92]. Der Ligations-Mix wurde für 1 Stunde bei 24 °C inkubiert und anschließend mittels Gelelektrophorese (1 % Agarose; 0,5x TBE; 7 cm) überprüft (siehe 3.11.1).

2.12.6 Herstellung von Dimer-DNA-Sequenzen

Um Dimer-DNA-Sequenzen in großen Mengen herzustellen, wurde das Ligationsprodukt der ligierten Amplifikate PCRA 213 und PCRA 217 mittels 1,2 % Agarosegel (0,5x TBE; 7 cm) gereinigt (siehe 2.3.6) und mit dem Qiagen Extraktionskit eluiert (siehe 2.3.6.1). Die ligierte Dimer-Sequenz diente als *Template* für eine PCR, bei der diese Dimer-Sequenz amplifiziert wurde (siehe Tab. 9). Die Sequenz des PCR-Amplifikats PCRA 213+217 befindet sich in der Tabelle 3. Nach der PCR wurde das PCR-Produkt genau wie in Abschnitt 2.12.4 beschrieben gereinigt und analysiert.

Tab. 9: PCR Mix PCRA 213+217

Primer 1	oFMP 296_dimer (200 nM)
Primer 2	oFMP 299_dimer (200 nM)
<i>Template</i>	Dimer pFMP 213+217 (200 ng)
Thermopol Puffer (NEB)	1x
dNTP (NEB)	10 mM
Taq-Polymerase pFMP 222	100 U
ddH ₂ O	auffüllen auf 10 ml

Die Schritte der PCR sind unter diesen Bedingungen abgelaufen:

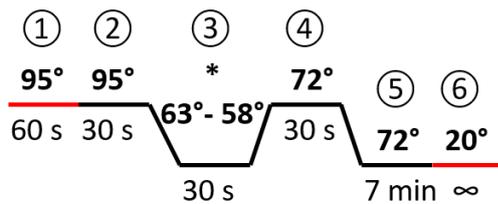


Abb. 13: Ablauf der PCR zu Herstellung des Dimers pFMP 213+217 (siehe 2.12.1). * Die Temperatur des *Annealing*-Schrittes wurde über 10 Zyklen um jeweils 0,5 °C verringert und dann für 20 Zyklen konstant auf 58 °C gehalten.

2.12.7 Rekonstitution von Mono- und Dinukleosomen

Die Rekonstitution von Mono- und Dinukleosomen erfolgte mittels einer graduellen Salzdialyse [19, 93]. In Vorversuchen wurde mittels Titration das optimale molare Verhältnis von Monomer-DNA bzw. Dimer-DNA zu Oktameren ermittelt (molares Verhältnis DNA zu Oktameren: 1:0,8/ 1:1,0/ 1:1,1/ 1:1,2). Es wurden Mono- und Dinukleosomen mit Wildtyp- und gH4-Oktameren hergestellt. Die jeweiligen Oktamere und DNA-Fragmente wurden nach der ermittelten Ratio gemischt und in Dialyse *Tubes* (*Slide A Lyzer*, 7,000 MWCO) gefüllt. Die Proben wurden für 2 Stunden bei 4 °C in 1 l *High Salt Puffer* (20 mM Tris HCl pH 7,6; 2 M KCL; 0,1 mM EDTA pH 8,0) dialysiert. Über einen Zeitraum von circa 24 Stunden wurden 3 l *Low Salt Puffer* (20 mM Tris HCl pH 7,6; 50 mM KCL; 0,1 mM EDTA pH 8,0) mit einer Geschwindigkeit von circa 2 ml/min in den *High Salt Puffer* gepumpt und vermischt. Mit derselben Geschwindigkeit wurde Flüssigkeit aus dem Puffergemisch ausgeleitet [19, 93]. Nach der graduellen Salzdialyse folgte ein zweistündiger Dialyseschritt in einem *No Salt Puffer* (10 mM Tris HCL pH 7,6). Danach wurden die assemblierten Mononukleosomen bzw. Dinukleosomen in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und die Konzentration bestimmt (260 nm, NanoDrop®, Peqlab).

2.12.8 Qualitätskontrollen der Mononukleosomen

Um die Qualität von Mononukleosomen zu überprüfen, wurden 200 ng Mononukleosomen mittels eines 5 % nativen Polyacrylamidgels (PAA 29:1) analysiert. Die Nukleosomen-Proben wurden mit einem Ladepuffer (50 % Glycerol; 50 % Tris HCL pH 7,5) versetzt. Das Polyacrylamidgel erhielt einen Vorlauf mit 100 V für 30 min bei 4 °C. Das mit den Proben beladene Gel wurde dann unter 80 V gefahren. Monomere mit dem Fluoreszenzmarker CY5 wurden mittels des *Fuji FLA 300 Scanners* bei einer Wellenlänge von 633 nm und der *AIDA Image Analyzer Software* visualisiert. Anschließend wurde das Gel mit EtBr gefärbt.

2.12.9 Qualitätskontrollen der Dinukleosomen

Die Qualitätskontrollen der Dinukleosomen wurden wie in 2.12.8 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich erfolgten weitere Enzymverdaus zur Kontrolle der Sättigung der Dinukleosomen. Die Nukleosomen positionierende Sequenzen wurden mittels eines AluI Verdaus überprüft. Der Verdau (20 μ l) wurde mit 250 ng Dinukleosomen, 10 U AluI (NEB) und EX 50 Puffer (siehe 2.2.9) angesetzt und 1 Stunde bei 26 °C inkubiert [79, 81]. Anschließend wurde der Versuch wie in Abschnitt (2.9.3) beschrieben weitergeführt, wobei zur Gelelektrophorese ein 1,0 % Agarosegel verwendet wurde. Die Linker-Region wurde mit einem DraIII Verdaus analysiert. Jeweils 200 ng der Dinukleosomen und 1,5 μ l DraIII (20 U/ μ l, NEB) wurden mit EX 50 Puffer (siehe 2.2.9) gemischt (15 μ l). Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden bei 26 °C wurden die Proben auf ein natives Agarosegel (1,1 %; 0,2x TB; 7 cm) geladen anschließend mit EtBr gefärbt.

2.12.10 Dinukleosomen-Ligationsversuch

Um ein heterogenes Dinukleosom herzustellen, wurde versucht ein WT-Mononukleosom mit einem gH4-Mononukleosom über die DraIII Schnittstelle zu ligieren [92]. In einem ersten Ligationstest wurden zunächst zwei WT-Nukleosomen ligiert. Der Ligationsansatz von 20 μ l enthielt je 2 pmol der Mononukleosomen 213 WT und 217 WT, 2300 U Ligase (2000 U/ μ l, NEB) sowie 1x T4 Puffer (NEB) und ddH₂O. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 24 °C. Als Kontrollen dienten Ansätze, bei denen die Ligasekonzentration variiert wurde (250 U bis 2300 U) sowie eine Kontrolle, bei der ein T4 Puffer ohne ATP verwendet wurde. Dieselben Ligationsansätze und Kontrollen wurden auch jeweils mit 200 ng des WT-Dimers und des assemblierten WT-Dinukleosoms durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte anhand eines 4,5 % nativen Polyacrylamidgels (PAA 29:1). Das Gel wurde wie in 2.12.8 beschrieben visualisiert. Die Ergebnisse dieses Ligationsversuchs sind in Kapitel 3.11.5 dargestellt.

2.13 Expression und Proteinaufreinigung der Taq-Polymerase

2.13.1 Transformation und Expression der Taq-Polymerase

Das Plasmid pFMP 222 enthält die genetische Information der Taq-Polymerase (siehe Tab. 2). Die Transformation des Plasmids pFMP 222 erfolgte mit DH5 α -Zellen wie in 2.3.1 beschrieben. Als Resistenz diente Ampicillin (100 μ g/ml). Eine Kolonie wurde mittels 250 ml Vorkultur über Nacht bei 37 °C und 200 rpm angezüchtet. 500 ml LB Medium (100 μ g/ml Ampicillin) wurden mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Nach 3 Stunden konnte eine OD₆₀₀ von circa 0,6 gemessen und die Expression mit 0,8 mM IPTG induziert werden. Nach einer Inkubationsdauer von

weiteren 19 Stunden wiesen die einzelnen Kulturen eine OD_{600} von 1,2-1,5 auf. Die Zellen wurden bei 4 °C und 3800 rpm 20 min abzentrifugiert (Heraeus Cryfuge 6000i) und anschließend bei - 20 °C eingefroren. Insgesamt wurden Zellen aus 1,5 l Kultur geerntet.

2.13.2 Induktionskontrollen der Taq-Polymerase pFMP 222

Um den Erfolg der Überexpression der Taq-Polymerase zu sichern, wurden jeweils 1 ml Kultur vor der Expressionsinduktion sowie 2, 6, und 19 Stunden nach der Induktion entnommen und abzentrifugiert. Das Pellet ist mit 1 mg/ml Lysozym, 0,5 mM Benzamidine und 1 mM PMSF versetzt und 30 min auf Eis inkubiert worden. Nach diesem Schritt erfolgte die Entnahme von 10 µl jeder Probe zur Analyse des Gesamtzellextrakts. Um überflüssige Proteine aus dem Zellextrakt zu eliminieren, inkubierte das übrige Probengemisch für 1 Stunde bei 75 °C und wurde anschließend abzentrifugiert. Zehn µl dieses Überstands dienten zur Proteinanalyse der hitzestabilen Taq-Polymerase. Die einzelnen Probenfraktionen wurden mittels SDS-Page (18 %) analysiert (Abb. 14). Als Positiv-Kontrolle wurden 3,5 µl der Taq-Polymerase von NEB verwendet. Die Proben des gesamten Zellextrakts und die Proben nach der 75 °C Inkubation wiesen eine der Positiv-Kontrolle (Taq-Polymerase, NEB) identische Bande bei circa 95 kD (Protein-Marker IV) auf. Es konnte daher angenommen werden, dass die Expression der Taq-Polymerase erfolgreich war.

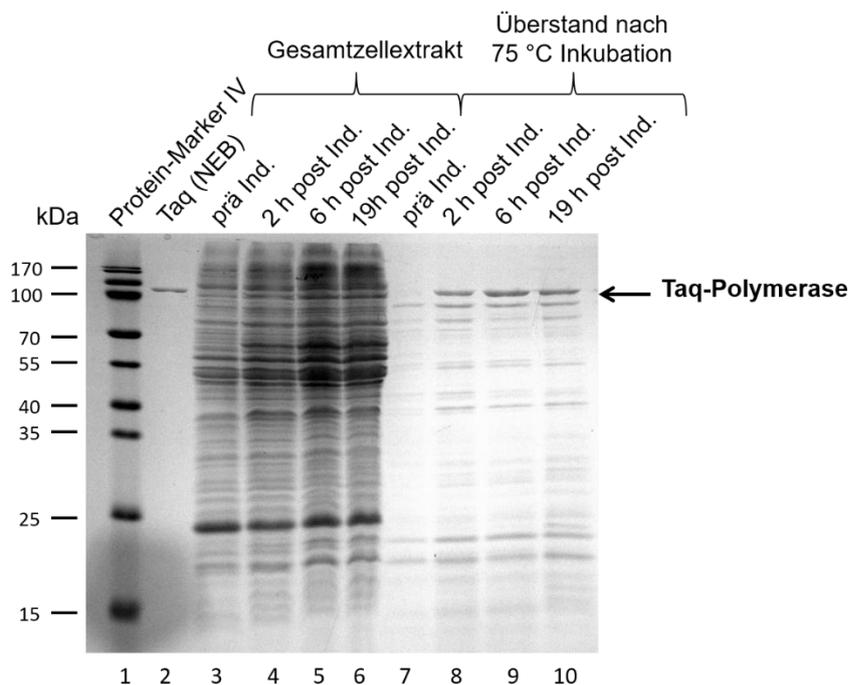


Abb. 14: Expressionskontrollen der Taq-Polymerase. (1) Protein-Marker IV. (2) Positiv-Kontrolle der Taq-Polymerase (NEB). (3) Der Gesamtzellextrakt wies vor der Induktion (prä Ind.) eine geringe Intensität der 95 kD Bande auf. (4-6) Mit zunehmender Expressionsdauer (2 h, 6 h und 19 h) nahm die Intensität der Taq-Polymerase-Bande zu, was eine erfolgreiche Überexpression des Proteins widerspiegelte. (7) Die Probe vor der Induktion zeigte keine 95 kD große Proteinbande. (8-10) Die Fraktionen nach der Induktion (post Ind.) besaßen eine deutliche Bande im Größenbereich 95 kD, welche anhand der Positiv-Kontrolle als Taq-Polymerase identifiziert werden konnte. (7-10) Durch die Hitzeinkubation des Zellextrakts (75 °C) konnte ein überwiegender Teil der übrigen Proteine eliminiert werden.

2.13.3 Chromatographische Proteinaufreinigung der Taq-Polymerase

Zur Proteinaufreinigung der Taq-Polymerase dienten die in 2.13.1 geernteten Bakterienpellets (1,5 l Kultur). Die Zellen wurden mit 200 mg Lysozym und Puffer Taq A (siehe 2.2.6) resuspendiert (Gesamtvolumen 50 ml). Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur folgte die Zugabe von 50 ml Puffer Taq B (siehe 2.2.6), 1 mM PMSF, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin (jeweils 50 µl). Das Gemisch (Endkonzentration 25 mM KCL) wurde für eine Stunde bei 75 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Um einen Großteil der übrigen Proteine zu eliminieren, folgte eine Zentrifugation (SS34; 19000 rpm; 4 °C; 15 min). Zu 100 ml des Überstands wurden 2,5 ml Taq B 1000 (siehe 2.2.6) gegeben, um die KCl Konzentration auf mindestens 50 mM zu halten. Der Überstand wurde filtriert (0,45 µm) und auf eine mit 5 % Puffer Taq B 1000 (50 mM KCL) äquilibrierte HiTrap TM DEAE FF Säule (5 ml Volumen) geladen. Aufgrund eines Ladefehlers wurde die geladene Probe (circa 80 ml) mit circa 40 ml Taq B 50 verdünnt. Danach folgte eine Reinigung der

Säule mit 6 Säulenvolumen 5 % Puffer Taq B 1000 (50 mM KCl). Die auf die Säule gebundenen Proteine wurden anhand eines Salzgradienten von 50-500 mM KCl (Puffer Taq B 1000 5-50 %) über 50 ml (Flussgeschwindigkeit 1 ml/min) eluiert. Es folgte ein zweiter Gradient von 500-1000 mM KCl über 10 ml. Die Taq-Polymerase konnte in den Elutionsfraktionen 15-22 (entspricht 15-22 ml des ersten Gradienten) detektiert werden. Die Taq-Polymerase wurde zwischen circa 120-220 mM KCl eluiert (Abb. 15A). Die eluierten Proteine wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt und mittels 10 % SDS-Page analysiert (siehe 2.7.1 und Abb. 15B).

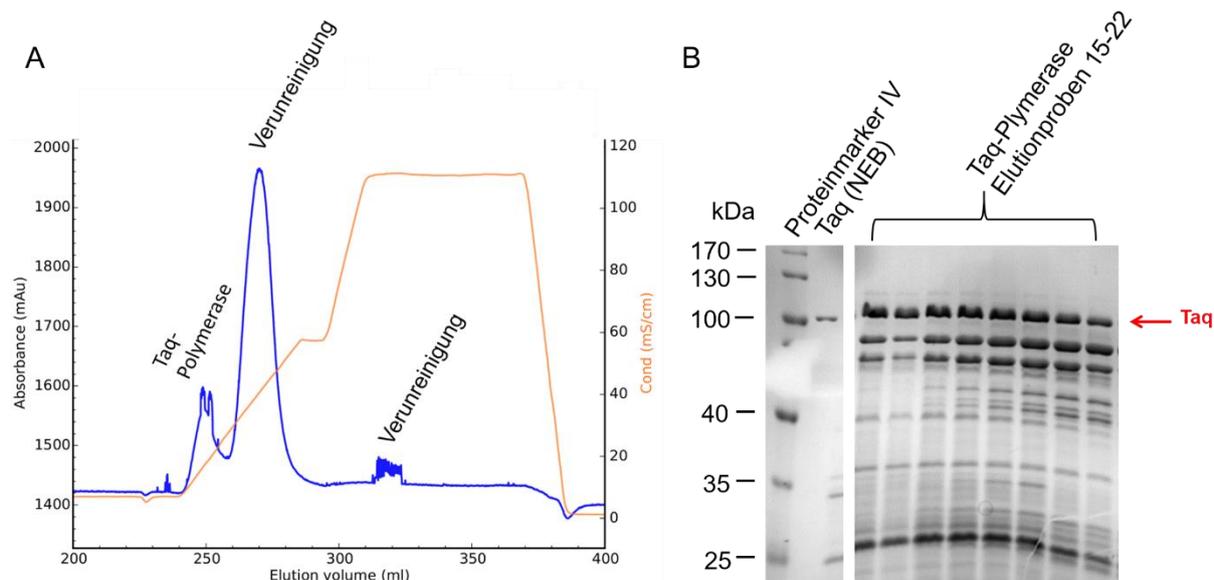


Abb. 15: Chromatogramm der Taq-Polymerase Proteinaufreinigung. (A) Die eluierte Proteinmenge (blau) wurde anhand der gemessenen UV-Absorption (*Absorbance*) bei 280 nm in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen (*Elution volume*) ermittelt. Der Elutionspeak der Taq-Polymerase verläuft zwischen circa 240-260 ml. Dies entspricht den Elutionsfraktionen 15-22 (ml) eines Salzgradienten von 50-500 KCl (Puffer Taq B 50-500) über 50 ml. Die übrigen Proteinfaktionen enthielten Verunreinigungen. Der Verlauf des Salzgradienten wurde anhand der Konduktivität gemessen (*Cond*, orange). (B) Gelkontrollen (10 % SDS-Page) der eluierten Taq-Polymerase, welche circa 95 kDa groß ist. Die Elutionsfraktionen 15-22 enthielten neben der Taq-Polymerase Proteinverunreinigungen, die nicht eliminiert werden konnten.

Die eluierten Fraktionen (Taq-Polymerase) wurden vereinigt und in einem 12-14 kDa durchlässigen Membranschlauch (Spectra/Por®) zweimal, für zwölf Stunden in jeweils frischem *Storage Puffer* (siehe 2.2.6) dialysiert und bei -20 °C eingefroren. Die Konzentration der Taq-Polymerase wurde anhand des Standardproteins BSA mittels einer Gelquantifizierung (SDS-Page 10 %) bestimmt und betrug 22 U/μl.

3 Ergebnisse

3.1 Assemblierung von 13-mer Nukleosomen-Arrays mit stöchiometrischen Mengen an Histonoktameren

Es ist bekannt, dass die ATPase ISWI durch *Remodeling* die Zugänglichkeit von 12-mer und 25-mer Nukleosomen-Arrays für bestimmte Faktoren wie, z.B. Restriktionsenzyme erhöht [79, 81]. Es ist jedoch unklar, wie ISWI die Barriere einer kompakt gefalteten Chromatinfaser überwinden kann. Beginnt *Remodeling* an einer peripheren, leicht zugänglichen Stelle der Chromatinfaser oder kann das *Remodeling*-Enzym ISWI direkt dicht gepackte, zentrale Nukleosomen *remodeln*?

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob *Remodeling* durch die unterschiedliche Lage der Nukleosomen innerhalb eines Arrays beeinflusst wird und bestimmte Nukleosomen präferiert *remodelt* werden. Um diese Fragestellung anhand eines *in vitro* Chromatinsubstrats untersuchen zu können, habe ich für diese Arbeit ein 13-mer Nukleosomen-Array entworfen und hergestellt. Das 13-mer Nukleosomensubstrat besaß auf jeder Nukleosomen positionierenden Sequenz der dreizehn Nukleosomen eine individuelle Restriktionsschnittstelle. Diese Eigenschaft sollte ermöglichen, dass *Remodeling* zwischen spezifischen Nukleosomen einer Chromatinfaser unterschieden werden kann [72, 80, 94, 95].

Um 13-mer Nukleosomen-Arrays zu generieren, wurden Wildtyp-Oktamere entlang einer 13-mer langen Nukleosomen positionierenden Sequenz assembliert. Die 13-mer lange Sequenz wurde wie in 2.6.1 beschrieben aus dem Plasmid pFMP 226 (siehe 7.1.3) isoliert (Abb. 16A). Diese barcodierte, repetitive Sequenz leitet sich von der 601 *nucleosome positioning sequence* ab und besitzt eine sehr hohe Affinität für Histonoktamere [72, 78]. Für die Herstellung von Nukleosomen-Arrays war es notwendig Oktamere zu generieren, die alle vier Histontypen: H2A, H2B, H3 und H4 in einem stöchiometrischem Verhältnis enthalten [86]. Für diese Arbeit wurden neben den Wildtyp-Oktameren auch gH4-Oktamere konstituiert, die zur Assemblierung von Mono- und Dinukleosomen verwendet wurden. Der Verwendungszweck und die Bedeutung der Nukleosomen mit gH4-Oktameren wird im Kapitel 3.11 näher erläutert. Die Herstellung der Histone und Oktamere erfolgte wie in Abschnitt 2.7.3 und 2.8 beschrieben. Um die Qualität der Oktamere zu prüfen, wurden 1 µg der Oktamere mittels eines 18 % SDS-PAGE analysiert und wie in 2.7.1 beschrieben gefärbt (Abb. 16B und C).

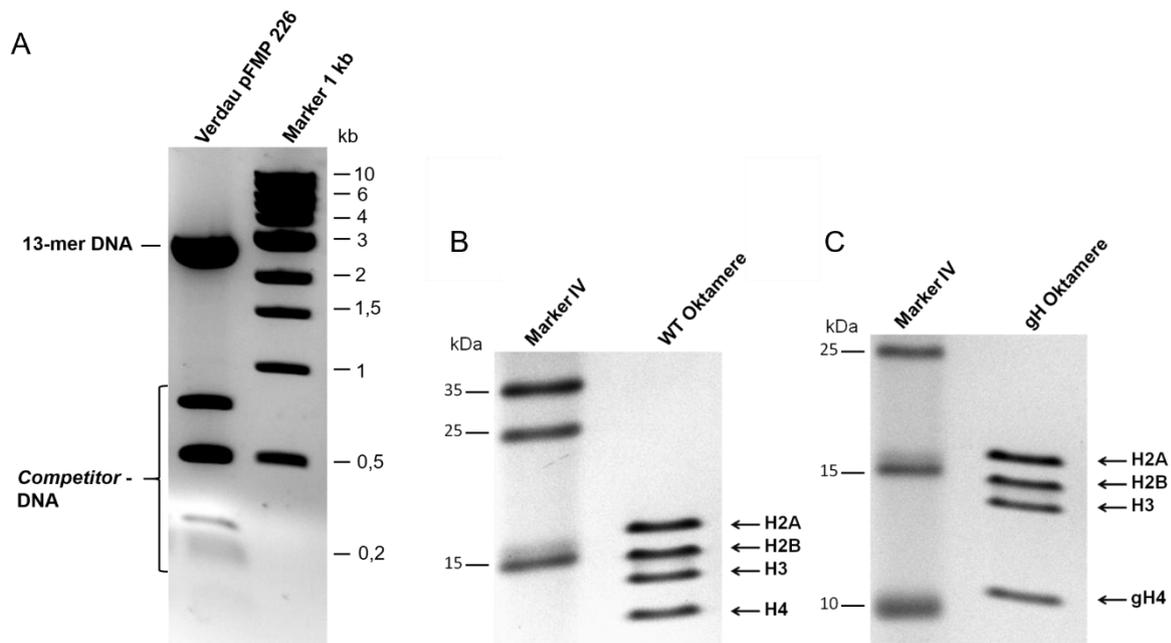


Abb. 16: Qualitätskontrollen des pFMP 226 Verdau und der Oktamere. (A) pFMP 226 nach dem Verdau mit den Enzymen EcoRI, HincII, AseI und ApaI (siehe 2.6.1). Die 13-mer Sequenz (2569 bp) wurde isoliert und der Vektor in kleinere DNA-Fragmente verdaut (*Competitor*-DNA). (B) Die Wildtyp-Oktamere und die (C) gH4-Oktamere enthielten annähernd stöchiometrische Mengen der einzelnen Histone.

Die Assemblierung der 13-mer *Arrays* wurde bereits ausführlich beschrieben (siehe 2.9.1). Um das für eine Assemblierung stöchiometrische Verhältnis von DNA zu Oktameren zu ermitteln, wurden Assemblierungen mit folgendem molaren Verhältnis von DNA zu Oktameren durchgeführt: 1:0,8/ 1:1,0/ 1:1,1/ 1:1,2. Die Nukleosomen-*Arrays* wurden nach der Assemblierung gefällt (5 mM MgCl₂) und in Puffer gelöst [79, 89]. Durch die Magnesiumfällung wurden die assemblierten Nukleosomen-*Arrays* kompaktiert und von der *Competitor*-DNA, überschüssigen Oktameren und nicht voll assemblierten *Arrays* separiert [86, 90]. Um zu überprüfen, ob die assemblierten *Arrays* ausreichend mit Oktameren gesättigt waren, wurden Gelkontrollen mit analytischen Mengen des *Inputs*, des gelösten Pellets (*Arrays*) sowie des Überstands der Magnesiumfällung durchgeführt [79]. Nukleosomen-*Arrays* präzipitieren gut, wenn sie ausreichend mit Oktameren assembliert wurden. Die *Arrays* sollten nach erfolgreicher Assemblierung im Pellet zurückbleiben, wobei ungesättigte *Arrays* sowie freie und assemblierte *Competitor*-DNA im Überstand gelöst bleiben. Die *Competitor*-DNA besitzt nur eine durchschnittliche Bindungsaffinität für Oktamere und verhindert, dass überschüssige Oktamere außerhalb der Nukleosomen positionierenden Sequenzen der *Array*-DNA gebunden werden [79]. Eine erhöhte Mobilität der *Competitor*-DNA in den Gelkontrollen deutet darauf hin, dass die Oktamere beginnen *Competitor*-DNA zu binden und die *Array*-DNA ausreichend mit Oktameren besetzt ist [79, 86]. Gelkontrollen zeigten, dass die 13-mer *Arrays* bei einer Ratio von 1:1 eine gute

Sättigung aufwiesen und nicht mit Oktameren über- oder unterbesetzt waren (Abb. 17A). Mit dieser Ratio wurde die präparative Assemblierung der 13-mer *Arrays* durchgeführt (Abb. 17B).

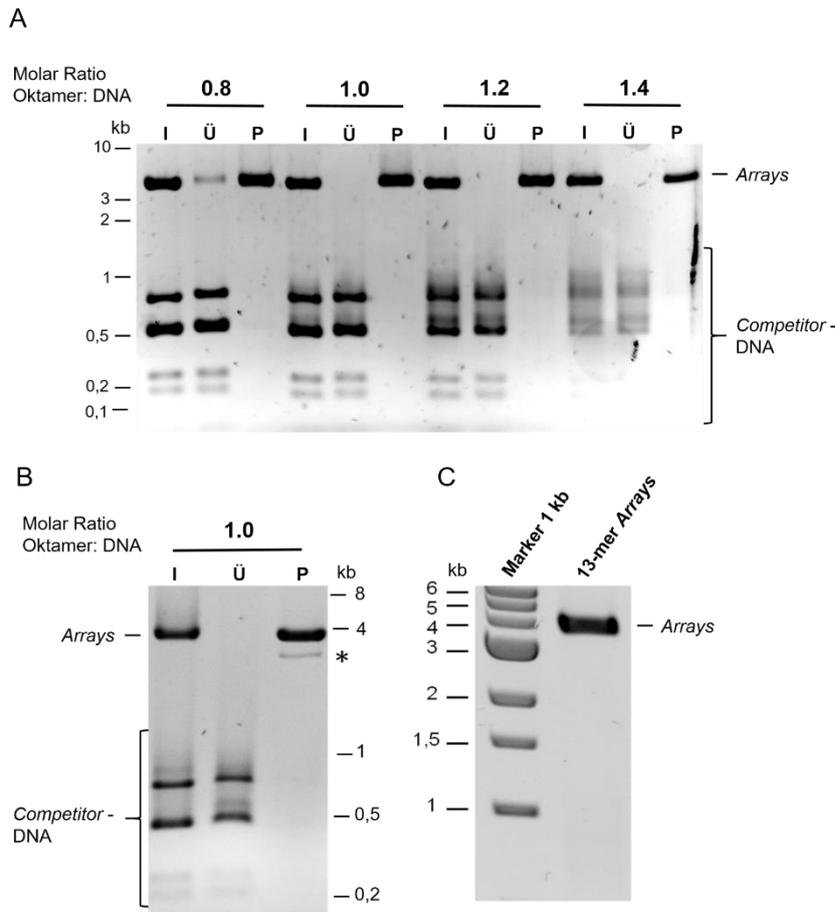


Abb. 17: Gelkontrollen der 13-mer *Arrays* nach der Magnesiumfällung. Jeweils 200 ng *Arrays* des *Inputs* (I), des *Pellets* (P) sowie des *Überstandes* (Ü) der Magnesiumfällung wurden auf einem nativen 0,7 % Agarosegel analysiert und mit EtBr gefärbt [79, 81]. (A) Assemblierungskontrollen mit unterschiedlichen Oktamer:DNA Ratios (*Molar Ratio*). Unzureichend gesättigte *Arrays* blieben im *Überstand* zurück und die *Competitor-DNA* zeigte keine Mobilität (*Molar Ratio* 0.8). Bei ausreichender Sättigung waren keine *Arrays* im *Überstand* vorhanden und die *Competitor-DNA* wies eine leicht erniedrigte Mobilität (*mobility shift*) auf (*Molar Ratio* 1.0) [79]. Eine Übersättigung mit Oktameren äußerte sich durch eine stark erhöhte Mobilitätsänderung der *Competitor-DNA*, mit zunehmenden *shift* in Richtung *Arrays* (*Molar Ratio* 1.2 und 1.4). (B) Kontrollgel der präparativ hergestellten 13-mer Assemblierung mit einer Ratio 1:1. Im *Überstand* (Ü) befanden sich keine *Arrays* und die *Competitor-DNA shiftete* leicht nach oben. Es konnte hierbei von einer ausreichenden Assemblierung der *Array-DNA* mit Oktameren ausgegangen werden. Direkt nach der Magnesiumfällung war in den *Array-Proben* noch eine zusätzliche Bande erkennbar (*). (C) Bei einer späteren Kontrolle desselben Materials konnte diese zusätzliche Bande im *Pellet* (P) nicht wieder bestätigt werden.

3.1.1 Qualitätskontrollen der 13-mer Arrays

Um die Sättigung der Oktamere auf der 13-mer DNA zu überprüfen, führte ich zwei weitere Qualitätskontrollen durch. Die Qualitätskontrollen wurden wie in Kapitel 2.9.3 beschrieben ausgeführt. Mittels eines BsiWI Verdau der Arrays konnte die Zugänglichkeit der DNA innerhalb der Nukleosomen positionierenden Sequenzen ermittelt werden (Abb. 18A). Bei voller Oktamersättigung ist die BsiWI Schnittstelle auf der Nukleosomen positionierenden Sequenz nicht zugänglich [72]. Nach erfolgtem BsiWI Verdau und anschließender Proteinelimination, sollte daher nur eine 13-mer DNA-Bande und keine geschnittene DNA (DNA-Leiter) in der Gelkontrolle sichtbar sein [79]. Die Resultate der Qualitätskontrollen mittels BsiWI Verdau sind in der Abbildung 18 gezeigt.

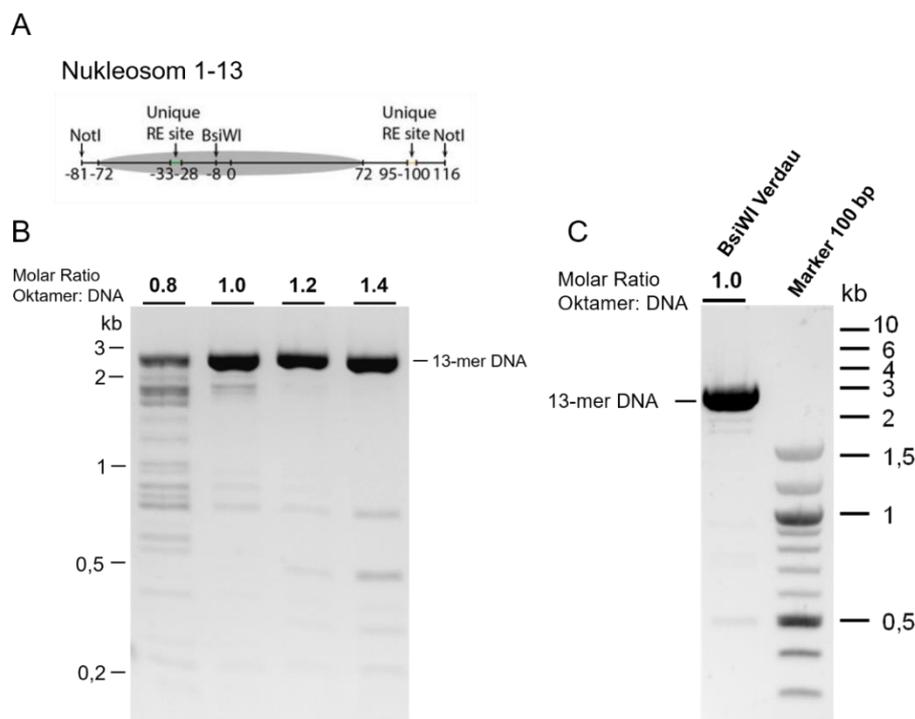


Abb. 18: Kontrolle der Positionierung von Oktameren auf der NPS in 13-mer Arrays. (A) Position der NotI, BsiWI und der individuellen Schnittstelle (*unique* RES) auf einem Nukleosom der 13-mer Arrays. Die Nummerierung entspricht der Position der Schnittstelle in bp relativ zur nukleosomalen Dyaden-Achse (übernommen von Ludwigsen, Hepp et al., *Methods in Molecular Biology*, eingereicht). (B und C) Jeweils 250 ng 13-mer Arrays wurden BsiWI und Proteinase K verdaut und die DNA anschließend auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt (siehe 2.9.3). (B) Arrays aus Abb. 17A nach BsiWI Verdau. Bei einer Untersaturierung der Arrays entstand eine DNA-Leiter (*Molar Ratio* 0.8). Bei ausreichender Saturierung der Arrays war nur eine 13-mer DNA-Bande und vernachlässigbare Mengen an geschnittener DNA vorhanden (*Molar Ratio* 1.0). Bei Übersättigung wurden zunehmend unspezifische DNA-Banden sichtbar (*Molar Ratio* 1.2 und 1.4). (C) Die Qualitätskontrolle der präparativen 13-mer Assemblierung (*Molar Ratio* 1:1) wies nur eine ungeschnittene 13-mer Bande auf.

Als zweite Qualitätskontrolle diente ein NotI Verdau, der die Zugänglichkeitsprüfung der Linker-Regionen ermöglichte (siehe Abb. 18A). Die Linker-Regionen der Nukleosomen-*Arrays* sollten für das Restriktionsenzym NotI zugänglich sein. Bei guter Sättigung der *Arrays* sollte nach erfolgtem Kontrollverdau keine freie DNA (200 bp), sondern nur Mononukleosomen (400 bp) sichtbar sein (Abb. 19) [79, 81].

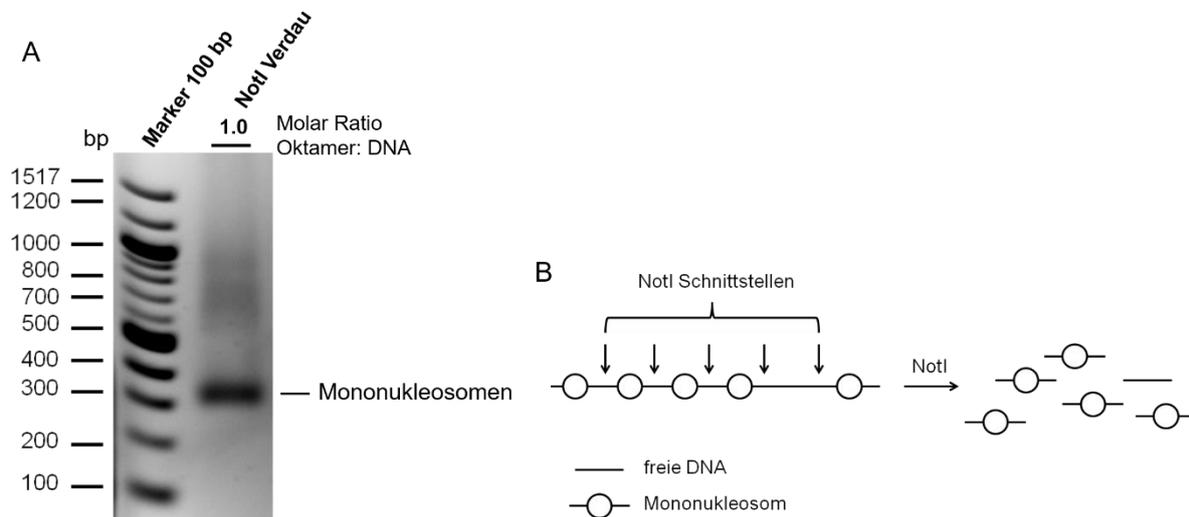


Abb. 19: Überprüfung der Linker-Regionen in 13-mer *Arrays*: (A) Gelkontrolle der präparativ hergestellten 13-mer *Arrays* nach NotI Verdau. 200 ng *Arrays* wurden NotI verdaut, mittels 1 % Agarosegel analysiert und mit EtBr gefärbt (siehe 2.9.3). Nach dem NotI Verdau waren Mononukleosomen bei circa 400 bp, jedoch keine freie DNA (200 bp) sichtbar. (B) Schematische Darstellung des NotI Verdau. Im Falle einer mangelnden Sättigung der *Arrays* würden nach einem NotI Verdau 200 bp große DNA-Banden entstehen.

Die Qualitätskontrollen in den Abbildungen 17, 18 und 19 haben gezeigt, dass die analytisch und präparativ hergestellten 13-mer *Arrays* bei einer molaren Ratio von 1:1 optimal mit Oktameren besetzt und weder unter- noch übergesättigt waren. Die präparativ hergestellten 13-mer *Arrays* wurden bei den später beschriebenen *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* verwendet.

3.2 Etablierung eines *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* zur Analyse von *Remodeling* spezifischer Nukleosomen in 13-mer *Arrays*

Im folgenden Abschnitt wird ein Assay beschrieben, mit dem strukturelle Änderungen in Nukleosomen-*Arrays* untersucht werden können [91]. ATP-abhängige *Remodeling*-Enzyme können auf unterschiedliche Weise die Nukleosomenanordnungen in *Arrays* verändern (siehe 1.3). *Remodeling* dient als Überbegriff, für die von *Remodeling*-Enzymen erzeugten strukturellen Modifikationen von Nukleosomen [45]. Durch *Remodeling* werden mit

Nukleosomen besetzte Nukleosomen positionierende Sequenzen freigelegt und können mit Hilfe eines Restriktionsenzymverdau detektiert werden (Abb. 20A). Anhand eines *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays (REAA)* kann somit die Zugänglichkeit der Nukleosomen positionierenden Sequenzen überprüft und *Remodeling* nachgewiesen werden [79, 81, 91].

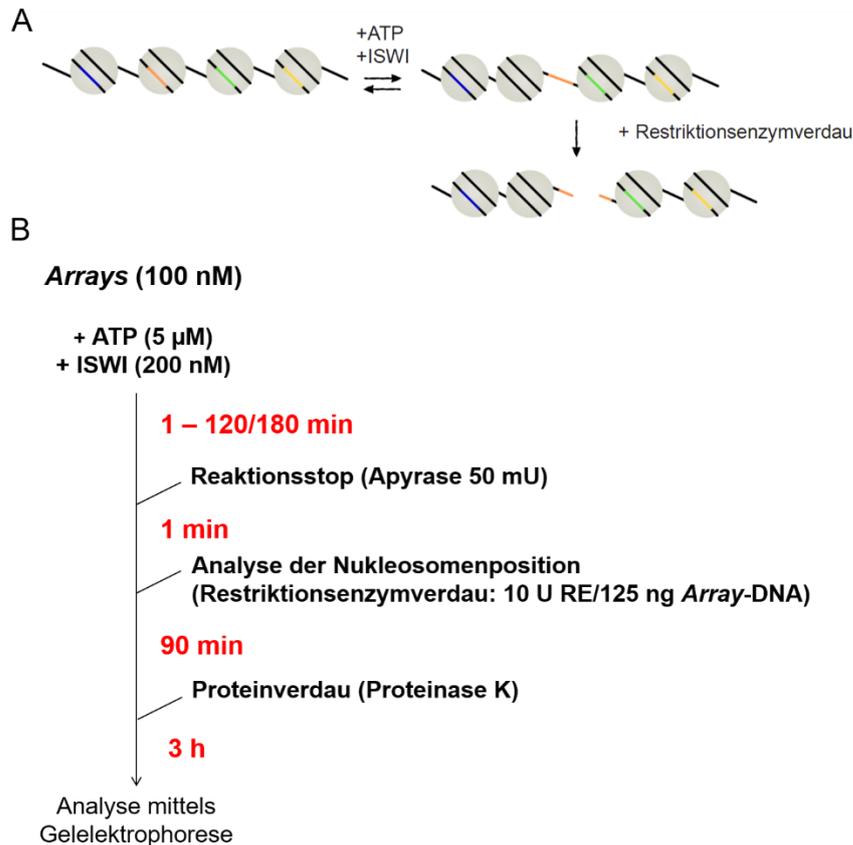


Abb. 20: Untersuchung von *nucleosome sliding* anhand eines REAA. (A) Nachweis von *Remodeling* mittels Zugänglichkeitsüberprüfung der Nukleosomen positionierenden Sequenz, durch einen Restriktionsenzymverdau. (B) Übersicht über den Ablauf des *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays*.

Den für die *Remodeling*-Versuche entwickelte *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assay* (siehe 2.11) wurde wie in Abbildung 20 beschrieben durchgeführt. Durch die Zugabe von 200 nM ISWI wurde die *Remodeling*-Reaktion bei 26 °C gestartet. Über einen Zeitraum von 120 bzw. 180 min wurden Reaktionsproben entnommen und mit Apyrase gestoppt. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von ATP zu AMP und P_i . Die Enzymaktivität von ISWI wird durch die Elimination von ATP stark reduziert [45]. Kontrollen haben gezeigt, dass die Elimination von ATP nach einer Minute ausreichend abgeschlossen war (siehe 3.4.1). Nach dem Apyrase-Reaktionsstopp folgte ein Restriktionsenzymverdau, um die Zugänglichkeit der gewünschte Nukleosomenposition nachzuweisen. Der Restriktionsenzymverdau wurde mit SDS und

EDTA gestoppt. Alle Proteine der Reaktion wurden mittels eines Proteinase K Verdau eliminiert. Die geschnittenen und ungeschnittenen DNA-Banden konnten auf einem Agarosegel aufgetrennt und quantifiziert werden [79, 81].

3.3 Vergleich der *Remodeling*-Aktivität von ISWI zwischen einer internen und externen Nukleosomenposition in 13-mer *Arrays*

Um *Remodeling* einer internen und externen Nukleosomenposition in 13-mer *Arrays* nachzuweisen, wurde der *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assay* wie in Kapitel 2.11 und 3.2 beschrieben durchgeführt. Die Zugänglichkeit einer internen bzw. externen Nukleosomenposition wurde mittels eines Enzymverdaus mit den Enzymen Afel (Nukleosom zwei) und KpnI (Nukleosom sieben) ermittelt (Abb. 21A). Um die 13-mer *Remodeling*-Versuche auszuwerten, wurde der prozentuale Anteil an geschnittener DNA ermittelt (siehe 2.11.3). Die Agarosegelanalysen der *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* zeigten, dass die Zugänglichkeit der *Arrays* in Abhängigkeit von der *Remodeling*-Dauer zunahm (Abb. 21B und C).

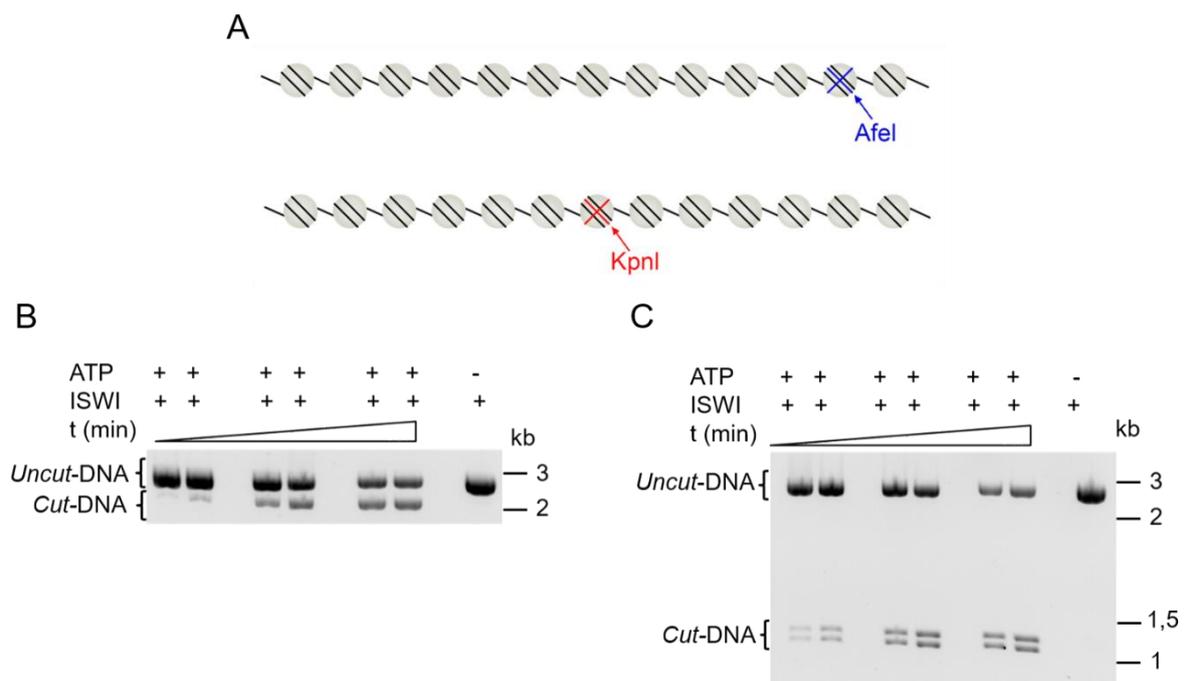


Abb. 21: *Remodeling* einer internen und externen Nukleosomenposition in 13-mer *Arrays*. (A) 2D-Darstellung der 13-mer *Arrays* mit Kennzeichnung der internen und externen Nukleosomenposition mit Restriktionsschnittstelle. (B und C) Gelanalysen der *Restriction Enzyme Accessibility-Assays*. Die ungeschnittenen (*uncut*) und geschnittenen (*cut*) DNA-Banden wurden mittels 0,9 % Agarosegels aufgetrennt und mit EtBr gefärbt. Die Gelbilder der externen (B) und der internen (C) Nukleosomenposition zeigten, dass die Menge an *Cut*-DNA mit zunehmender *Remodeling*-Zeit zunahm. Die Zeitreihen beinhalten folgende Zeitpunkte: 1, 3, 10, 30, 90 und 180 min. Die Negativ-Kontrollen ohne ATP wiesen keine geschnittenen DNA-Banden auf.

3.3.1 ISWI *remodelt* interne und externe Nukleosomen mit ähnlicher Effizienz

Die Gelbilder der *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* wurden wie in 2.11.3 beschrieben quantifiziert. Die daraus ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten und die maximale Menge an geschnittener DNA, der Nukleosomenpositionen zwei und sieben wurden miteinander verglichen. Die Auswertungen zeigten, dass ISWI die externe und interne Nukleosomenpositionen der 13-mer *Arrays* mit sehr ähnlicher Effizienz *remodeln* konnte (Abb. 22A und B).

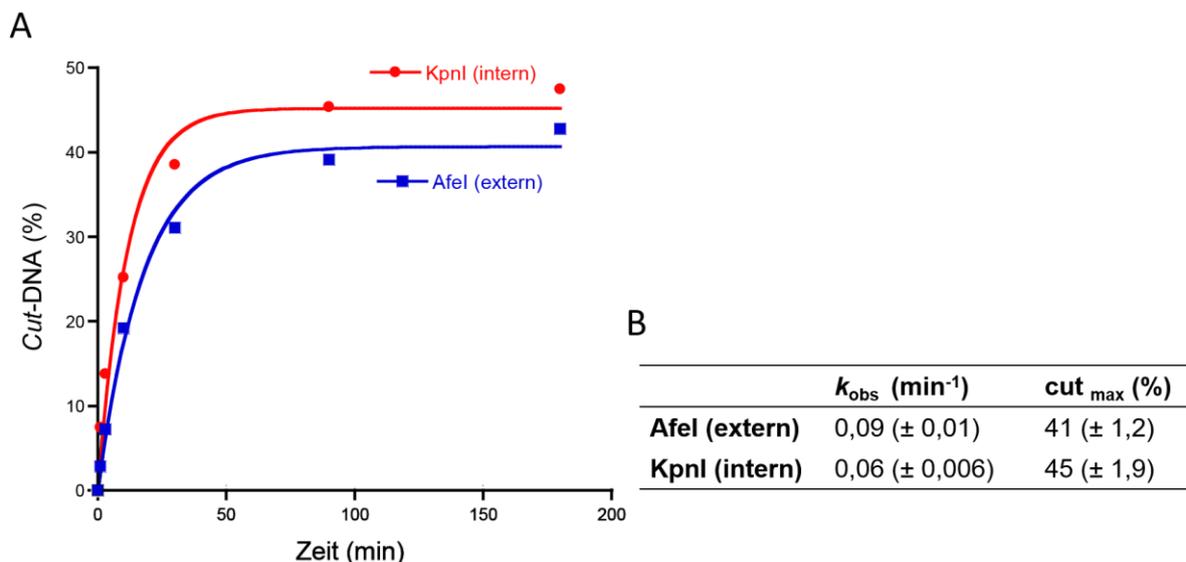


Abb. 22: ISWI *remodelt* Nukleosom zwei und sieben in 13-mer *Arrays* mit ähnlicher Effizienz.

(A) Die ermittelten Werte der *Cut-DNA* (%) wurden in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer geplottet und zu einer einzelnen Exponentialkurve angepasst (2.11.3). (B) Nach 180 min *Remodeling* unterschieden sich die Werte der maximal zugänglichen DNA (cut_{max}) nur gering zwischen der externen (Afel) und internen Nukleosomenposition (Kpnl). Die *Remodeling*-Geschwindigkeiten (k_{obs}) wiesen ebenfalls keine relevanten Unterschiede zwischen den zwei Nukleosomenpositionen auf. Alle Reaktionen enthielten 5 μM ATP, 200 nM ISWI, 1 mM Mg^{2+} und *Arrays* einer Mononukleosomen-Konzentration von 100 nM. Der Versuch wurde fünf Mal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt ($n=5$). Zwei der Experimente wurden unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt. Die anderen drei *Remodeling*-Versuche wurden mit leichten Abweichungen durchgeführt. Die Daten der Versuche und die Abweichungen der Versuchsbedingungen sind im Anhang aufgeführt (siehe 7.2.1). Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

3.4 Evaluierung des *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays*

Um die Qualität des *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* zu überprüfen und die daraus resultierenden Ergebnisse zu festigen, mussten mögliche Fehlerquellen der Assays ausgeschlossen werden. Hierbei war sicherzustellen, dass der Apyrase-Reaktionsstopp und

der Restriktionsenzymverdau suffizient waren und die Ergebnisse der *Remodeling*-Versuche weder positiv noch negativ beeinflussten.

3.4.1 Überprüfung des Apyrase-Reaktionsstopps mittels *Quench*-Kontrollen

Die Effektivität des Apyrase-Reaktionsstopps wurde mittels *Quench*-Kontrollen getestet. Zu einer *Remodeling*-Reaktion mit 100 nM *Arrays*, 1 mM Mg^{2+} , 1x *Remodeling*-Puffer A (siehe 2.2.8), 1x ATP-Regenerierungssystem (siehe Tab. 6) und 5 μ M ATP wurden 50 mU Apyrase beigemischt und 1 min bei 26 °C inkubiert. Nach einer Minute Apyraseverdau wurden 200 nM ISWI beigefügt und 90 min inkubiert. Der Enzymverdau (AfeI bzw. KpnI) und der Proteinverdau wurden wie in Abschnitt 2.11 beschrieben durchgeführt. Die Agarosegelanalysen zeigten, dass die *Quench*-Kontrollen zusätzlich zu den ungeschnittenen 13-mer DNA-Banden nur vernachlässigbare Mengen an geschnittener DNA aufwiesen (siehe Anhang Abb. 52). Die Gelkontrollen belegten, dass die ISWI-Aktivität durch Apyrase deutlich reduziert wurde. Als Positiv-Kontrolle diente eine herkömmliche *Remodeling*-Reaktion (siehe Abb. 52). Als Negativ-Kontrollen wurden bei allen *Remodeling*-Versuchen Kontrollproben durchgeführt, die entweder kein ISWI oder kein ATP enthielten. Bei diesen Negativ-Kontrollen wurde ebenfalls keine *Remodeling*-Aktivität beobachtet (siehe Anhang Abb. 48 und Abb. 50).

3.4.2 Überprüfung des Restriktionsenzymverdaus

Um die Effizienz des Restriktionsenzymverdaus zu sichern, wurde 13-mer *Array*-DNA mit den Enzymen AfeI und KpnI verdaut. Der Verdau fand unter gleichen Bedingungen wie im *REAA* statt. Zweihundertfünfzig ng 13-mer *Array*-DNA wurde mit 20 U Restriktionsenzym (AfeI oder KpnI) bei 26 °C verdaut. Der Verdau enthielt 1x *Remodeling*-Puffer A (siehe 2.2.8), 1x Regenerierungssystem (siehe Tab. 6) und 5 μ M ATP. Nach 0, 5, 30 und 120 min wurden Verdauproben entnommen und mittels Gelelektrophorese analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass im AfeI Verdau nach fünf und im KpnI Verdau nach circa dreißig Minuten die 13-mer *Array*-DNA vollständig verdaut war. Unter *Assay*-Pufferbedingungen wiesen die Enzyme somit eine gute Aktivität auf. Aus den in Abbildung 23 gezeigten Verdaukontrollen konnte geschlossen werden, dass der AfeI und der KpnI Verdau nach 90 min vollständig abgeschlossen sein sollten.

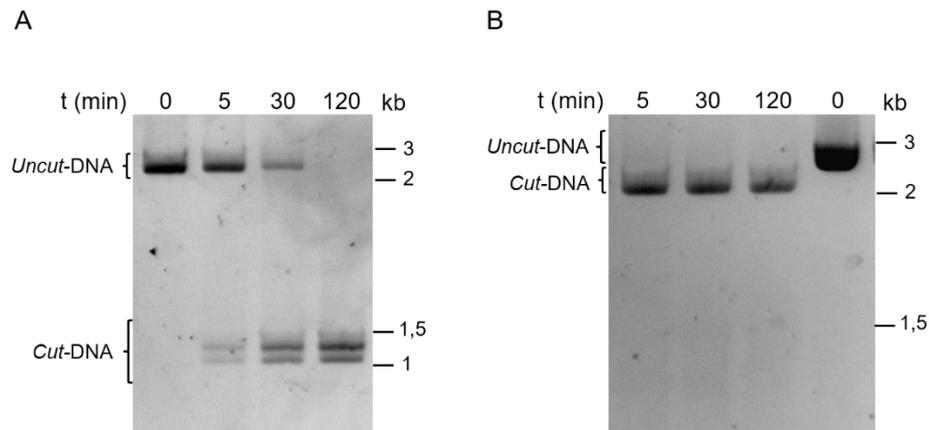


Abb. 23: KpnI und AfeI Verdau von 13-mer Array-DNA. Der KpnI und AfeI Verdau wurde auf einem 0,9 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt. (A) Der KpnI Verdau war nach 30 min beinahe vollständig abgeschlossen. Nach 120 min war die 13-mer DNA (2579 bp) komplett verdaut. (B) Der AfeI Verdau wies nach fünf min Inkubationszeit nur geschnittene DNA und keine 13-mer DNA-Bande auf.

Darüber hinaus wurden *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* mit dreißig- und neunzigminütigen Restriktionsenzymverdau durchgeführt und verglichen. Die Assays wurden wie in Kapitel 2.11 beschrieben durchgeführt und anschließend analysiert (siehe 2.11.3). Die einzige Abweichung bei der Durchführung war, dass die maximale *Remodeling*-Dauer nur neunzig Minuten betrug. Diese Kontroll-Assays zeigten, dass die maximale DNA-Zugänglichkeit (cut_{max}) und die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit (k_{obs}) der internen Nukleosomenposition (KpnI) nach dreißig- und neunzigminütigem Restriktionsenzymverdau beinahe identisch waren. Dasselbe Ergebnis wurde für die Kontroll-Assays mit der externen Nukleosomenposition (AfeI) beobachtet (Abb. 24A und B). Aus den Ergebnissen der Versuche konnte entnommen werden, dass sich die verwendeten Restriktionsenzymkonzentrationen (10 U/ 125 μ g Array) und die neunzigminütige Inkubationsdauer der Verdau nicht limitierend auf die Ergebnisse der *Remodeling*-Assays auswirkten.

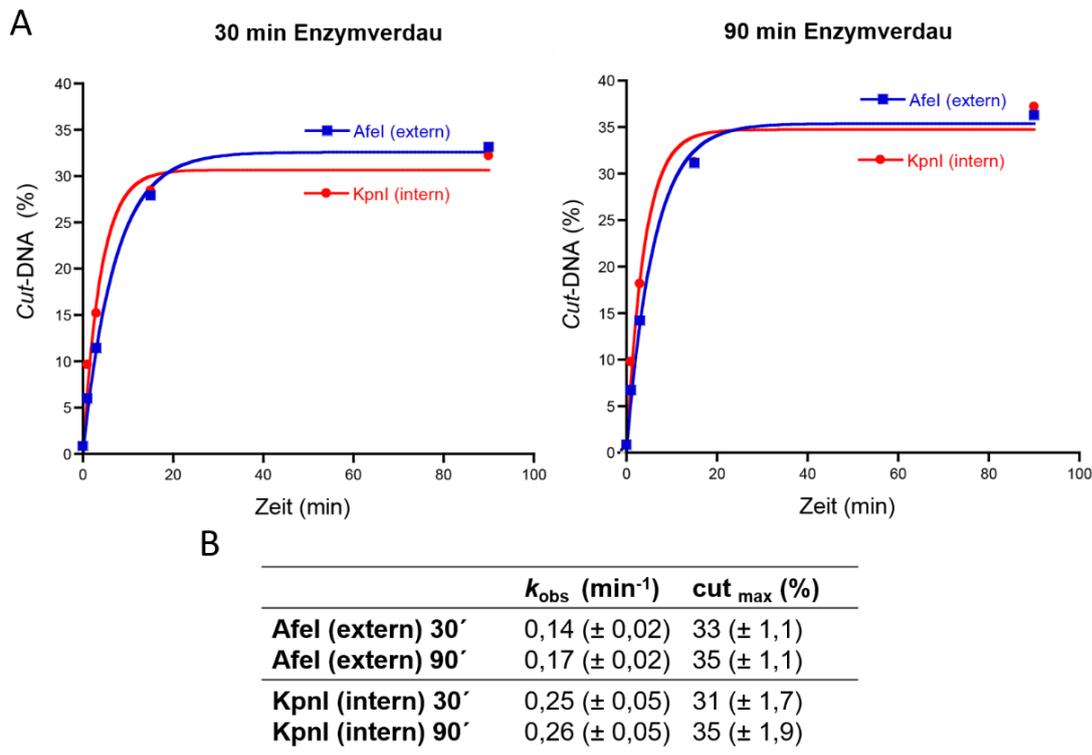


Abb. 24: Kontroll-Assays mit dreißig- und neunzigminütigem Restriktionsenzymverdau. (A) Exponentialfunktionen der *Remodeling*-Versuche mit 30 min und 90 min Restriktionsenzymverdau. Die für die Quantifizierung verwendeten Gelbilder sind im Anhang (Abb. 52) abgebildet. (A und B) Die *Remodeling*-Geschwindigkeit (k_{obs}) des internen (Kpnl) und externen (Afel) Nukleosoms wurde nicht durch die Inkubationsdauer (30 min = 30'; 90 min = 90') des Restriktionsenzymverdaus beeinflusst. Die Reaktionsgeschwindigkeit (k_{obs}) der internen Nukleosomenposition war beinahe doppelt so hoch wie die der externen Nukleosomenposition. Dies konnte bei dreißig und neunzigminütigem Restriktionsenzymverdau gleichermaßen beobachtet werden. Bezüglich der DNA-Zugänglichkeit wurden keine relevanten Unterschiede zwischen den Nukleosomenpositionen festgestellt. Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

3.5 *Remodeling* in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration

Die in 3.3.1 beschriebenen Ergebnisse warfen die Frage auf, ob eine ungenügende Kompaktheit der 13-mer *Arrays* mitwirkend war, dass sich *Remodeling* nur unbedeutend zwischen internen und externen Nukleosomen unterschied. Bei einer ungenügenden Kompaktheit der *Arrays* würden sich die unterschiedlichen Nukleosomen in ihrer Zugänglichkeit möglicherweise nicht unterscheiden.

Nukleosomen-*Arrays* unterliegen einer magnesiumabhängigen, reversiblen Faltung [30, 37, 96]. Um die Faltung und Kompaktheit der 13-mer *Arrays* näher zu untersuchen, war es notwendig den Einfluss von Magnesiumionen auf die Nukleosomen-*Arrays* zu ermitteln. Es ist bekannt, dass lange nukleosomale *Arrays* in der Abwesenheit von Magnesiumionen in

einem entfalteten, nicht kompaktierten Zustand vorliegen [30, 96]. Eine Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration hingegen, führt zu einer zunehmenden Selbstorganisation (Oligomerisation) und Kompaktheit der *Arrays* [22, 30, 89, 96] (Abb. 25A). Die bisherigen Versuche wurden mit einer Konzentration von 1 mM Mg^{2+} durchgeführt. In einer publizierten Arbeit mit 12-mer Nukleosomen-*Arrays* konnte *in vitro* gezeigt werden, dass *Arrays* unter einer Magnesiumkonzentration von 1 mM in einem kompakten Zustand vorliegen [97]. Um die Faltungsbedingungen der 13-mer *Arrays* unter Zunahme der Magnesiumkonzentration zu untersuchen, wurde der in Abschnitt 2.10 beschriebene Magnesiumpräzipitationsversuch durchgeführt. Die 13-mer *Arrays* wurden mit Magnesiumionenkonzentrationen von 0 bis 3,5 mM versetzt und gefällt (Abb. 25B und Abb. 65). Eine Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration korrelierte mit der Mengenzunahme an präzipitierten *Arrays* [30, 98]. Es wurde angenommen, dass eine Zunahme der Präzipitation mit einer gesteigerten Kompaktheit und Interaktion der *Arrays* einhergeht [98].

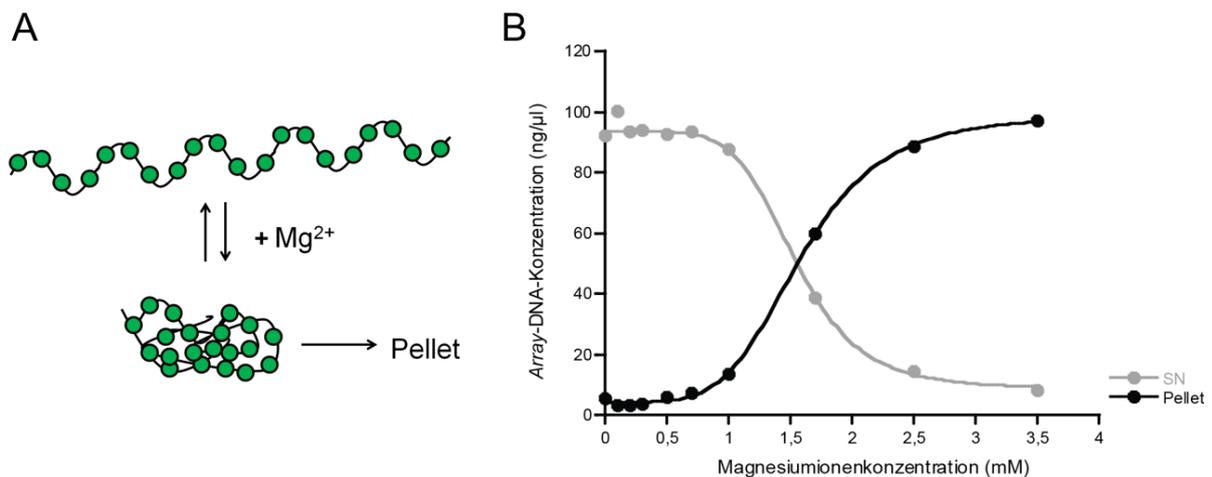


Abb. 25: Einfluss von Magnesiumionen auf das Präzipitationsverhalten von 13-mer *Arrays*. (A) Schematische Darstellung der magnesiumabhängigen, reversiblen Faltung eines Nukleosomen-*Arrays*. (B) Die ermittelte Sigmoidfunktion aus den Werten der analytisch graduellen Magnesiumfällung. Die Konzentration der gefällten *Arrays* (Pellet) stieg mit zunehmender Magnesiumionenkonzentration. Umgekehrt nahm die *Array*-Konzentration im Überstand (SN) mit zunehmender Magnesiumionenkonzentration ab [98]. Unter 0,3 mM Mg^{2+} wurden 3 ($\pm 1,0$) % der *Array*-Menge gefällt. Bei einer Konzentration von 2,5 mM Mg^{2+} wurden 89 ($\pm 0,3$) % der 13-mer *Arrays* präzipitiert. Der Versuch wurde zwei Mal durchgeführt ($n=2$) (siehe Abb. 65). Die Fehler wurden mittels der Differenz des minimalen und maximalen Wertes bestimmt.

Um den Einfluss der magnesiumabhängigen Faltungszustände auf die *Remodeling*-Aktivität von ISWI zu untersuchen, wurden *REA*-Assays unter unterschiedlichen Mg^{2+} -Konzentrationen durchgeführt und verglichen (Abb. 26A). Hierbei wurden die Magnesiumionenkonzentrationen 0,3 mM und 2,5 mM gewählt, da unter diesen Bedingungen die *Arrays* kaum bzw. beinahe vollständig präzipitierten. Eine Magnesiumkonzentration von 0 mM

konnte nicht verwendet werden, da alle Enzyme Magnesium benötigen. Die *Remodeling*-Proben beinhalteten 5 μM ATP, 200 nM ISWI, Nukleosomen einer Konzentration von 100 nM sowie 1x *Remodeling*-Puffer B (siehe 2.2.8) und 1x ATP-Regenerierungssystem (siehe Tab. 6). Die Versuche wurden gemäß dem Protokoll durchgeführt (siehe 2.11.1). Die für die Quantifizierung verwendeten Gelanalysen sind im Anhang (Abb. 53) gezeigt.

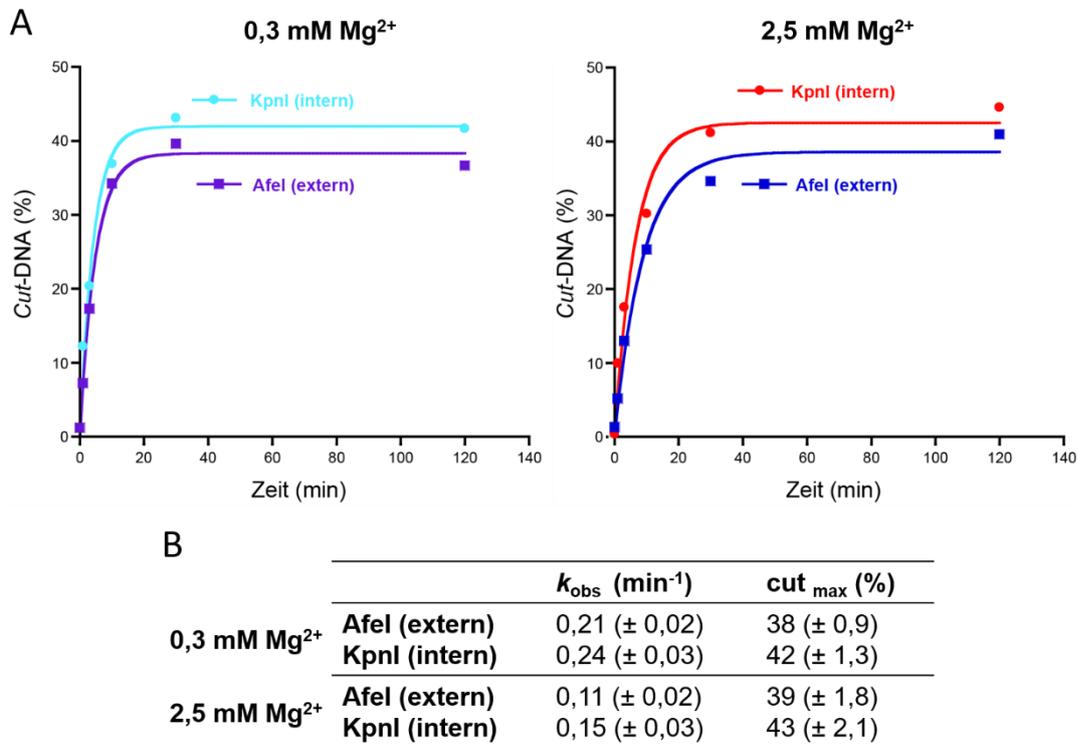


Abb. 26: Die *Remodeling*-Aktivität von ISWI in Abhängigkeit von der Magnesiumionenkonzentration. (A) Auswertung der *REA*-Assays mit 0,3 mM Mg^{2+} und 2,5 mM Mg^{2+} . Die Reaktionszeitpunkte einer *Remodeling*-Reaktion (1, 3, 10, 30 und 120 min) wurden zusammengefasst und mit einer Exponentialfunktion gefittet. Anhand der Funktionen konnten die Reaktionsgeschwindigkeiten (k_{obs}) und die jeweiligen maximal erreichten DNA-Zugänglichkeiten (cut_{max}) bestimmt werden (siehe 2.11.3). (B) Unter niedrigen und hohen Magnesiumkonzentrationen wurde ein annähernd gleich hoher prozentualer Anteil an DNA-Zugänglichkeit ermittelt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten unter hohen Mg^{2+} -Konzentrationen (2,5 mM) waren circa zweifach geringer als unter niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen (0,3 mM). Der Versuch wurde zwei Mal mit annähernd selbem Ergebnis und einheitlichen Bedingungen durchgeführt ($n=2$). Die Daten sind im Anhang (Abb. 54 und Abb. 55) aufgeführt. Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

Unter niedrigen und hohen Magnesiumionenkonzentrationen unterschieden sich die *Remodeling*-Geschwindigkeiten (k_{obs}) sowie die durch *Remodeling* erreichten DNA-Zugänglichkeiten der jeweils äußeren und der zentralen Nukleosomenposition kaum (Abb. 26B).

Arrays mit 0,3 mM Mg²⁺ wurden nur circa zweifach schneller *remodelt*, als *Arrays* mit 2,5 mM Mg²⁺. Allerdings scheint auch die ATPase-Aktivität durch Magnesiumionen in ähnlicher Weise beeinflusst zu sein (siehe 4.3). Bei den *Remodeling*-Versuchen mit 0,3 mM Mg²⁺ und 2,5 mM Mg²⁺ wurden wie in 3.4.1 beschrieben *Quench*-Kontrollen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Apyrase-Reaktionsstopps bei allen Kontrollen effizient funktioniert hatten und nicht durch die unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen beeinträchtigt wurden (siehe Anhang Abb. 53).

3.6 Etablierung der 25-mer Nukleosomen-Arrays

Um die Aussagekraft der bisher beschriebenen Versuche zu unterstreichen und den Einfluss der Chromatinfaltung auf die *Remodeling*-Aktivität noch besser untersuchen zu können, wurde das aus dreizehn Nukleosomen bestehende *Array*-Substrat zu einem fünfundzwanzig Nukleosomen langen Chromatin-Modellsubstrat weiterentwickelt. Mit einer Zunahme der *Array*länge konnte die Kompaktheit und *Array*-Interaktion erhöht werden [98]. Da nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, dass Differenzen in der Enzymaktivität die bisher beschriebenen Ergebnisse beeinflusst hatten wurde angestrebt, *Remodeling* einer internen und externen Position der *Arrays* mit demselben Restriktionsenzym zu detektieren.

3.6.1 Verlängerung der 13-mer Insert-Sequenzen zu 25-mer Sequenzen

Die 13-mer Verlängerung erfolgte durch eine Klonierung und beinhaltete mehrere Arbeitsschritte, deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt beschrieben werden. Die 13-mer Sequenzen enthalten eine *Ava*I Schnittstelle, die jeweils am entgegengesetzten Ende der 13-mer Insertsequenzen lokalisiert war (siehe 2.4.1). Die Plasmide pFMP 236 und pFMP 237 enthielten nur diese einzelne *Ava*I Schnittstelle (siehe 7.1.7 und 7.1.8). Diese Eigenschaft war essentiell, um die Verlängerung über einen Klonierungsschritt abwickeln zu können, bei dem die *Ava*I *sticky ends* als komplementäre Enden für die Ligation dienten (Abb. 27A). Als Insert wurde ein 12x 197 bp langes DNA-Fragment verwendet. Diese DNA Sequenz wurde durch einen partiellen *Ava*I Verdau der 25-mer 601 *nucleosome positioning sequence* (pFMP 166) gewonnen (siehe 2.5.1). Die 12-mer Fragmente (2364 bp) enthielten jedoch Verunreinigungen von 11- und 13-mer Fragmenten, da diese Banden im Gel schlecht voneinander zu trennen waren (Abb. 27B).

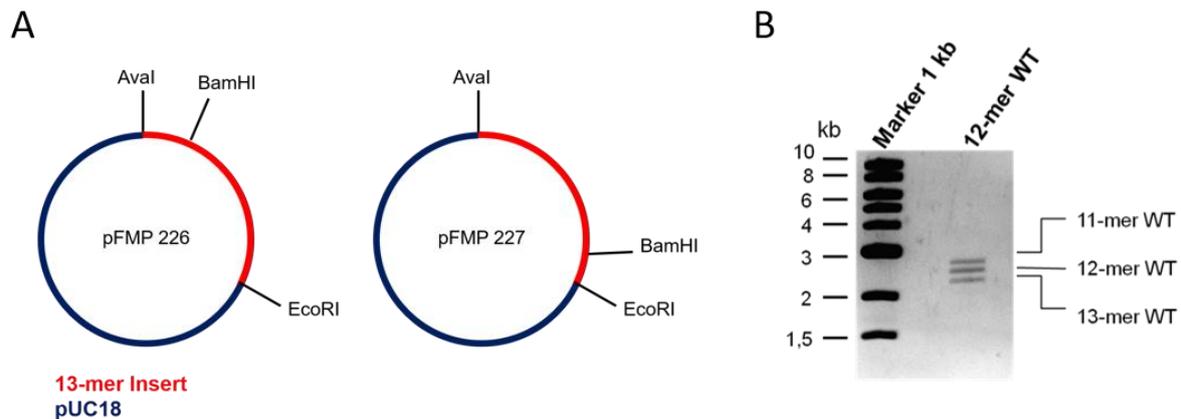


Abb. 27: Schematische Darstellung der Plasmide pFMP 236 bzw. 237 und Gelbild der 12-mer Isolation. (A) Die Plasmide pFMP 236 und 237 enthielten eine einzelne Aval Schnittstelle. Die Markierung der Aval Schnittstelle zeigt, dass diese innerhalb des 13-mer Inserts jeweils unterschiedlich zur BamHI Schnittstelle lokalisiert war. (B) Gelkontrolle der 12-mer 601 Isolation. Das Plasmid pFMP 166 wurde partiell mit dem Restriktionsenzym Aval verdaut. Die dabei entstandene 12-mer DNA-Bande wurde gelgereinigt, mittels eines Agarosegels (0,9 %) analysiert und mit EtBr gefärbt. Zu sehen war das gereinigte 12-mer Fragment (2364 bp) sowie Verunreinigungen durch 11- bzw. 13-mer Fragmente.

Das gereinigte 12-mer Substrat wurde in die mit Aval geschnittenen Plasmide pFMP 236 und pFMP 237 kloniert (siehe 2.5.3). Durch diesen Klonierungsschritt entstanden die Plasmide pFMP 232 bzw. pFMP 233 (siehe Plasmidkarten: 7.1.5 und 7.1.6). Beide Plasmide enthielten ein 25-mer langes Insert (25x 197 bp Einheiten). Zwölf 197 pb Einheiten besaßen die Wildtyp-Sequenz aus der 601 *nucleosome positioning sequence* (pFMP 166) [78]. Die dreizehn restlichen 197 bp Einheiten beherbergten die individuellen Restriktionsschnittstellen auf den Nucleosomen positionierenden Sequenzen. Diese Schnittstellen unterschieden sich in ihrer Position innerhalb des 25-mer Insert. Das Insert des Plasmids pFMP 232 besaß eine zentrale BamHI Schnittstelle. Das 25-mer Substrat pFMP 233 hingegen beinhaltete die Schnittstelle BamHI extern. Die individuellen Schnittstellen, die bei einer Variante zentral lagen, befanden sich somit im anderen Konstrukt peripher (Abb. 28). Daher wäre es möglich, Nucleosom drei im 25-mer *Array* pFMP 232 (intern) und das Nucleosom elf im 25-mer *Array* pFMP 233 (extern) mit demselben Enzym (BamHI) zu analysieren (siehe Abb. 8A und B).

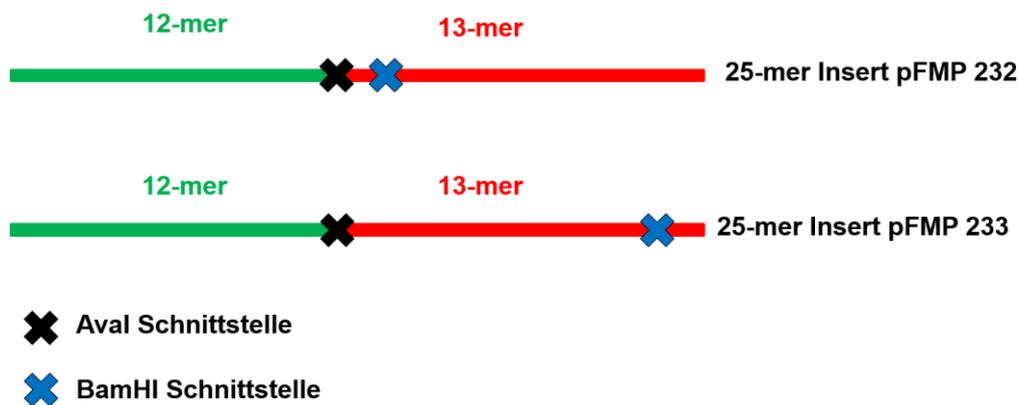


Abb. 28: Schematische Darstellung der 25-mer Inserts der Plasmide pFMP 232 und pFMP 233 mit Lokalisation der Aval und BamHI Schnittstellen.

3.6.2 Kontrollen der 25-mer Verlängerung

Um den Erfolg der Klonierung zu evaluieren, wurden verschiedene Enzymverdau und Gelkontrollen durchgeführt. Zuerst wurde das Plasmid pFMP 232 kloniert (siehe 7.1.5). Dieses Plasmid wurde mit den Enzymen XbaI, DraI und AflII verdaut. Eine dabei entstandene 2773 bp DNA-Bande konnte als Positiv-Kontrolle für die Klonierung bzw. für die Verlängerung zum Plasmid pFMP 233 genutzt werden. Die Klone aus der Klonierung zum Plasmid pFMP 233 wurden mit XbaI, EcoRI und AseI verdaut. Plasmide, die nach erfolgreichem Verdau ebenfalls eine 2773 große DNA-Bande aufwiesen, konnten als pFMP 233 identifiziert werden. Gleichzeitig konnte mit diesem Verdau gesichert werden, dass beide Plasmide dieselbe Insertlänge aufwiesen (Abb. 29A). Dies war aufgrund der Verunreinigung des 12-mer Fragments mit 11- und 13-mer Sequenzen notwendig.

Es kann jedoch nicht mit völliger Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Inserts dieser Plasmide um 26-mer oder 24-mer Derivate der 601 Sequenz handelt. Die Sequenzen sind sehr lang (4929 bp) und unterscheiden sich nur durch 200 bp (Abb. 29B). Diese kurze Differenz machte es unmöglich, die langen Sequenzen anhand einer Gelkontrolle zu unterscheiden. Auch eine Sequenzierung konnte hierzu nicht verwendet werden, da das 12-mer Fragment aus zwölf einheitlichen, repetitiven Sequenzen bestand.

Mittels eines weiteren Enzymverdau wurde eine Kontrolle durchgeführt, mit der gezeigt werden konnte, dass es sich bei den Inserts der Plasmide pFMP 232 und 233 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um gleich große 25-mer Sequenzen handelt. Als Negativ-Kontrolle diente ein Plasmid, das durch die 25-mer Verlängerung zum Plasmid 232 entstanden war. Dieser Klon enthielt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine 24-mer lange Insertsequenz (24x 197 bp). Das Plasmid pFMP 232 und die Negativ-Kontrolle (24x 197 bp) wurden mit den Enzymen XbaI, DraI und AflII verdaut. Das Plasmid pFMP 233 hingegen wurde mit den

Restriktionsenzymen XbaI und SacI vollständig verdaut. Die XbaI Schnittstelle liegt bei allen Insertsequenzen vor dem repetitiven 12-mer Anteil. Im Fall, dass die Plasmide pFMP 232 und 233 das 12-mer Konstrukt enthalten, sollten die Gelkontrollen beider Verdau eine 2773 bp große DNA-Bande aufweisen. Der Verdau der Negativ-Kontrolle (24x 197 bp) sollte jedoch ein 197 bp kleineres DNA-Fragment aufweisen. Die Gelkontrollen dieses Verdau mit den Plasmiden pFMP 232 und 233 zeigten, dass bei beiden Plasmidverdau ein gleich langes DNA-Fragment der Größe 2773 bp vorhanden war (Abb. 29C). Der Verdau der Negativ-Kontrolle (24x 197 bp) hingegen zeigte eine circa 200 bp kleinere DNA-Bande in der Gelkontrolle (Abb. 29C). Dadurch konnte angenommen werden, dass die Inserts dieser beiden Plasmide ein 12-mer langes Insert beinhalteten.

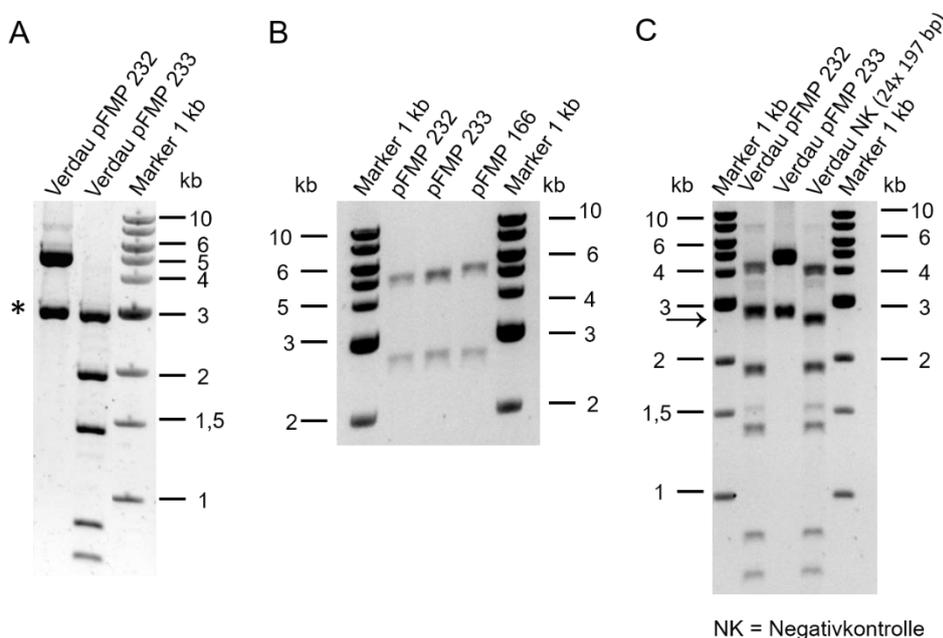


Abb. 29: Gelkontrollen zum Nachweis der Verlängerung der 13-mer Plasmide zu 25-mer Insert-Sequenzen. Für alle in Abb. 29 aufgeführten Gelkontrollen wurden 20,0 cm lange, 0,9 % Agarosegele und der Puffer 0,5x TBE verwendet. Die Gele wurden mit EtBr gefärbt. (A) Gelanalyse zum Nachweis der Inserthomogenität der verlängerten Plasmid Klone pFMP 232 und 233. Die Positiv-Kontrolle (pFMP 232 verdaut mit XbaI, DraI und AflII) und der verlängerte Plasmid Klon pFMP 233 (verdaut mit XbaI, EcoRI und AseI) wiesen eine DNA-Bande auf der Höhe von 2773 bp auf (*). Beide Plasmide besitzen die gleiche Insertlänge (B) Vergleich der 25-mer Inserts (4929 bp) der Plasmide: pFMP 232, pFMP 233 und pFMP 166. Die 25-mer Inserts wurden mittels EcoRI und HincII Verdau aus den Plasmiden isoliert. (C) Gelanalyse zum Nachweis, dass es sich bei den Inserts der Plasmide pFMP 232 und 233 wahrscheinlich um 25-mer Sequenzen handelt. Es erfolgten folgende Verdau: pFMP 232 (AflII, DraI und XbaI) und pFMP 233 (SacI, XbaI). Beide Verdau wiesen eine circa 2773 bp Bande im Gel auf (→). Bei der Negativ-Kontrolle (24x 197 bp) war eine circa 200 bp kleinere DNA-Bande zu sehen.

3.6.3 Assemblierung und Qualitätskontrollen der 25-mer Arrays

Die 25-mer Inserts der Plasmide pFMP 232 und 233 wurden wie in 2.6.2 beschrieben mittels EcoRI, HincII, AseI und ApaLI Verdau von den Vektoren isoliert. Die Gelkontrollen zeigten, dass diese Verdau erfolgreich waren und die 25-mer *Array*-DNAs vollständig vom jeweiligen Vektor getrennt wurden (Abb. 30A). Die 25-mer *Array*-DNAs wurden mit Wildtype-Oktameren zu Nukleosomen-Arrays assembliert (siehe Abb. 16B). Die Assemblierung erfolgte wie in 2.9.1 beschrieben. Vor der präparativen Assemblierung wurden Titrationsversuche wie in 3.1 beschrieben durchgeführt. Die Qualitätskontrollen der Titrationsassemblierungen zeigten das notwendige molare Verhältnis von DNA zu Oktameren, bei denen die *Arrays* optimal mit Oktameren gesättigt waren. Für die 25-mer *Arrays* pFMP 233 wurde dabei eine molare Ratio von 1: 1,15 ermittelt. Bei den 25-mer *Arrays* pFMP 233 betrug diese molare Ratio 1: 1,2 (Gelkontrollen der Titrationsversuche werden nicht gezeigt). Mit diesen molaren Ratios wurden die 25-mer Nukleosomen-Arrays im großen Maßstab assembliert. Nach der Magnesiumfällung der *Arrays* (3,5 mM MgCl₂) wurden dieselben Qualitätskontrollen wie in Abschnitt 3.1 und 3.1.1 beschrieben ausgeführt (Abb. 30B und C).

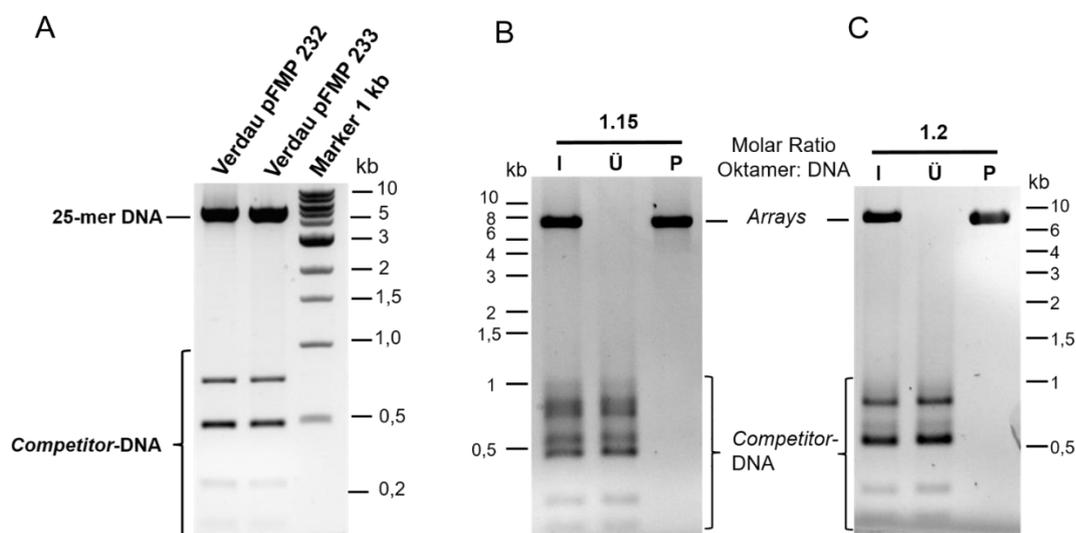


Abb. 30: Ergebnisse der Gelanalysen nach der Magnesiumfällung der 25-mer Arrays. (A) pFMP 232 und pFMP 233 nach EcoRI, HincII, AseI und ApaLI Verdau. Der Verdau wurde auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt. Die 25-mer *Array*-DNA (4929 bp) verlief bei circa 5000 bp. Der Vektor wurde in DNA-Banden der Größe 751, 484, 495, 495, 241 und 130 bp zerkleinert (*Competitor*-DNA). (B) Gelkontrolle der 25-mer *Arrays* aus pFMP 232 (BamHI intern). Die *Competitor*-DNA begann zu *shiften*, somit waren die 25-mer *Arrays* ausreichend mit Oktameren besetzt [79]. Im Pellet (P) befand sich im Gegensatz zum *Input* (I) der Magnesiumfällung keine *Competitor*-DNA. Im Überstand (Ü) waren keine *Arrays* enthalten. (C) Die Gelkontrolle der 25-mer *Arrays* pFMP 233 (BamHI extern) zeigte dasselbe Bild wie in (B) beschrieben. Auch hier konnte von einer genügenden Oktamersättigung der *Arrays* ausgegangen werden. (B und C) Die Gelkontrollen erfolgten mittels 0,7 % Agarosegel, 0,2x TB Puffer und wurden mit EtBr gefärbt.

Die weiterführenden Qualitätskontrollen wurden wie in 2.9.3 und 3.1.1 beschrieben absolviert. Alle Qualitätskontrollen bewiesen, dass die Oktamere richtig auf den 25-mer *Array*-DNAs platziert waren und diese nicht über- oder untergesättigt waren (Abb. 31). Eine ausreichende Sättigung der *Arrays* war notwendig, um die Kompaktierung und Oktamerbesetzung der Nukleosomen positionierenden Sequenzen in Nukleosomen-*Arrays* zu sichern [98]. Die präparativ hergestellten 25-mer Nukleosomen-*Arrays* mit einer molaren Ratio von 1:1,15 (*Arrays* pFMP 232) und 1:1,2 (*Arrays* pFMP 233) wurden für die später aufgeführten *Remodeling*-Versuche verwendet.

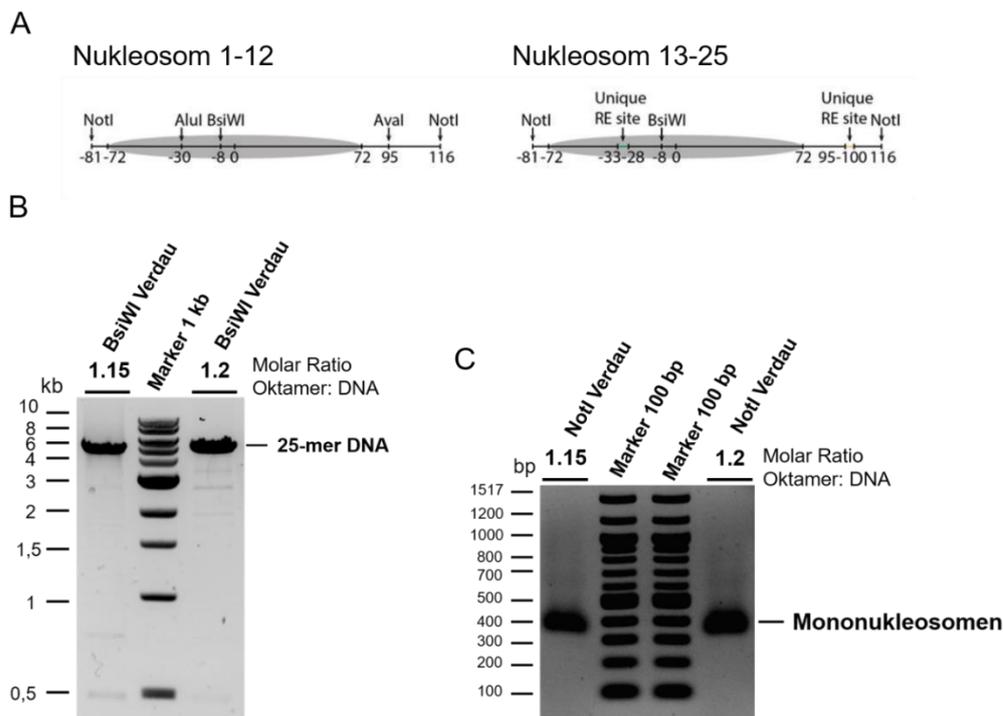


Abb. 31: Überprüfung der Linker-Regionen und der Nukleosomen positionierenden Sequenzen in 25-mer *Arrays*. (A) Positionierung der NotI und BsiWI Schnittstellen auf den Nukleosomen der 25-mer *Arrays*. Die individuellen Schnittstellen (*unique RE sites*) sind nur auf den Nukleosomen 13-25 vorhanden. Die Nukleosomen 1-12 besitzen an dieser Stelle eine AluI Schnittstelle. Die Nummerierungen entsprechen der Position der Schnittstelle in bp relativ zur nukleosomalen Dyaden-Achse (übernommen von Ludwigsen, Hepp et al., *Methods in Molecular Biology*, eingereicht). (B) Gelkontrolle der BsiWI Verdau zur Prüfung der Zugänglichkeit der Nukleosomen positionierenden Sequenz in 25-mer Nukleosomen-*Arrays* [72]. Nach dem BsiWI und Proteinaseverdau der *Arrays* waren nur 25-mer DNA-Banden bei circa 5000 bp und keine DNA-Leiter sichtbar. Dies galt für die 25-mer Nukleosomen-*Arrays* pFMP 232 (*Molar Ratio* 1.15) und pFMP 233 (*Molar Ratio* 1.2). Die geringe Zugänglichkeit dieser Regionen bewies eine gute Sättigung der Nukleosomen positionierenden Sequenzen mit Oktameren [79]. Es wurde ein 1 % Agarosegel und die EtBr-Färbung verwendet. (C) NotI Verdau der 25-mer *Arrays*. In den Gelkontrollen (1,1 % Agarosegel und EtBr-Färbung) war keine freie DNA bei 200 bp zu erkennen, sondern nur Mononukleosomen (400 bp). Die 601 Sequenzen waren hiermit ausreichend mit Oktameren besetzt und gesättigt [79].

3.7 25-mer Nukleosomen-Arrays präzipitieren bei niedrigeren Magnesiumkonzentrationen als 13-mer Nukleosomen-Arrays

Um die Fällungseigenschaft der 25-mer Arrays zu testen, wurde wie in 2.10 beschrieben eine graduelle Magnesiumfällung durchgeführt. Die Magnesiumfällung wurde mit 13-mer und 25-mer Arrays unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt. Arrays mit einer höheren Anzahl an Nukleosomen präzipitieren bei niedrigeren Magnesiumkonzentrationen [98]. Diese Beobachtung wird dadurch begründet, dass mit einer zunehmenden Arraylänge eine Zunahme der intermolekularen Interaktion und der Kompaktheit von Arrays erreicht wird, und deshalb geringere Mengen an Magnesiumionen zur Präzipitation benötigt werden [98]. Bei einer Konzentration von 2,5 mM Mg^{2+} präzipitierten circa 89 ($\pm 0,3$) % der 13-mer Arrays. Ein Magnesiumgehalt von 1,7 mM Mg^{2+} hingegen genügte um 95 ($\pm 1,0$) % der eingesetzten 25-mer Arrays zu fällen. Unter 0,1 mM Mg^{2+} wurden 11 ($\pm 7,0$) % der 25-mer Arrays gefällt. Die Ergebnisse der Fällungsversuche mit 25-mer Arrays sind im Anhang gezeigt (Abb. 65).

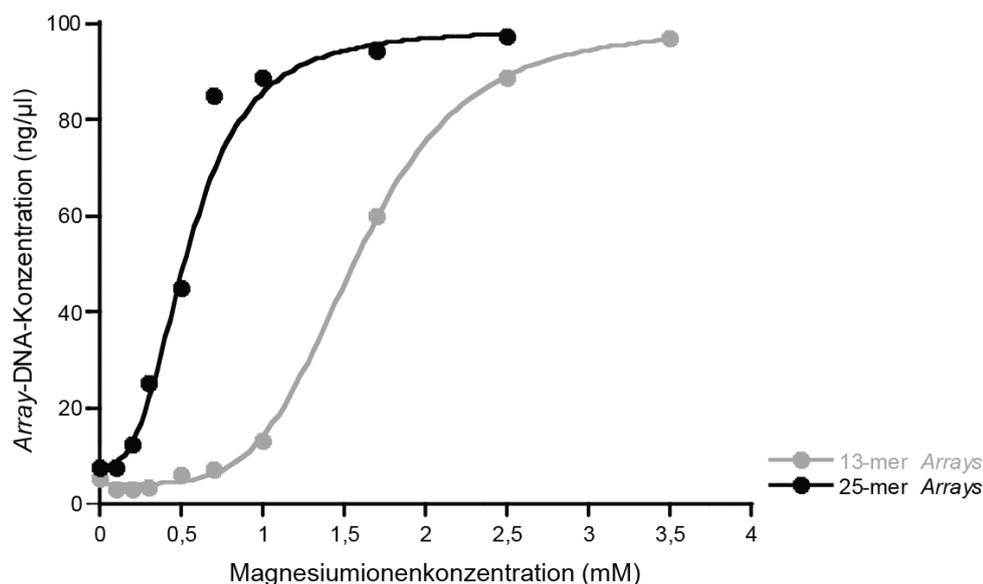


Abb. 32: Mit zunehmender Länge präzipitierten Nukleosomen-Arrays bei niedrigeren Mg^{2+} -Konzentrationen [98]. Ergebnisse aus den graduellen Magnesiumfällungsversuchen mit 13-mer und 25-mer Arrays. Die fünfundzwanzig Nukleosomen langen Arrays präzipitierten bei geringeren Magnesiumkonzentrationen als 13-mer Arrays. Der Versuch wurde zwei Mal mit 13- und 25-mer Arrays durchgeführt ($n=2$). Die Fehler wurden mittels der Differenz des minimalen und maximalen Wertes bestimmt. Die Versuchsdaten sind im Anhang abgebildet (siehe Anhang Abb. 65).

3.8 Remodeling der Nukleosomen drei und elf in 25-mer Arrays

Um *Remodeling* innerhalb von 25-mer Nukleosomen-Arrays zu detektieren, wurde der in Kapitel 2.11 beschriebene *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assay* durchgeführt. Zunächst wurde versucht *Remodeling* an den Nukleosomenpositionen zwei (Array pFMP 232) und

zwölf (*Array* pFMP 233) zu analysieren. Die 25-mer *Array*-Konstrukte enthielten an diesen Positionen jeweils eine *AfeI* Restriktionsschnittstelle. Die *Assay*-Gelanalysen der Nukleosomenposition zwölf (*Array* pFMP 233) wiesen eine *Cut*-DNA-Bande der Größe 4664 bp und eine *Uncut*-DNA-Bande mit 4929 bp auf. Aufgrund der geringen Basenpaardifferenz und der Größe der DNA-Banden war es nicht möglich, diese mittels eines 20 cm langen 0,7 % Agarosegels zu trennen (nicht gezeigt).

Daher war es notwendig auf die Nukleosomenpositionen drei (*Array* pFMP 233) bzw. elf (*Array* pFMP 232) auszuweichen. Diese Nukleosomenpositionen besaßen jeweils eine *Bam*HI Restriktionsschnittstelle auf den Nukleosomen positionierenden Sequenzen (Abb. 33A und B). Die Größe der *Cut*- und *Uncut*-DNA-Banden betrug für die externe Nukleosomenposition elf (*Array* pFMP 233) 4465 bp bzw. 4929 bp. Mit dem Größenunterschied von 464 bp zwischen der *Uncut*- und *Cut*-DNA-Bande war es möglich, die geschnittene und ungeschnittene DNA aufzutrennen und zu analysieren (siehe Abb. 33A).

Um sicherzustellen, dass das Enzym *Bam*HI unter *Assay*-Pufferbedingungen voll aktiv war, wurden Verdauungen ausgeführt. Hierbei wurden 125 µg 25-mer *Array*-DNA (pFMP 232 und 233) mit 10 U *Bam*HI bei 26 °C in 1x *Remodeling*-Puffer A (siehe 2.2.8) verdaut. Gelkontrollen der Verdauung konnten zeigen, dass *Bam*HI eine gute Aktivität hatte und dass nach bereits zehn Minuten Verdauung keine ungeschnittene DNA mehr vorhanden war (siehe Anhang Abb. 56). Mittels *Bam*HI Verdauung war es somit möglich, *Remodeling* an den Nukleosomen drei und elf in 25-mer *Arrays* zu detektieren und zu vergleichen. Die folgenden *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* der 25-mer *Arrays* wurden alle mit diesen Nukleosomenpositionen durchgeführt und liefen unter gleichen Bedingungen wie die *Assays* mit 13-mer *Arrays* ab (siehe 3.2). Somit enthielt eine *Remodeling*-Reaktion 5 µM ATP, 200 nM ISWI, Nukleosomen einer Konzentration von 100 nM sowie 1x *Remodeling*-Puffer A (siehe 2.2.8) und 1x ATP-Regenerierungssystem (siehe Tab. 6).

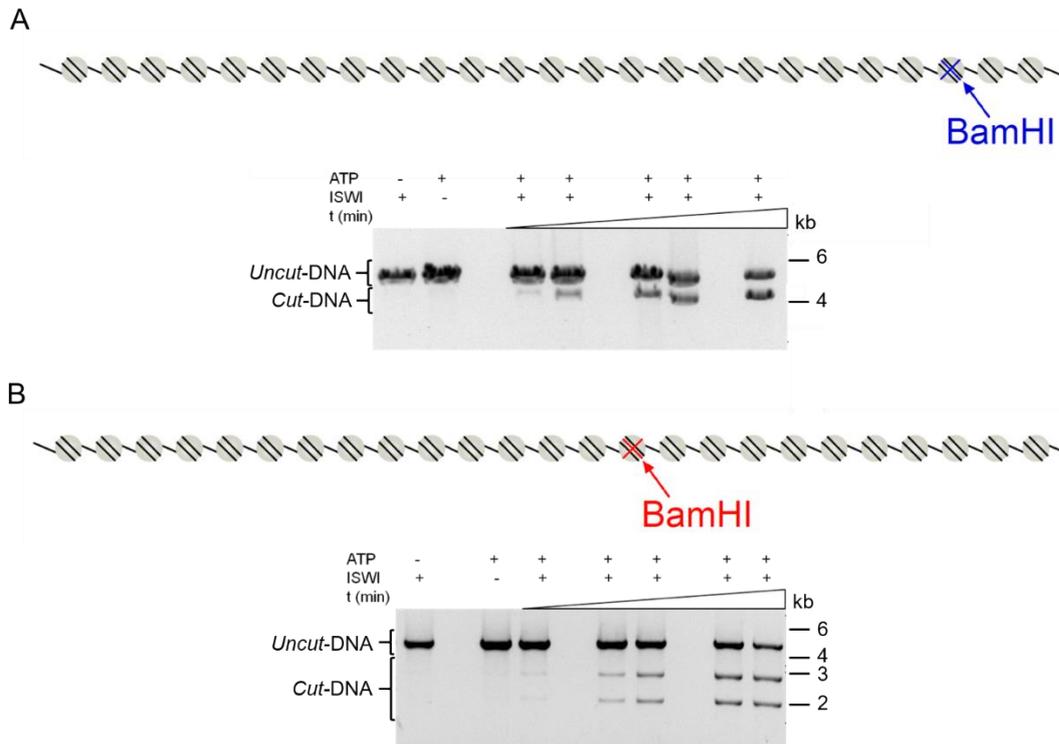


Abb. 33: Chromatin-Accessibility-Assays der Nucleosomen drei und elf in 25-mer Arrays. (A) 25-mer Arrays pFMP 233: 2D-Nucleosomen-Modell mit Markierung der Nucleosomenposition drei (BamHI extern). Die Cut-DNA war im 0,7 % Agarosegel gut von der Uncut-DNA zu trennen. Die Negativ-Kontrollen (- ISWI und - ATP) enthielten kaum Cut-DNA. (B) 25-mer Arrays pFMP 232: Schematische Darstellung der Nucleosomenposition elf (BamHI intern). Die Gelanalyse (0,9 % Agarosegel und EtBr Färbung) zeigte, dass mit zunehmender Reaktionsdauer (1, 3, 10, 30 und 120 min) die Masse der Cut-DNA (2832 und 2079 bp) zunahm und die Zugänglichkeit der Nucleosomenposition durch *Remodeling* erhöht wurde. Die Kontrollen ohne ATP und ohne ISWI wiesen fast keine geschnittene DNA auf.

Die Gelbilder der Assays wurden quantifiziert und die Werte der maximal *remodelten* DNA mit den *Timepoints* einer *Remodeling*-Reaktion korreliert. Die aus den Exponentialfunktionen ermittelten Werte für die maximale DNA-Zugänglichkeit (cut_{max}) unterschieden sich nach 120 min *Remodeling*-Dauer kaum zwischen dem internen und externen Nucleosom (Abb. 34A und B). Im Bezug auf die Reaktionsgeschwindigkeiten (k_{obs}) des *Remodeling*-Enzyms ISWI konnten ebenfalls keine relevanten Unterschiede zwischen externem und internem *Remodeling* festgestellt werden (Abb. 34B). Die Versuche mit den verlängerten 25-mer Arrays bestätigten somit die Beobachtungen aus den Versuchen mit 13-mer Arrays.

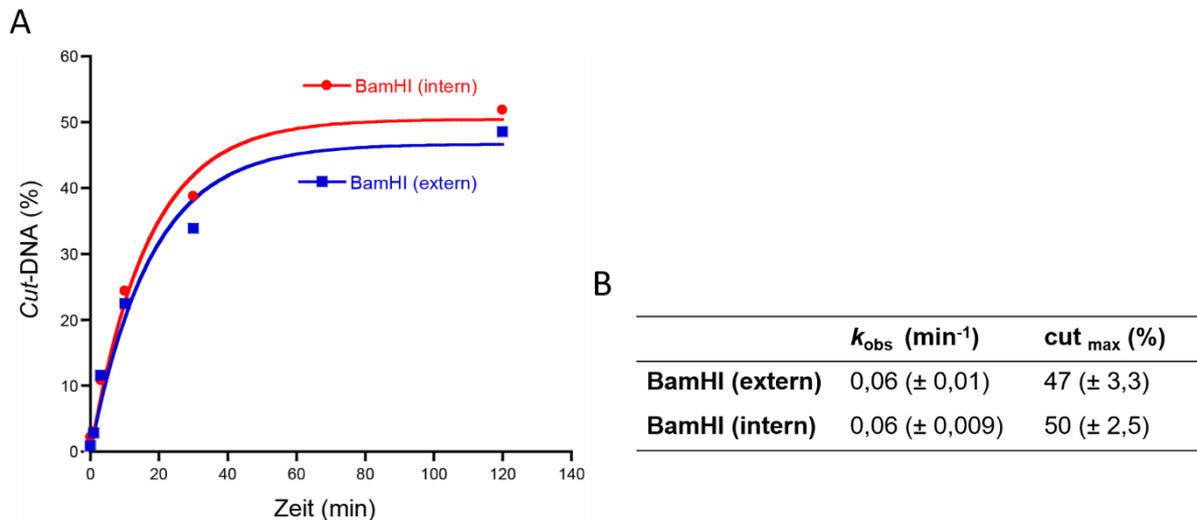


Abb. 34: Die *Remodeling*-Aktivität von ISWI in 25-mer *Arrays* unterscheidet sich kaum zwischen internen und externen Nukleosomen. (A) Exponentialfunktionen aus der Quantifizierung der Gelbilder, die in Abb. 33 aufgeführt sind. Der Anteil der *Cut*-DNA zeigte nach 1, 3, 10, 30 und 120 min Reaktionsdauer für die intern (rot) und extern (blau) ermittelte Funktion annähernd gleiche Werte. (B) Die interne und externe Nukleosomenposition der 25-mer *Arrays* wurde mit derselben Geschwindigkeit (k_{obs}) *remodelt*. Der Versuch wurde zwei Mal unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt und konnte die oben gezeigten Ergebnisse reproduzieren ($n=2$) (siehe Anhang Abb. 57 und Abb. 58). Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

3.9 Einfluss der Magnesiumionenkonzentration in *Remodeling*-Assays mit 25-mer *Arrays*

Um den Einfluss des magnesiumabhängigen Faltungszustands der *Arrays* auf die *Remodeling*-Aktivität von ISWI zu untersuchen, wurden *Remodeling*-Assays mit hohen und niedrigen Magnesiumkonzentrationen durchgeführt und miteinander verglichen (siehe Abb. 35A und B). Es wurden Magnesiumkonzentrationen verwendet, bei denen die 25-mer *Arrays* kaum ($0,2 \text{ mM Mg}^{2+}$) bzw. nahezu vollständig präzipitierten ($1,7 \text{ mM Mg}^{2+}$) (siehe Abb. 32). Die *Remodeling*-Assays mit Magnesiumvariation wurden wie in 2.11.1 beschrieben durchgeführt. Alle *Remodeling*-Reaktionen enthielten 200 nM ISWI , $5 \text{ }\mu\text{M ATP}$ und $100 \text{ nM Nukleosomen}$. Die Gelanalysen der *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen sind im Anhang aufgeführt (Abb. 59). Die Abbildung 35A zeigt die aus den Gelbildern ermittelten Exponentialfunktionen.

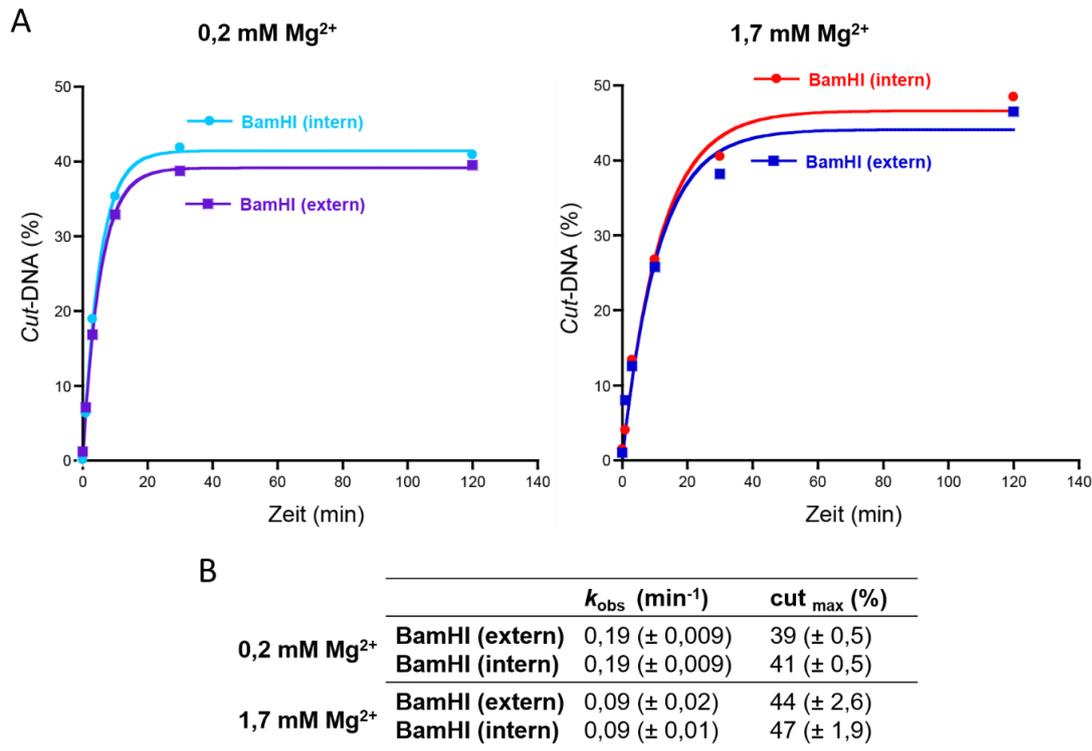


Abb. 35: Einfluss von Magnesiumionen auf die *Remodeling*-Effizienz von ISWI in 25-mer *Arrays*. (A) Funktionen aus den *REAA*s mit 0,2 mM Mg²⁺ und 1,7 mM Mg²⁺. Die quantifizierte Menge an *Cut*-DNA (%) und die *Timepoints* einer Reaktion wurden zu einer einzelnen Exponentialfunktion gefittet. (B) Unter 1,7 mM Mg²⁺ betrug die Reaktionsgeschwindigkeiten (k_{obs}) 0,09 min⁻¹ für internes und externes *Remodeling*. Die 0,2 mM Mg²⁺ haltigen *Arrays* hingegen wurden annähernd doppelt so schnell *remodelt*. Die Versuche wurden zwei Mal unter identischen Bedingungen und mit ähnlichem Ergebnis wiederholt ($n=2$) (siehe Anhang Abb. 60 und Abb. 61). Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

Wie schon die Ergebnisse der Versuche mit 13-mer *Arrays* demonstriert hatten, wurden auch die 25-mer *Arrays* mit niedriger Magnesiumkonzentration annähernd doppelt so schnell *remodelt*, wie die *Arrays* mit hoher Magnesiumkonzentration (siehe 3.5). Ob diese Beobachtung durch die unterschiedliche Kompaktheit der *Arrays* hervorgerufen wurde oder ob die ATPase-Aktivität durch Magnesiumionen beeinflusst wurde, wird im Abschnitt 4.3 diskutiert. Bei *Remodeling*-Reaktionen mit derselben Magnesiumionenkonzentration wurden bezüglich der internen und externen Reaktionsgeschwindigkeiten keine Unterschiede festgestellt. Die cut_{max}-Werte variierten leicht zwischen internen und externen Nukleosomen. Es scheint, dass unabhängig der Magnesiumkonzentration für die jeweils internen Nukleosomen leicht höhere Zugänglichkeiten erreicht wurden. Diese Unterschiede waren jedoch zu gering, um manifeste Einflüsse der Chromatinfaltung oder der unterschiedlichen Nukleosomenpositionen auf die *Remodeling*-Aktivität von ISWI zu eruieren.

3.10 Vergleich unterschiedlicher ISWI-Konzentrationen in REAAs mit 25-mer Arrays

Um die Einflussgröße der ISWI-Konzentration in REAs mit 25-mer Arrays näher zu untersuchen, wurden *Remodeling*-Versuche mit zwei unterschiedlichen ISWI-Konzentrationen durchgeführt. Die bisherigen Versuche enthielten eine Mononukleosomen-Konzentration von 100 nM und eine ISWI-Konzentration von 200 nM. Um zu untersuchen, wie *Remodeling* in 25-mer Arrays durch niedrige, limitierende Mengen an ISWI beeinflusst wird, wurden REAAs mit einer Mononukleosomen-Konzentration von 400 nM und einer ISWI-Konzentration von 40 nM durchgeführt (siehe 2.11.2). Rechnerisch gesehen standen somit für zehn Mononukleosomen nur ein Molekül ISWI zur Verfügung (Abb. 36A). Als Kontrolle dienten Assays mit derselben Menge an Nukleosomeneinheiten (400 nM) und höheren, nicht limitierenden ISWI-Konzentrationen (500 nM). Die Gelelektrophoresebilder der Versuche mit ISWI-Variation sind im Anhang abgebildet (Abb. 62) und wurden für die Quantifizierung verwendet. Anhand der Resultate aus der Gelbilderquantifizierung wurden die in Abbildung 36B gezeigten Exponentialfunktionen ermittelt (siehe 2.11.3).

Unter niedrigen, limitierenden ISWI-Konzentrationen (40 nM) wurden die 25-mer Arrays fünffach langsamer *remodelt* (Abb. 36C). Die ermittelten Funktionen aus den Versuchen mit 500 nM ISWI zeigten, dass die maximale DNA-Zugänglichkeit bereits nach circa 100 min Reaktionsdauer erreicht wurde. Unter langsameren Reaktionsgeschwindigkeiten konnten jedoch mit zunehmender Reaktionsdauer die gleichen DNA-Zugänglichkeiten wie in den Assays mit 500 nM ISWI erreicht werden [72, 79].

Weder unter gesättigten noch unter erniedrigten ISWI-Konzentrationen konnten bedeutende Unterschiede der DNA-Zugänglichkeiten und der Reaktionsgeschwindigkeiten, zwischen der internen und peripheren Nukleosomenposition in 25-mer Arrays festgestellt werden.

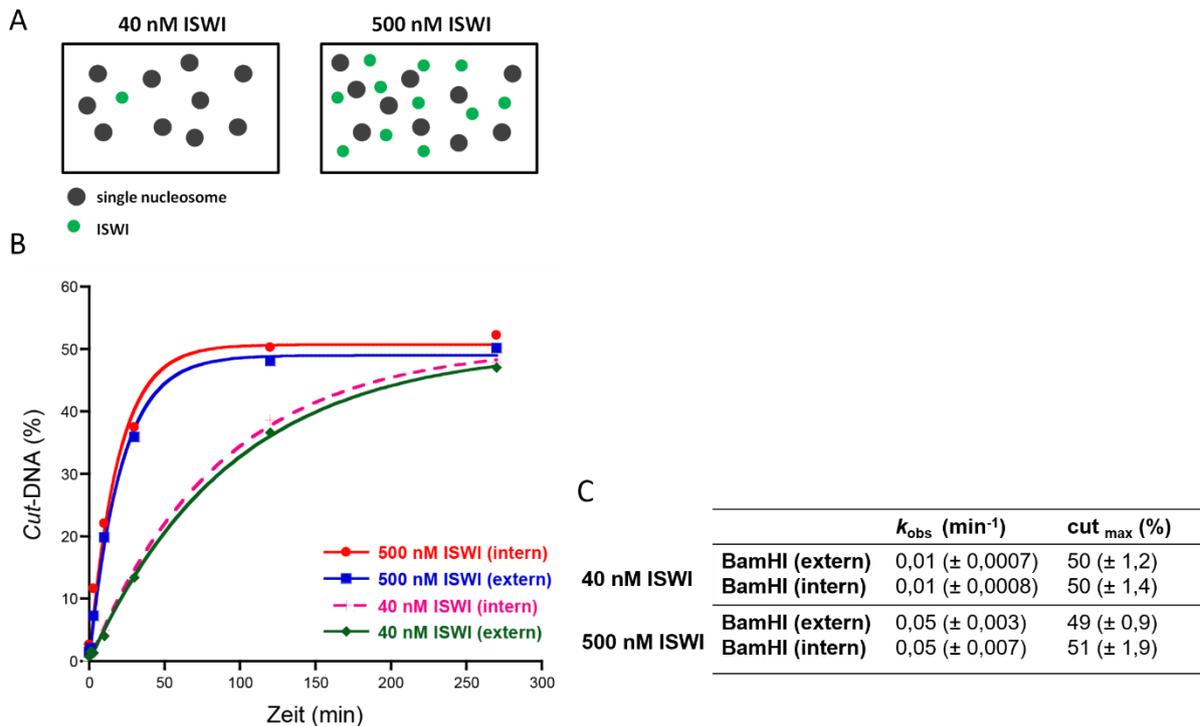


Abb. 36: Variation der ISWI-Konzentration in *Remodeling*-Versuchen mit 25-mer Arrays. (A) Schematische Darstellung der Relation zwischen ISWI-Konzentration und der Array-Menge, welche in Mononucleosomeneinheiten (*single nucleosome*) berechnet wurde. (B) Exponentialfunktionen, die aus der Quantifizierung der Gelbilder (Abb. 62) ermittelt wurden. (C) Die Arrays der *Remodeling*-Reaktion mit niedriger ISWI Konzentration (40 nM) wurden im Vergleich zu den Versuchen mit 500 nM ISWI circa fünffach langsamer *remodelt*. Nach einer Reaktionsdauer von 270 min erreichten die Funktionen der REAAs mit 40 nM und 500 nM ISWI einen annähernd gleichen prozentualen Anteil an maximal geschnittener DNA (cut_{max}). Der Versuch wurde zweimal und einheitlich, mit beinahe gleichem Ergebnis durchgeführt ($n=2$) (siehe Anhang Abb. 63 und Abb. 64). Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

3.11 Entwicklung eines Dinucleosomen-Modellsubstrats mit WT- und gH4-Oktameren

In diesem Abschnitt soll beschrieben werden, wie die Beeinflussung benachbarter Nucleosomen während des *Remodeling* näher untersucht werden könnte. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit 13-mer und 25-mer Arrays warfen die Frage auf, ob *Remodeling* wie eine Art Schneebahner funktioniert und benachbarte Nucleosomen für *Remodeling* keine Barriere darstellen. Um die Beeinflussung benachbarter Nucleosomen durch ISWI zu erforschen, war es zunächst notwendig ein Nucleosomensubstrat zu entwickeln, mit dem das *Remodeling*-Verhalten benachbarter Nucleosomen untersucht werden kann.

Um dieses Ziel zu realisieren, wurde zunächst versucht drei unterschiedliche Varianten von Dinucleosomen-Modellsubstraten zu etablieren. Hierbei sollte ein Dinucleosom entwickelt

werden, welches ein WT-Oktamer und ein gH4-Oktamer enthält (Abb. 37A). Nukleosomen ohne N-terminalem H4-Schwanz (gH4) werden weniger effizient *remodelt*, als Nukleosomen die diesen Histonschwanz besitzen (WT), da ISWI möglicherweise einen Kontakt mit dem N-terminalen Histonschwanz eingeht [67, 73, 74]. Der Einfluss des *remodelten* WT-Nukleosoms auf ein Nukleosom mit gH4 könnte mittels eines Dinukleosoms, dass sowohl WT und gH4 Oktamere besitzt überprüft werden. Daneben sollten zwei Varianten hergestellt werden, welche homogen sind, d.h. entweder WT-Oktamere oder gH-Oktamere enthalten (Abb. 37B und C). Diese homogenen Dinukleosomen sollten als Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen dienen.

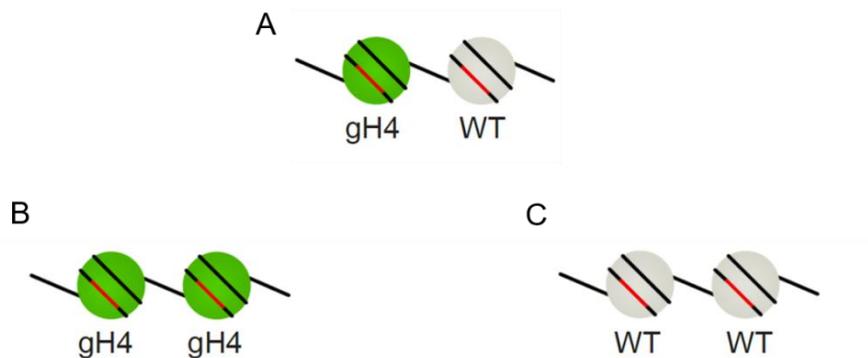


Abb. 37: Übersicht der Dinukleosom-Modellsubstrat-Varianten. (A) Heterogene Dinukleosom-Variante mit einem WT- (grau) und einem gH4-Oktamer (grün). (B) Homogenes Nukleosomensubstrat mit zwei gH4-Oktameren. (C) Einheitliches Dinukleosom mit zwei WT-Oktameren. Die jeweiligen Nukleosomen positionierenden Sequenzen sind rot gekennzeichnet.

Homogene Dinukleosomen konnten entlang einer Dimer-DNA-Sequenz mit dem jeweiligen Oktamertyp assembliert werden. Um heterogene Dinukleosomen herzustellen mussten zuerst Mononukleosomen produziert werden. Diese Mononukleosomen enthielten entweder WT- oder gH-Oktamere. In einem weiteren Schritt sollten diese zwei Varianten von Mononukleosomen miteinander ligiert werden [92]. Das Produkt wäre dann ein Dinukleosom, welches ein gH4- und WT-Oktamer enthält. Die Oktamere wurden wie in Kapitel 2.8 beschrieben hergestellt. Die entsprechenden Gelkontrollen der WT- und gH4-Oktamere wurden bereits im Abschnitt 3.1 dargestellt. Um Mono- und Dinukleosomen zu assemblieren, bedurfte es der Generierung von Mono- und Dimer-DNA-Sequenzen.

3.11.1 Erfolgreiche Präparation von DNA-Monomeren zur Ligation eines Dimer-Konstrukts

Die Monomer-DNA-Sequenzen wurden mittels PCR aus den Plasmiden pFMP 213 und 217 amplifiziert und anschließend mit dem Enzym DraIII verdaut und gelgereinigt (siehe 2.12.2, 2.12.4 und Abb. 38A). Die beiden PCR-Amplifikate PCRA 213 und PCRA 217 entstammten

der 601 *nucleosome positioning sequence* und enthielten eine 147 bp lange Nukleosomen positionierende Sequenz [78].

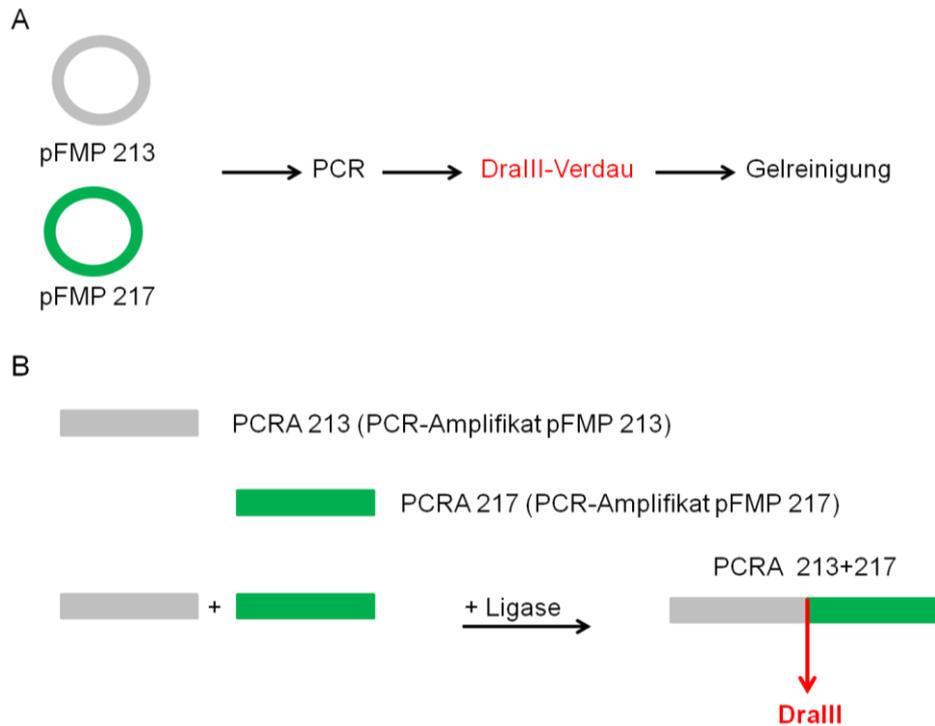


Abb. 38: Übersicht über die Herstellung der unterschiedlichen PCR-Amplifikate. (A) Übersicht der Arbeitsschritte zur Herstellung der PCR-Amplifikate 213+217. (B) Schematische Darstellung der Ligation zur Generierung des Dimersubstrats PCRA 213+217.

Das PCRA 213 besaß am 5' Ende eine DralIII Schnittstelle und einen CY5 Marker am 3' Ende. Das aus Plasmid pFMP 217 gewonnene Amplifikat (PCRA 217) beherbergte am 3' Ende eine DralIII Schnittstelle. Das PCRA 217 wurde gewählt, da es eine besonders Guanin und Cytosin reiche Sequenz besaß und daher mittels *Methyl-Footprinting* analysiert werden kann. Anhand dieser Methode könnte *Remodeling* dieser Nukleosomenposition im Dinukleosom nachgewiesen werden, da nur zugängliche, nicht mit Oktamer besetzte DNA-Bereiche methyliert werden können. Um *Remodeling* innerhalb eines Dinukleosoms zu analysieren und differenzieren, mussten daher zwei unterschiedliche DNA-Monomer-Sequenzen gewählt werden. Die Sequenzen des PCRA 213 und 217 sind in Kapitel 2.1.8 aufgeführt. Um eine Dimer-Sequenz zu generieren wurden die DralIII geschnittenen Monomer Sequenzen ligiert (siehe 2.12.5 und Abb. 38B) [92]. In Abbildung 39 ist zu sehen, dass die Ligation der verdauten PCR-Amplifikate erfolgreich war. Eine Selbstligation der PCR-Amplifikate konnte mittels des in Abb. 39 gezeigten Ligationsversuchs ausgeschlossen werden. Das Produkt der Ligation wurde gelgereinigt und diente als *Template* der PCR zur Amplifikation des Dimer-Konstrukts (siehe 2.12.6). Um Verunreinigungen zu eliminieren, wurde dieses PCR-Amplifikat nach der PCR ebenfalls gelgereinigt (nicht gezeigt). Die

gefertigten DNA-Monomer-Sequenzen und das Dimer-Konstrukt waren somit fertig präpariert und konnten zur Nukleosomen-Assemblierung eingesetzt werden.

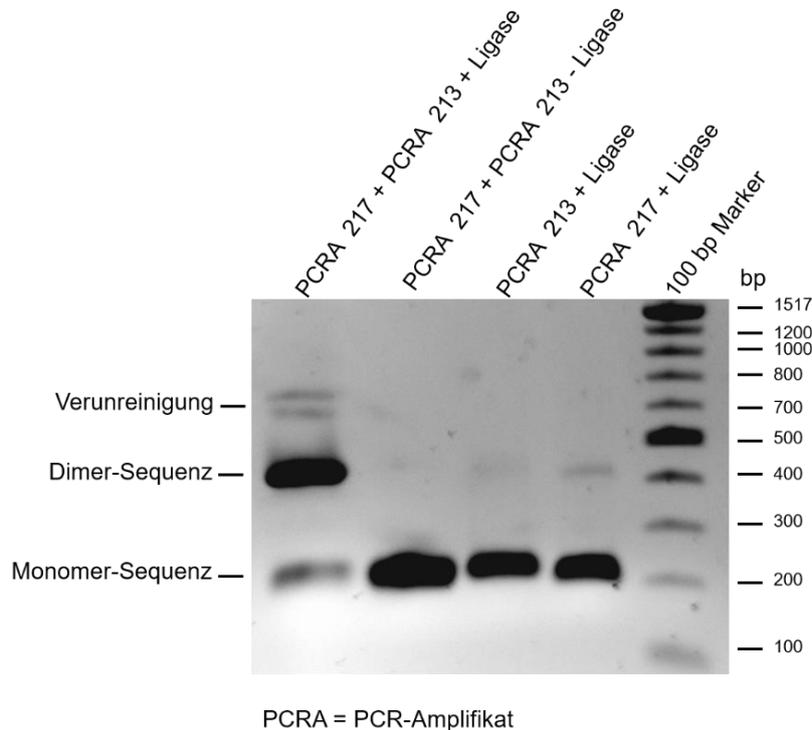


Abb. 39: Ligation des PCRA 213 und PCRA 217. Kontrollgel (1,2 % Agarosegel und EtBr-Färbung) der Ligation der PCRA 213 und PCRA 217. Die Positiv-Probe mit Ligase zeigte eine Dimer-DNA-Bande auf der Höhe von 400 bp. Die Negativ-Kontrolle ohne Ligase wies keine Dimer-DNA-Bande auf. Mittels Ligationskontrollen, die Ligase und nur PCRA 213 oder 217 enthielten, konnte eine Selbstligation der einzelnen PCR-Amplifikate ausgeschlossen werden. Die präparierten PCR-Amplifikate waren 204 bp (PCRA 213) und 201 bp (PCRA 217) lang.

Die Positiv-Kontrolle (Abb. 39) mit Ligase wies noch 200 bp große Monomer-Banden auf. Die unzureichende Ligation könnte auf einen unvollständigen DralIII-Verdau der Monomere zurückzuführen sein. In dieser Probe waren ebenfalls Verunreinigungen bei 600-700 bp zu erkennen. Diese Unreinheiten konnten jedoch durch die folgende Gelreinigung eliminiert werden.

3.11.2 Ergebnisse der Assemblierung von Mononukleosomen

Die Herstellung von Nukleosomen sollte mit äquimolaren Mengen an DNA und Oktameren erfolgen. Die Assemblierung der Mononukleosomen wurde bereits im Kapitel 2.12.7 ausführlich beschrieben. Um das optimale molare Verhältnis von DNA und Oktameren für die Assemblierung zu ermitteln, wurden zunächst verschiedene molare Verhältnisse von Oktameren und DNA (Monomer) titriert. Diese Titrationsversuche waren notwendig, da die Konzentrationsbestimmungen von DNA und Oktameren fehlerbehaftet sein können. Zu einer

einheitlichen Menge DNA (2,5 µg) wurden Oktamere in einem molaren Verhältnis (n DNA:n Oktamer) von 1:0,85/ 1:1,0 und 1:1,25 gemischt und assembliert. Anhand von Gelanalysen konnte das optimale Verhältnis für die Nukleosomen Herstellung ermittelt werden (siehe 2.12.8 und Abb. 40).

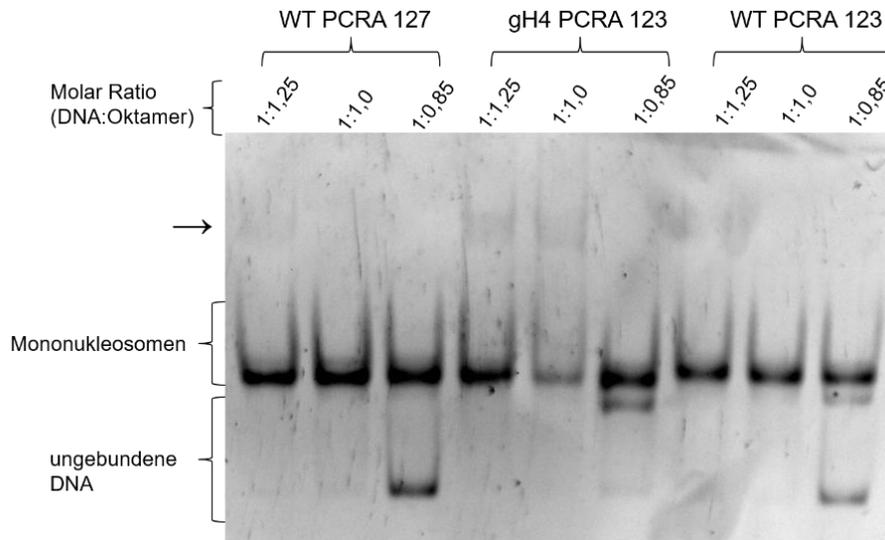


Abb. 40: Gelkontrolle der molaren DNA:Oktamer Ratios für die Mononukleosomen Herstellung. Jeweils 200 ng Mononukleosomen wurden auf einem Gel analysiert (5 % native PAGE) und mit EtBr gefärbt. Die Titrationsanalysen zeigten, dass bei einem molaren Verhältnis von 1:0,85 (DNA:Oktameren) ungebundene DNA vorlag. Die Menge an Oktameren war somit zu gering, um die DNA vollständig zu binden. Bei einer molaren Ratio von 1:1 hingegen lag keine freie DNA vor. Bei einem molaren Verhältnis von 1:1,25 hingegen konnte eine Bande oberhalb der Nukleosomen (→) erkannt werden. Dies sprach für eine zu hohe Menge an Oktameren. Anhand dieses Titrationsversuchs konnte die Ratio von 1:1 als optimal angesehen werden.

3.11.3 Ergebnisse und Qualitätskontrollen der Dinukleosomen Herstellung

Bei der Assemblierung der Dinukleosomen wurden ebenfalls Titrationsversuche durchgeführt (Abb. 41). Es wurden Dinukleosomen mit WT- und gH4-Oktameren hergestellt. Dabei wurden ebenfalls 2,5 µg DNA und Oktamere in einem molare Verhältnis (n DNA:n Oktamer) von 1:0,8; 1:1,0; 1:1,2; und 1:1,4 vereinigt.

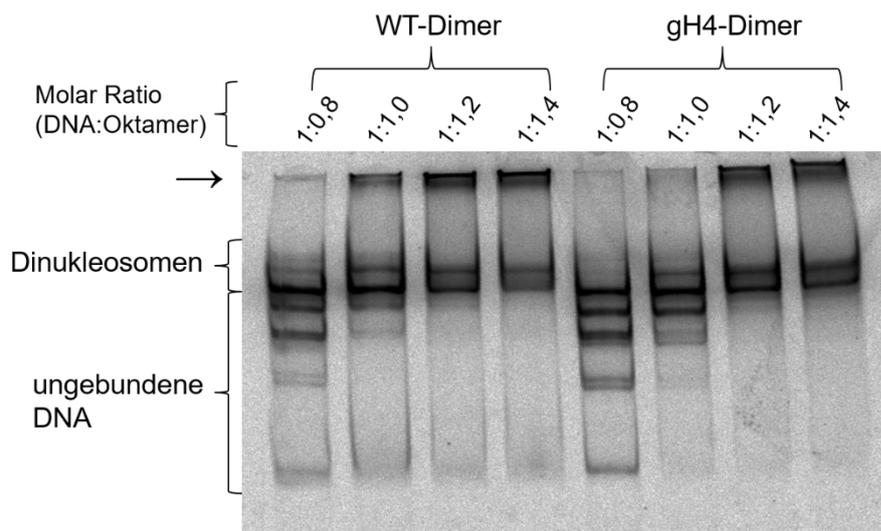


Abb. 41: Ergebnisse der Titrationsversuche mit Dinukleosomen: Jeweils 200 ng Dinukleosomen wurden mittels eines 5 % nativen Polyacrylamidgels analysiert und mit EtBr gefärbt. Bei einer Ratio von 1:0,8 war ungebundene DNA sichtbar. Eine Ratio von 1:1 hingegen wies eine gute Sättigung auf und beinhaltete keine freie DNA. Die anderen molaren Ratios wiesen zu hohe Mengen an Oktameren auf, da die Intensität der obersten Bande zunahm (→).

Die Dinukleosomen präsentierten sich durch eine Doppelbande, welche unabhängig vom Sättigungsgrad in allen Proben zu sehen war. Hiermit konnte ausgeschlossen werden, dass die Doppelbanden durch eine unzureichende Sättigung mit Oktameren hervorgerufen wurden. Da alle PCR-Amplifikate vor der Assemblierung gelgereinigt wurden, konnte eine Verunreinigung durch andere DNA-Banden oder Enzyme ausgeschlossen werden. Es könnte sich möglicherweise um ein Gelartefakt handeln, wobei eine Beeinflussung durch die Inhomogenität der Dimer-Sequenzen nicht ausgeschlossen werden konnte. Um die Qualität der Dinukleosomen genauer beurteilen zu können, waren weitere Kontrollen notwendig. Die Sättigung der Dimer-PCR-Amplifikate mit Oktameren konnte durch die Überprüfung der Zugänglichkeit der Linker-Region und der Nukleosomen positionierenden Sequenz analysiert werden [79, 81]. Die Nukleosomen positionierende Sequenzen beherbergten eine AluI Schnittstelle. Dadurch konnte die Zugänglichkeit der Nukleosomen positionierenden Sequenz mittels eines AluI Verdau überprüft werden [72] (Abb. 42).

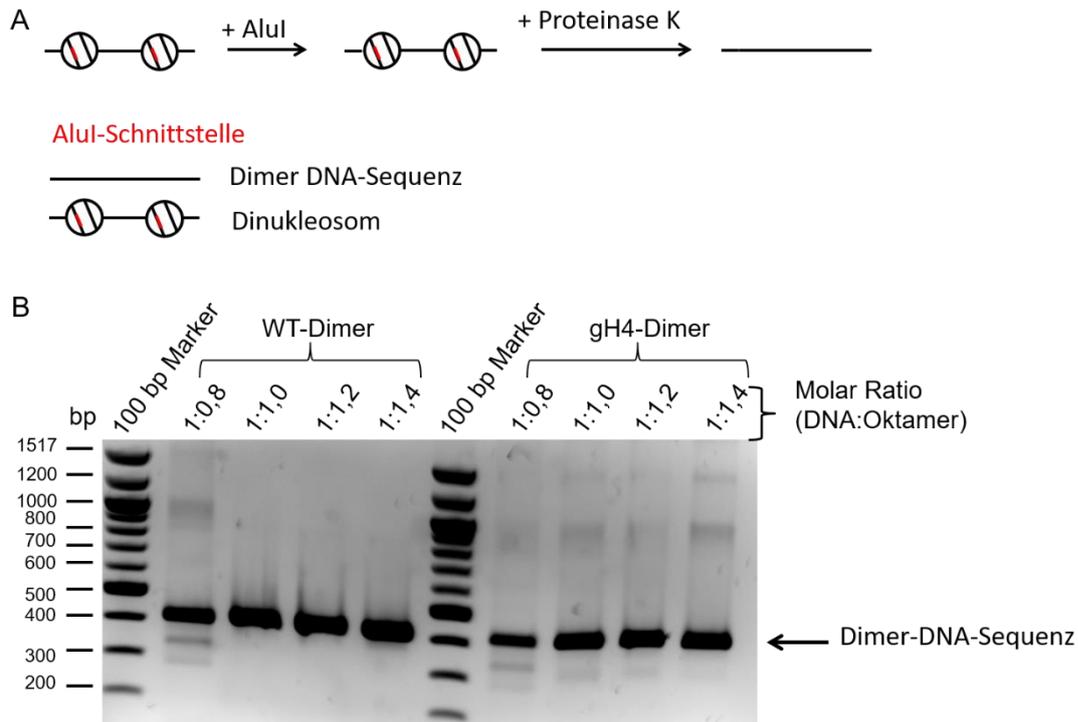


Abb. 42 Überprüfung der Nukleosomen positionierenden Sequenzen durch einen AluI Verdau [79, 81]. (A) Schematische Darstellung des AluI Verdau mit anschließender Proteinelimination. (B) Jeweils 200 ng DNA aus dem AluI Verdau wurden auf ein 1 % Agarosegel geladen und mit EtBr gefärbt. Nach Proteinelimination sollte bei exakter Stellung der Oktamere auf der Nukleosomen positionierenden Sequenz nur die Dimer-DNA-Sequenz, auf der Höhe von 400 bp zu sehen sein. Die Ratio 1:0,8 zeigte DNA-Banden zwischen 200-400 bp auf, somit war bei dieser Oktameremenge die Nukleosomen positionierende Sequenz noch zugänglich und nicht ausreichend mit Oktameren besetzt.

Die Zugänglichkeit der Linker-Region wurde mit einem DralIII Verdau getestet. Die Durchführung dieser Qualitätskontrollen wurde bereits in Kapitel 2.12.9 beschrieben. Bei einer richtigen Positionierung der Oktamere auf den Nukleosomen positionierenden Sequenzen, sollte die Linker-Region gut für das Restriktionsenzym DralIII zugänglich sein. (Abb. 43A).

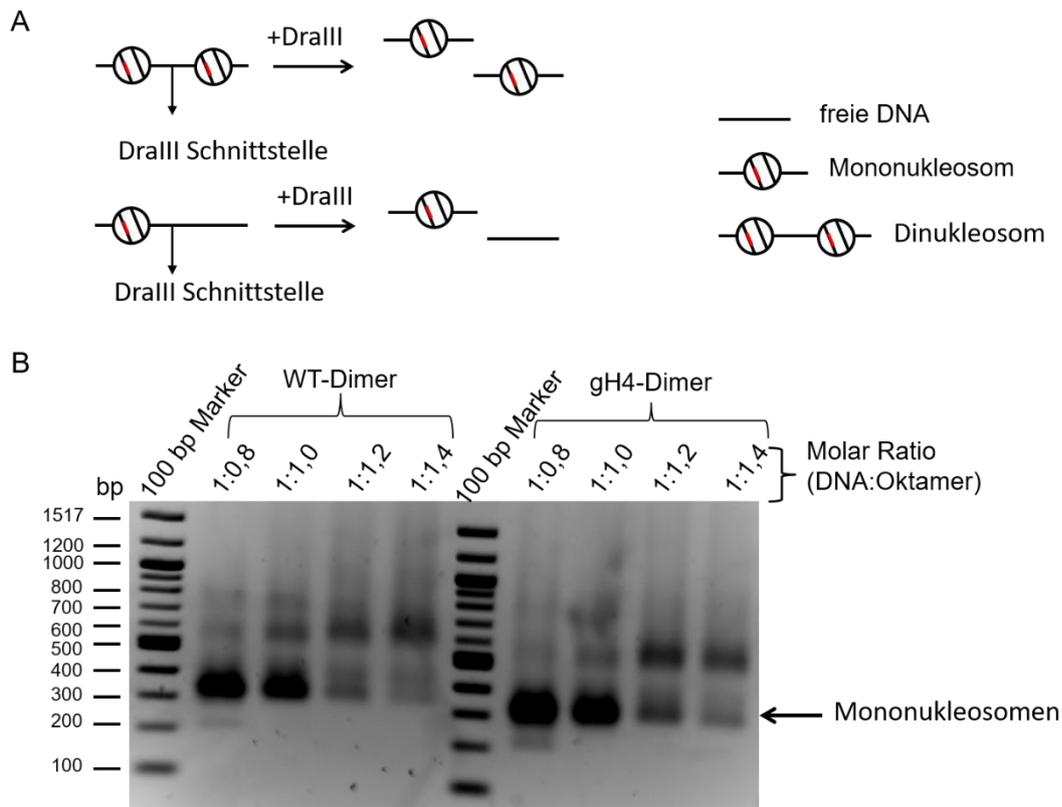


Abb. 43: Qualitätskontrollen der Dinukleosomen mittels DraIII Verdau. (A) Bildliche Darstellung des Prinzips des DraIII Verdau, zur Überprüfung der Zugänglichkeit der Linker-Region in Dinukleosomen. Bei unzureichender Sättigung der Dinukleosomen mit Oktameren, könnte nach einem DraIII Verdau freie DNA entstehen. (B) Jeweils 200 ng Dinukleosomen aus dem DraIII Verdau wurden mittels Agarosegel überprüft (1,1 %) und mit EtBr gefärbt. Ein DNA:Oktamer Verhältnis von 1:0,8 wies in der Gelkontrolle freie DNA auf der Höhe von 200 bp auf. Mit zunehmender Menge an Oktameren (1:1,2 und 1:1,4) *shiftete* die Mononukleosomen-Bande nach oben (500-600 bp), was auf eine Übersättigung mit Oktameren hindeutete.

Die Qualitätskontrollen zeigten, dass die Dinukleosomen bei einer Ratio von 1:0,8 unzureichend mit Oktameren gesättigt waren, da bei dieser molaren Ratio freie DNA vorhanden war. Eine höhere molare Ratio als 1:1 führte jedoch zu einer deutlichen Übersättigung, was an einer erhöhten Mobilität der Mononukleosomen zu erkennen war. Ein Verhältnis von 1:1 war zur Dinukleosomen Herstellung geeignet, da die Nukleosomen scheinbar ausreichend mit Oktameren gesättigt waren.

3.11.4 Übersicht der produzierten Mono- und Dinukleosomen

Es konnten homogene Dinukleosomen mit WT- oder gH4-Oktameren hergestellt werden. Zusätzlich wurden die jeweiligen Monomer-Sequenzen (PCRA 123 und PCRA 217) mit WT- und gH4-Oktameren assembliert (Abb. 44).

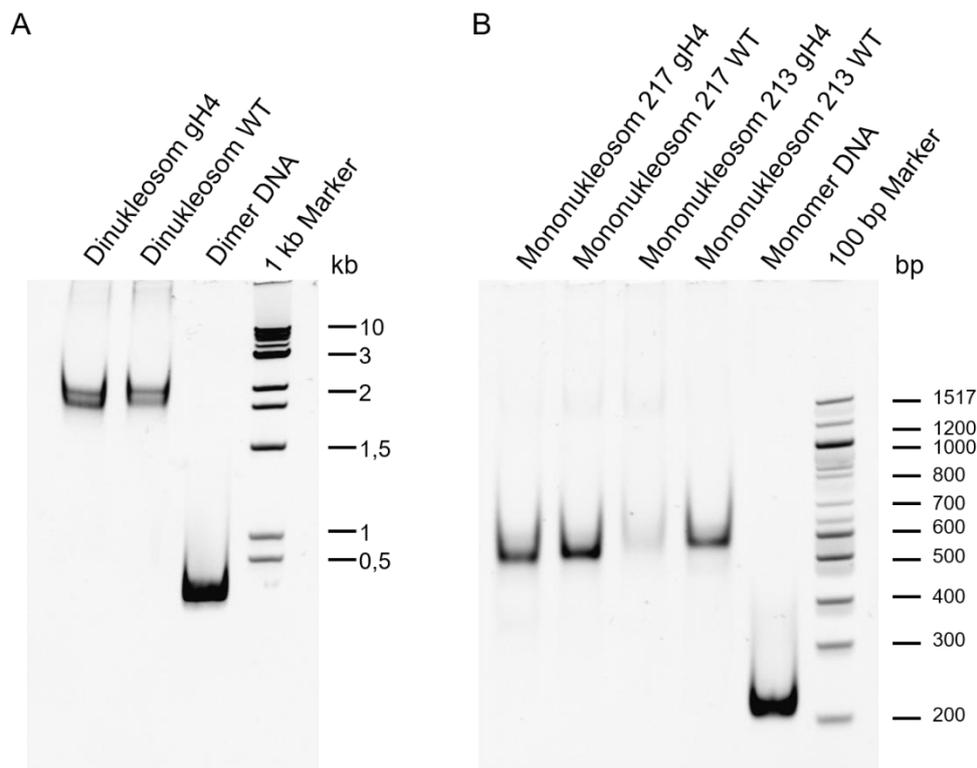


Abb. 44: Übersicht der hergestellten Mono- und Dinukleosomen-Varianten. Es wurden Nukleosomen mit Wildtyp- (WT) und globulären-Oktameren (gH4) hergestellt. Die DNA-Sequenzen der Mono- und Dinukleosomen leiteten sich von den Plasmiden pFMP 213 (213) oder pFMP 217 (217) ab (siehe 3.11.1). Jeweils 200 ng Nukleosomen oder DNA wurden auf ein 5 % nativ PAGE geladen und mit EtBr gefärbt. Die Dinukleosomen verliefen auf einer Höhe von circa 2 kb. Die Mononukleosomen befanden sich auf diesem Polyacrylamidgel bei circa 500-600 bp. Zur Kontrolle wurde eine Dimer- (400 bp) bzw. eine Monomer-DNA-Sequenz (200 bp) geladen. Die Doppelbanden der Dinukleosomen wurden bereits in Abschnitt 3.11.3 diskutiert.

3.11.5 Ligationsversuch zur Herstellung heterogener Dinukleosomen

Um ein heterogenes Dinukleosom, bestehend aus WT- und gH4-Oktameren herzustellen, war es notwendig zwei unterschiedliche Mononukleosomen miteinander zu ligieren [92]. In ersten Ligationsversuchen konnte festgestellt werden, dass eine hohe Konzentration an Ligase (2300 U/ 4 pmol Mononukleosomen) für die Ligation notwendig war (nicht gezeigt). Die Mobilität der ligierten Mononukleosomen in den Gelkontrollen war jedoch unerwartet hoch (≥ 2 kb). Es kam daher der Verdacht auf, dass die hohe Ligasekonzentration einen *gelshift* der Dinukleosomen erzeugt. In einem weiteren Test wurde die Ligation der Mononukleosomen mit unterschiedlichen Ligasekonzentrationen (250 U; 760 U; 2300 U) durchgeführt und anhand einer Gelkontrolle verglichen. Als Kontrollen dienten Proben mit bereits assemblierten, homogenen Dinukleosomen, welche ebenfalls unterschiedliche Konzentrationen an Ligase enthielten (siehe 2.12.10 und Abb. 45).

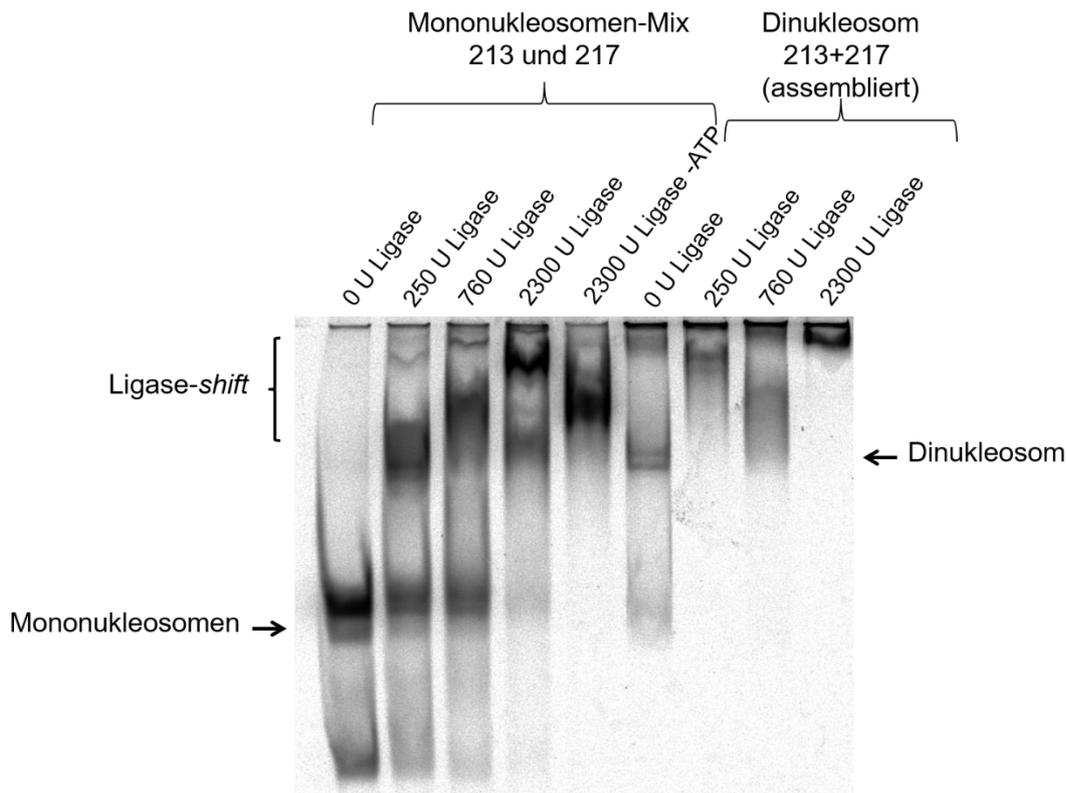


Abb. 45: Gelkontrolle des Ligationstest. Zur Gelkontrolle wurde ein 4,5 % nativ PAGE verwendet und anschließend mit EtBr gefärbt. Vier pmol Mononucleosomen wurden mit 250, 760 und 2300 U Ligase ligiert. Mit zunehmender Ligasekonzentration nahm die Intensität der Dinucleosomen-Bande zu, d.h. die Menge an ligierten Dinucleosomen nahm mit der Ligasemenge zu. Mit der steigenden Ligasekonzentration war jedoch ein zunehmender *shift* der Dinucleosomen im Gel zu erkennen. Dieser Ligase-*shift* war auch bei den bereits assemblierten Dinucleosomen zu erkennen, die mit Ligase versetzt wurden. Die Menge der Dinucleosomen auf dem Gel betrug jeweils 200 ng. Die Kontrolle ohne ATP zeigte ein vermindertes *shifting*.

Als zusätzliche Kontrolle wurde derselbe Versuch mit Dimer-DNA durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten dasselbe Ergebnis (nicht gezeigt). Es kann somit vermutet werden, dass eine Verbindung zwischen der DNA und der Ligase das *shifting* verursachte. Die Herstellung heterogener Dinucleosomen ist somit prinzipiell möglich. Es sollte jedoch eine Problemlösung gefunden werden, mit der das *shifting* der Ligase unterbunden bzw. eliminiert werden könnte. Aus zeitlichen Gründen konnte dies in dieser Arbeit nicht mehr verwirklicht werden.

4 Diskussion

Im folgenden Abschnitt sollen die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse kritisch erörtert und diskutiert werden. Des Weiteren möchte ich gerne einen Einblick in die medizinische Relevanz von Chromatin-*Remodeling* geben.

4.1 Kritische Betrachtung des 13- und 25-mer Array-Substrats

Die für diese Arbeit entworfenen 13- und 25-mer *Arrays* wurden entwickelt, um *Remodeling* zwischen internen und externen Nukleosomen einer Chromatinfaser zu unterscheiden. Der Hintergedanke war, ein *in vitro* Chromatin-Modellsubstrat zu schaffen, mit dem es möglich war, *Remodeling* zwischen kondensierten und dekondensierten Bereichen einer Chromatinfaser zu unterscheiden. Kondensierte und dekondensierte Chromatinbereiche existieren *in vivo* in Form von Heterochromatin und Euchromatin. Die Idee mittels internem und externem Nukleosom einer Chromatinfaser kondensierte von dekondensierten Bereichen einer Faser zu unterscheiden, setzt voraus, dass externe Nukleosomen der *Arrays* weniger kondensiert (weniger kompakt) und leichter zugänglich sind, als zentrale Nukleosomen (Abb. 46A). Erkenntnisse über den Chromatin Aufbau zeigten, dass eine solche Konfiguration der *Arrays* wahrscheinlich ist [12, 97]. In einer publizierten Studie wurde mittels Ultrazentrifugation und atomarer Kraftmikroskopi (AFM) die Nukleosomenstabilität von 12-mer Nukleosomen-*Arrays* (5S rDNA 208) untersucht [99]. Es konnte gezeigt werden, dass externe Positionen der *Arrays* (Nukleosom 1-3 und 9-12) einen höheren Verlust an Oktameren vorwies, als zentral gelegene Nukleosomen [99]. Diese Daten unterstützten die Annahme, dass interne Nukleosomen in *Arrays* (4-8) eine höhere Stabilität aufweisen [99].

Darüber hinaus spielt auch die Interaktion zwischen einzelnen Chromatinfasern eine wichtige Rolle. Durch die direkte Interaktion von Nukleosomen untereinander ist ein Arrangement bzw. eine Kontaktausbildung zwischen Chromatinfasern *in vitro* möglich.[18, 29, 89, 98, 100]. Dieser Prozess der Oligomerisation ist reversibel und wird durch physiologische Salzkonzentrationen und zunehmende Magnesiumkonzentrationen gefördert [18, 29, 37, 101]. Die Ergebnisse aus den *Remodeling*-Versuchen zeigten, dass interne und externe Nukleosomen mit annähernd gleicher Effizienz *remodelt* werden konnten. Dies konnte für 13-mer und 25-mer lange *Arrays* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob durch eine Interaktion der *Arrays* untereinander eine *Array-Array*-Konstellation entstehen könnte, welche die externe Nukleosomenpositionen schwer zugänglich macht und zentral einbindet (Abb. 46B). Dies könnte dazu führen, dass sich interne und externe

Nukleosomen in ihrer Zugänglichkeit nicht unterscheiden und daher mit derselben Präferenz *remodelt* werden konnten.

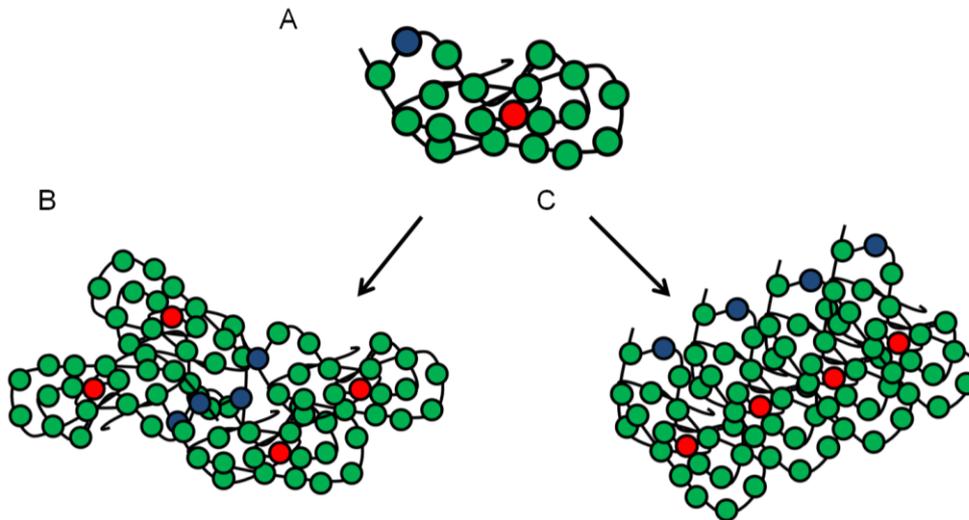


Abb. 46: Schematische Darstellung von Konfigurationsmöglichkeiten zwischen Arrays. (A) Schematische Visualisierung eines Nukleosomen-Arrays in 2D. Das externe Nukleosom (blau) befindet sich peripher, das interne Nukleosom (rot) ist in der Mitte des Arrays lokalisiert. (B) Die externe Nukleosomenposition nimmt durch die Interaktion zwischen den Arrays eine zentrale, schwer zugängliche Position ein. (C) Modellsubstrat, bei dem die externe Lage der peripheren Nukleosomen durch die Interaktion der Arrays nicht beeinträchtigt wird.

Unter Annahme einer Array-Anordnung nach dem Schema A und C der Abbildung 46, könnte erwartet werden, dass die leicht zugänglichen, externen Nukleosomen präferiert *remodelt* werden. Die Ergebnisse aus den *Remodeling*-Versuchen konnten dies jedoch nicht bestätigen. In diesen Fall könnten *Remodeling*-Enzyme eine Möglichkeit besitzen, kondensierte und decondensierte Bereiche einer Chromatinfaser mit gleicher Effizienz zu *remodeln*.

Eine Konstellation wie in Schema B würde ebenfalls keine Unterschiede in der *Remodeling*-Effizienz zwischen der internen und externen Nukleosomenposition hervorrufen, da interne und externe Nukleosomen schwer zugänglich wären. Eine solche Nukleosomen-Zugänglichkeit wäre nach dem *in vitro* Nukleosomen-Array-Modell der Maeshima-Arbeitsgruppe denkbar [30]. Unter Annahme, dass die 13-mer und 25-mer Arrays als 10 nm Nukleosomenketten (*beads on a string*) vorliegen und zu Oligomeren verschmelzen, könnten sowohl interne als auch externe Nukleosomen eine ähnliche Zugänglichkeit vorweisen.

Die exakte Stellung der internen und externen Nukleosomen in den 13-mer und 25-mer Nukleosomen-Arrays konnte in dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht werden. Die

Konstellation der *Arrays* und einzelnen Nucleosomen könnte jedoch mittels EM (Elektronenmikroskopie) und Kryo-EM näher erforscht werden [30, 32].

4.2 Ein hohes Maß an Chromatin-Eigendynamik scheint die Effizienz von *Remodeling*-Enzymen zu unterstützen

Es ist bekannt, dass Chromatin über eine gewisse Eigendynamik verfügt. Einige Publikationen haben gezeigt, dass Nucleosomen höchst dynamisch sind. Nucleosomen sind in der Lage spontane Konformationsänderungen zu unterlaufen, die als *site exposure* bezeichnet werden. In FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) Analysen konnte gezeigt werden, dass die Enden nucleosomaler DNA spontan, innerhalb von 50-250 ms die Nucleosomenoberfläche umwickeln und wieder verlassen können [102-104]. Dieser Mechanismus ermöglicht Proteinen die DNA-Bindung [96, 103, 105, 106].

Weitere publizierte Studien wiesen darauf hin, dass in kompakten nucleosomalen *Arrays* eine intrinsische Dynamik existiert und die nach außen Kompakt erscheinenden *Arrays* über eine hohe Zugänglichkeit verfügen [96, 106]. Dies konnte gezeigt werden, indem die Zugänglichkeit einer zentralen Position in 17-mer *Arrays* und eines Mononucleosoms verglichen wurde. Die dabei ermittelten Unterschiede variierten lediglich zwischen dreifach erniedrigten und achtfach erhöhten Werten [106].

Darüber hinaus vermitteln neueste Erkenntnisse über die Chromatinstruktur *in vitro* und *in vivo*, dass Nucleosomen-*Arrays* eine irreguläre Faltung aufweisen und dadurch einen höheren Grad an Flexibilität und DNA-Zugänglichkeit aufweisen, als bisher angenommen wurde [21, 30, 35, 36].

Solch eine intrinsische Dynamik und Flexibilität von Chromatin könnte *Remodeling*-Enzymen den Zugang zu kondensierten und kompakten Bereichen einer Chromatinfaser ermöglichen. Hiermit könnte erklärt werden, dass ISWI die interne und externe Nucleosomenposition mit ähnlicher Effizienz *remodeln* konnte. Ein solch hohes Maß an Chromatindynamik *in vivo* könnte wiederum daran beteiligt sein, dass Heterochromatin, repliziert, transkribiert und repariert werden kann [35, 46-50, 107].

4.3 Unklarer Einfluss der Magnesiumionenkonzentration auf die ATPase-Aktivität von ISWI und die *Array*-Konfiguration

Das *Remodeling*-Verhalten von ISWI wurde unter niedrigen und hohen Magnesiumkonzentrationen verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten (k_{obs}) unter niedrigen Magnesiumkonzentrationen circa um den Faktor zwei höher waren.

Dies konnte mit 13- und 25-mer *Arrays* bestätigt werden. Diese Resultate könnten durch die magnesiumabhängige Faltung der *Arrays* hervorgerufen werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Magnesiumionen die ATPase-Aktivität von ISWI inhibieren.

Mittels eines ATPase-Assays könnte die ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von der Magnesiumionenkonzentration bestimmt werden [72]. Labor interne Daten zeigten, dass unter hohen Magnesiumionenkonzentrationen die ATPase-Aktivität im Vergleich zu niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen circa um den Faktor zwei erniedrigt wird (durchgeführt von S. Völker und übermittelt über persönliche Kommunikation). Unter Annahme, dass dies wirklich zutrifft, wäre der Unterschied zwischen den Reaktionsgeschwindigkeiten nicht durch die *Array*-Konfiguration verursacht worden.

Wie schon erwähnt, wird die Faltung und Kompaktheit sowie die Präzipitationsrate von *Arrays* durch eine zunehmende Magnesiumionenkonzentration erhöht [18, 30, 96, 98]. Zudem wird durch Mg^{2+} die Nukleosomenstabilität erhöht [108]. In Abwesenheit von Mg^{2+} oder sehr niedrigen Magnesiumionenkonzentrationen liegen Nukleosomen-*Arrays* in einer nicht gefalteten Form vor (*beads on a string*) [18, 30, 96]. Mit den unterschiedlichen Magnesiumionenkonzentrationen sollten zwei unterschiedliche Faltungszustände der *Arrays* induziert werden. Die gewählten Magnesiumionenkonzentrationen wurden anhand von Präzipitationsversuchen ermittelt. Unter den niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen 0,3 mM (13-mer *Array*) und 0,2 mM (25-mer *Array*) wurden nur geringe Mengen an *Arrays* präzipitiert. Daher wurde angenommen, dass diese Mg^{2+} -Konzentrationen eine niedrigere Kompaktionsrate der *Arrays* erzeugen, als hohe Mg^{2+} -Konzentrationen. Es wurden keine Versuche ohne Magnesium durchgeführt, da Magnesium für die Funktion von ATPasen essentiell ist. Die Ergebnisse aus den *Remodeling*-Versuchen mit unterschiedlichen Magnesiumionenkonzentration zeigten jedoch annähernd gleiche Zugänglichkeiten und nur geringe Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten. Die Erkenntnisse über den möglichen Zusammenhang der ATPase-Aktivität und der Mg^{2+} -Konzentration unterstützen diese Beobachtung. Jedoch muss an dieser Stelle diskutiert werden, ob die geringen Konzentrationen an Magnesiumionen bereits höhere Faltungsraten verursachten, als aus den Präzipitationsversuchen angenommen wurde. Dies würde bedeuten, dass die *Arrays* unter niedrigen und hohen Magnesiumkonzentrationen ähnlich hohe Faltungsraten aufwiesen und daher auch mit gleicher Effizienz *remodelt* werden konnten.

Der genaue Zustand der *Arrays* unter diesen Bedingungen ist jedoch nicht bekannt (Abb. 47). In diesem Fall könnte ebenfalls eine Elektronenmikroskopie hilfreich sein. Unter Annahme, dass die *Arrays* mit 0,3 bzw. 0,2 mM Mg^{2+} zugänglicher sind als die *Arrays* unter den erhöhten Magnesiumkonzentrationen, wäre ISWI in der Lage unabhängig vom Chromatin-Faltungszustand Nukleosomen mit annähernd gleicher Effizienz zu *remodeln*.

Diese Hypothese würde wiederum ein Chromatin-Modell mit hoher Eigendynamik unterstützen.

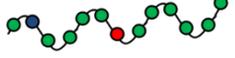
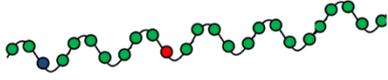
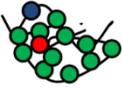
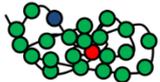
Mg ²⁺ (mM)	13 Nukleosomen-Arrays	Mg ²⁺ (mM)	25 Nukleosomen-Arrays
0	0% präzipitiert 	0	0% präzipitiert 
0,3	3,5% präzipitiert Faltungszustand?	0,2	16% präzipitiert Faltungszustand?
2,5	88% präzipitiert 	1,7	95% präzipitiert 

Abb. 47: Übersicht der Versuchsergebnisse im Zusammenhang mit der magnesium-abhängigen Faltung der Arrays. Das Präzipitationsverhalten der 13-mer und 25-mer Nukleosomen-Arrays ist in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration, schematisch dargestellt. Die molekulare Struktur der Arrays unter 0,3 bzw. 0,2 mM Mg²⁺ ist nicht bekannt. Der Anteil an präzipitierten Arrays ist unter niedrigen Magnesiumkonzentrationen geringer als unter hohen Magnesiumkonzentrationen.

4.4 Problemlösung des Dinukleosomen-Modellsubstrats

Die Ligation von Mononukleosomen zur Generierung von Dinukleosomen führte zu einem sichtbaren *shift* der Dinukleosomen in der Gelelektrophorese. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass zunehmende Mengen an Ligase diesen *shift* verursachten. Aufgrund dieser Ligationsversuche wurde angenommen, dass die Ligase eine Verbindung mit der DNA der Dinukleosomen einging und dadurch das *shifting* verursachte (siehe 3.11.5). Der Hersteller der Ligase (NEB) empfiehlt bei einem durch die Ligase verursachten *shifting* den Ligationsansatz mit 6x Probenpuffer und SDS zu versetzen und auf 65 °C zu erhitzen. Dies war jedoch nicht möglich, da Nukleosomen durch hohe Temperaturen und SDS denaturiert werden. Es muss daher eine andere Lösung gefunden werden, wie die Ligase von der DNA gelöst und eliminiert werden könnte.

Es könnte beispielsweise versucht werden die Ligase durch Zugabe von Salzen auszulösen. Dabei müsste jedoch mit Salzkonzentrationen gearbeitet werden, welche die Nukleosomenstruktur nicht zerstören oder beeinträchtigen. Eine weitere Möglichkeit wäre dem Ligationsansatz große Mengen *Competitor*-DNA beizufügen, welche die Ligase bindet

bzw. abpuffert. Nachdem die DNA von der Ligase gelöst bzw. getrennt wurde, müsste die Ligase noch von der DNA eliminiert werden. Mittels Ultrazentrifugation können Proteine nach ihrer Dichte, Masse und Form voneinander getrennt werden. Auf diese Art und Weise könnte versucht werden, die Ligase von den Dinukleosomen zu trennen. Auch mittels Gelfiltration werden Proteine nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht voneinander getrennt. Diese Methode könnte ebenfalls genutzt werden, um die Ligase zu eliminieren. Zusätzlich bestünde die Option, eine Ligase zu verwenden, welche einen Tag besitzt. Über einen solchen Tag könnten die Nukleosomen mittels Affinitätschromatographie von der Ligase gereinigt werden. Diese Methode wurde anhand der ISWI Reinigung ausführlich beschrieben (siehe 2.7.5). Bei all diesen Lösungsansätzen müsste jedoch beachtet werden, dass die Qualität der heterogenen Dinukleosomen beeinträchtigt werden könnte. Nach erfolgter Ligase-Entfernung müssten daher erneut Qualitätskontrollen wie in Abschnitt 2.12.9 beschrieben durchgeführt werden.

4.5 Zusammenhang zwischen Chromatin-Remodeling-Komplexen und Krebsentstehung

Chromatin-Remodeling-Komplexe nehmen eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung ein [109]. In Bestandteilen von Chromatin-Remodeling-Komplexen konnten viele Genmutationen entdeckt werden, welche in einem erhöhten Maß in menschlichen Tumoren vorkommen. Besonders häufig scheinen hierbei humane SWI/SNF-Komplexe betroffen zu sein [60, 110].

Tab. 10: Mutationshäufigkeiten von Remodeling-Komplexen in Tumoren (modifiziert nach Narlikar et al., Cell, 2013) [60].

<i>Tumor</i>	<i>Frequency Mutation Observed</i>	<i>Genes Mutated</i>
<i>Renal clear cell carcinoma</i>	41 %	<i>PBRM subunit of human SWI/SNF BAF complex</i>
<i>Pancreatic cancer</i>	10 %	<i>Predominantly BRG1 and ARID1A subunits of human SWI/SNF complexes</i>
<i>Colorectal cancer</i>	55 %	<i>Many subunits of human SWI/SNF complexes</i>
<i>Malignant Rhabdoid tumors</i>	100 %	<i>BAF47 (hSNF5)</i>
<i>Lung cancer</i>	35 %	<i>All subunits of human SWI/SNF complexes mutated</i>
<i>Breast cancer</i>	11 %	<i>Many subunits of human SWI/SNF complexes mutated</i>
<i>Prostate cancer</i>	20 %	<i>Chd1</i>

Eine besondere Bedeutung kommt hierbei Untereinheiten von Remodelern der SWI/SNF Familie in Säugern zugute. Diese als BAF bezeichneten Untergruppen fungieren in vielen

Tumorarten als Tumorsuppressoren. Sequenzierungsstudien konnten zeigen, dass diese Faktoren zu 19,6 % in allen humanen Tumoren mutiert sind [60]. Somit zeigen diese Komplexe ähnliche Mutationsraten wie das bedeutende Tumorsuppressorgen p53 [60, 111]. Diese Erkenntnisse zeigten, wie wichtig die Erforschung der Chromatin-*Remodeling*-Komplexe in der Krebsforschung ist. Daher ist es notwendig, die damit verbundenen Mechanismen in der Grundlagenforschung zu definieren. Schließlich könnte dieses Grundlagenwissen ein wichtiger Ansatzpunkt in der Therapie von Tumorerkrankungen darstellen.

4.6 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Chromatinfaltung auf die *Remodeling*-Aktivität von ISWI zu untersuchen. Dabei wurde versucht *Remodeling* zwischen kompakten und leichter zugänglichen Bereichen einer Chromatinfaser zu unterscheiden. Die aus den *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* gewonnenen Daten zeigen, dass ISWI in der Lage ist, interne und externe Nukleosomen einer kompakten Chromatinfaser mit annähernd gleicher Effizienz zu *remodeln*.

Die 13-mer und 25-mer Nukleosomen-*Arrays* haben durchaus Potential weiterentwickelt zu werden. Beispielsweise könnte durch die Herstellung von Chromatosomen-*Arrays* die Faltung und die Kompaktheit der 13- und 25-mer *Arrays* gesteigert werden [79, 112]. Chromatosomen-*Arrays* enthalten zusätzlich zu den *Core*-Histonen das Linker-Histon H1. Der Einbau von Linker-Histonen übt einen kondensierenden und stabilisierenden Effekt auf die Nukleosomen-*Arrays* aus [17, 79, 112]. Hierdurch könnte ein *in vitro* Substrat geschaffen werden, welches noch näher am kondensierten *in vivo* Heterochromatin liegt. Eine effiziente Faltung durch die Linker-Histone setzt eine genügende Länge der Linker-DNA voraus. Eine Studie konnte zeigen, dass bei einer *repeat* Länge von 197 bp eine 30 nm Chromatinfaser gebildet wird. Geringere Längen der Linkerlänge hingegen führen bei einer Inkorporation von Linker-Histonen zu einer dünneren Chromatinfaser (circa 20 nm) [33]. Die repetitiven Einheiten der 13-mer und 25-mer Sequenzen besitzen beide eine Länge von 197 bp. Somit wäre ein Einbau von Linker-Histonen zur Generierung einer höher kompakten Chromatinfaser mit diesen Sequenzen möglich [79, 81].

Es ist bekannt, dass der *Remodeling*-Komplex ACF und dessen ATPase ISWI die Zugänglichkeit von Chromatosomen-*Arrays* erhöhen [79, 81]. Zusätzlich könnten somit alle *Remodeling*-Versuche mit dem *Remodeling*-Komplex ACF durchgeführt werden. Es wäre interessant zu sehen, ob die *Remodeling*-Aktivität von ACF durch die Chromatinfaltung eines Nukleosomen-*Arrays* oder eines Chromatosomen-*Arrays* beeinflusst würde. Darüber hinaus

konnte bestätigt werden, dass der *Remodeling*-Komplex CHD1 die Zugänglichkeit von 25-mer *Arrays* (pFMP 233) erhöhen kann [80].

Die oben genannten Ergebnisse werfen zudem die Frage auf, wie benachbarte Nukleosomen durch *ISWI-Remodeling* beeinflusst werden. Mit dem 13-mer und 25-mer Nukleosomensubstrat wurde untersucht, wie ISWI die Barriere einer Chromatinfaser überwinden kann. Doch welche Rolle spielen dabei benachbarte Nukleosomen? Diese Fragestellung könnte anhand des heterogenen Dinukleosomensubstrats näher untersucht werden. Da Nukleosomen mit intaktem *H4-Tail* präferiert *remodelt* werden, könnte der Einfluss des *remodelten* WT-Nukleosoms auf das Nukleosom mit gH4 analysiert werden (siehe 3.11). Die in diesem Abschnitt aufgeführten Ansätze bieten die Möglichkeit, *Remodeling* einer kompakten Chromatinfaser durch ISWI und andere *Remodeling*-Faktoren noch näher zu erforschen.

5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACF	<i>ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor</i>
ADP	Adenosine-5'-diphosphat
ATP	Adenosine-5'-triphosphat
BME	β-mercaptoethanol
bp	basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CHD	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding</i>
<i>D.melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
EtBr	Ethidiumbromid
FL	<i>full length</i>
FMP	Felix Müller-Planitz
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
fw	<i>forward</i>
gH	globuläres Histon
h	<i>hour</i> /Stunde
H	Histon
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ISWI	<i>Imitation Switch</i>
kb	kilobasenpaar
<i>k_{obs}</i>	Reaktionsgeschwindigkeit
l	Liter
LB	<i>Luria-Bertani</i>
M	molar
m	milli

min	Minute/n
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NPS	Nukleosomen positionierende Sequenz
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei λ=600
oFMP	Oligonukleotid Felix Müller-Planitz
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCRA	PCR-Amplifikat
PEP	Phosphoenolpyruvat
pFMP	Plasmid Felix Müller-Planitz
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	<i>pounds per square inch</i>
RE	Restriktionsenzym
RES	<i>Restriction-Enzyme-Site</i>
REAA	<i>Restriction-Enzyme Accessibility-Assay</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i>
s	Sekunde/n
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SANT	<i>SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIIB B</i>
SLIDE	<i>SANT-like ISWI domain</i>
SWI/SNF	Switching defective/Sucrose nonfermenting
t	<i>Time/Zeit</i>
Tab.	Tabelle
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v	<i>volume</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w	<i>weight</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
<i>X.laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>

6 Literaturverzeichnis

1. Olins, A.L. and D.E. Olins, *Spheroid chromatin units (v bodies)*. Science, 1974. **183**(4122): p. 330-2.
2. Kornberg, R.D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science, 1974. **184**(4139): p. 868-71.
3. Arents, G., et al., *The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 10148-52.
4. Lusser, A. and J.T. Kadonaga, *Strategies for the reconstitution of chromatin*. Nat Methods, 2004. **1**(1): p. 19-26.
5. Davey, C.A., et al., *Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution*. J Mol Biol, 2002. **319**(5): p. 1097-113.
6. Luger, K., *Structure and dynamic behavior of nucleosomes*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(2): p. 127-35.
7. Lantermann, A.B., et al., *Schizosaccharomyces pombe genome-wide nucleosome mapping reveals positioning mechanisms distinct from those of Saccharomyces cerevisiae*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(2): p. 251-7.
8. Spadafora, C., et al., *The DNA repeat lengths in chromatin from sea urchin sperm and gastrule cells are markedly different*. FEBS Lett, 1976. **69**(1): p. 281-5.
9. Woodcock, C.L., A.I. Skoultchi, and Y. Fan, *Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length*. Chromosome Res, 2006. **14**(1): p. 17-25.
10. Noll, M. and R.D. Kornberg, *Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1*. J Mol Biol, 1977. **109**(3): p. 393-404.
11. Ris, H. and D.F. Kubai, *Chromosome structure*. Annu Rev Genet, 1970. **4**: p. 263-94.
12. Robinson, P.J., et al., *EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(17): p. 6506-11.
13. Allan, J., et al., *The structure of histone H1 and its location in chromatin*. Nature, 1980. **288**(5792): p. 675-9.
14. Davies, H.G. and J.V. Small, *Structural units in chromatin and their orientation on membranes*. Nature, 1968. **217**(5134): p. 1122-5.
15. Luger, K., M.L. Dechassa, and D.J. Tremethick, *New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(7): p. 436-47.
16. Hizume, K., S.H. Yoshimura, and K. Takeyasu, *Linker histone H1 per se can induce three-dimensional folding of chromatin fiber*. Biochemistry, 2005. **44**(39): p. 12978-89.

17. Thoma, F., T. Koller, and A. Klug, *Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin*. J Cell Biol, 1979. **83**(2 Pt 1): p. 403-27.
18. Hansen, J.C., *Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2002. **31**: p. 361-92.
19. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
20. Olins, D.E. and A.L. Olins, *Chromatin history: our view from the bridge*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(10): p. 809-14.
21. Maeshima, K., S. Hihara, and H. Takata, *New insight into the mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fibers without 30-nm chromatin structure*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2010. **75**: p. 439-44.
22. Greulich, K.O., et al., *Transition of chromatin from the "10 nm" lower order structure, to the "30 nm" higher order structure as followed by small angle X-ray scattering*. J Mol Biol, 1987. **193**(4): p. 709-21.
23. Finch, J.T. and A. Klug, *Solenoidal model for superstructure in chromatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(6): p. 1897-901.
24. Schlick, T., J. Hayes, and S. Grigoryev, *Toward convergence of experimental studies and theoretical modeling of the chromatin fiber*. J Biol Chem, 2012. **287**(8): p. 5183-91.
25. Grigoryev, S.A. and C.L. Woodcock, *Chromatin organization - the 30 nm fiber*. Exp Cell Res, 2012. **318**(12): p. 1448-55.
26. Kruithof, M., et al., *Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30-nm chromatin fiber*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(5): p. 534-40.
27. Dorigo, B., et al., *Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber*. Science, 2004. **306**(5701): p. 1571-3.
28. Woodcock, C.L., L.L. Frado, and J.B. Rattner, *The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement*. J Cell Biol, 1984. **99**(1 Pt 1): p. 42-52.
29. Maeshima, K., et al., *Chromatin as dynamic 10-nm fibers*. Chromosoma, 2014. **123**(3): p. 225-37.
30. Maeshima, K., et al., *Nucleosomal arrays self-assemble into supramolecular globular structures lacking 30-nm fibers*. EMBO J, 2016. **35**(10): p. 1115-32.
31. Grigoryev, S.A., et al., *Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13317-22.
32. Grigoryev, S.A., et al., *Hierarchical looping of zigzag nucleosome chains in metaphase chromosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(5): p. 1238-43.

33. Routh, A., S. Sandin, and D. Rhodes, *Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 8872-7.
34. Joti, Y., et al., *Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber*. Nucleus, 2012. **3**(5): p. 404-10.
35. Nishino, Y., et al., *Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure*. EMBO J, 2012. **31**(7): p. 1644-53.
36. Eltsov, M., et al., *Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19732-7.
37. Hansen, J.C., *Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre?* EMBO J, 2012. **31**(7): p. 1621-3.
38. Langmore, J.P. and C. Schutt, *The higher order structure of chicken erythrocyte chromosomes in vivo*. Nature, 1980. **288**(5791): p. 620-2.
39. Woodcock, C.L., *Chromatin fibers observed in situ in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length*. J Cell Biol, 1994. **125**(1): p. 11-9.
40. Scheffer, M.P., M. Eltsov, and A.S. Frangakis, *Evidence for short-range helical order in the 30-nm chromatin fibers of erythrocyte nuclei*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(41): p. 16992-7.
41. Scheffer, M.P., et al., *Nucleosomes stacked with aligned dyad axes are found in native compact chromatin in vitro*. J Struct Biol, 2012. **178**(2): p. 207-14.
42. Kan, P.Y., T.L. Caterino, and J.J. Hayes, *The H4 tail domain participates in intra- and internucleosome interactions with protein and DNA during folding and oligomerization of nucleosome arrays*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(2): p. 538-46.
43. Bi, X., *Functions of chromatin remodeling factors in heterochromatin formation and maintenance*. Sci China Life Sci, 2012. **55**(1): p. 89-96.
44. Gilbert, N., et al., *Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers*. Cell, 2004. **118**(5): p. 555-66.
45. Clapier, C.R. and B.R. Cairns, *The biology of chromatin remodeling complexes*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 273-304.
46. Grewal, S.I. and S.C. Elgin, *Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(2): p. 178-87.
47. Buhler, M. and D. Moazed, *Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(11): p. 1041-8.
48. Fousteri, M., et al., *Repair of DNA lesions in chromosomal DNA impact of chromatin structure and Cockayne syndrome proteins*. DNA Repair (Amst), 2005. **4**(8): p. 919-25.
49. Topp, C.N. and R.K. Dawe, *Reinterpreting pericentromeric heterochromatin*. Curr Opin Plant Biol, 2006. **9**(6): p. 647-53.

50. Brutlag, D.L., *Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA*. Annu Rev Genet, 1980. **14**: p. 121-44.
51. Bonisch, C., et al., *Chromatin proteomics and epigenetic regulatory circuits*. Expert Rev Proteomics, 2008. **5**(1): p. 105-19.
52. Langst, G., et al., *Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer*. Cell, 1999. **97**(7): p. 843-52.
53. Becker, P.B. and W. Horz, *ATP-dependent nucleosome remodeling*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 247-73.
54. Mueller-Planitz, F., H. Klinker, and P.B. Becker, *Nucleosome sliding mechanisms: new twists in a looped history*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(9): p. 1026-32.
55. Lusser, A. and J.T. Kadonaga, *Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines*. Bioessays, 2003. **25**(12): p. 1192-200.
56. Eberharter, A. and P.B. Becker, *ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 17): p. 3707-11.
57. Tang, L., E. Nogales, and C. Ciferri, *Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription*. Prog Biophys Mol Biol, 2010. **102**(2-3): p. 122-8.
58. Dechassa, M.L., et al., *SWI/SNF has intrinsic nucleosome disassembly activity that is dependent on adjacent nucleosomes*. Mol Cell, 2010. **38**(4): p. 590-602.
59. Liu, N. and J.J. Hayes, *When push comes to shove: SWI/SNF uses a nucleosome to get rid of a nucleosome*. Mol Cell, 2010. **38**(4): p. 484-6.
60. Narlikar, G.J., R. Sundaramoorthy, and T. Owen-Hughes, *Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes*. Cell, 2013. **154**(3): p. 490-503.
61. Engeholm, M., et al., *Nucleosomes can invade DNA territories occupied by their neighbors*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(2): p. 151-8.
62. Zhou, C.Y., et al., *Mechanisms of ATP-Dependent Chromatin Remodeling Motors*. Annu Rev Biophys, 2016. **45**: p. 153-81.
63. Clapier, C.R. and B.R. Cairns, *Regulation of ISWI involves inhibitory modules antagonized by nucleosomal epitopes*. Nature, 2012. **492**(7428): p. 280-4.
64. Toto, M., G. D'Angelo, and D.F. Corona, *Regulation of ISWI chromatin remodelling activity*. Chromosoma, 2014. **123**(1-2): p. 91-102.
65. Saha, A., J. Wittmeyer, and B.R. Cairns, *Chromatin remodeling through directional DNA translocation from an internal nucleosomal site*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(9): p. 747-55.
66. Zofall, M., et al., *Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(4): p. 339-46.
67. Dang, W., M.N. Kagalwala, and B. Bartholomew, *Regulation of ISW2 by concerted action of histone H4 tail and extranucleosomal DNA*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(20): p. 7388-96.

68. Dang, W. and B. Bartholomew, *Domain architecture of the catalytic subunit in the ISW2-nucleosome complex*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(23): p. 8306-17.
69. Yamada, K., et al., *Structure and mechanism of the chromatin remodelling factor ISW1a*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 448-53.
70. Hota, S.K., et al., *Nucleosome mobilization by ISW2 requires the concerted action of the ATPase and SLIDE domains*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(2): p. 222-9.
71. Bartholomew, B., *ISWI chromatin remodeling: one primary actor or a coordinated effort?* Curr Opin Struct Biol, 2014. **24**: p. 150-5.
72. Mueller-Planitz, F., et al., *The ATPase domain of ISWI is an autonomous nucleosome remodeling machine*. Nat Struct Mol Biol, 2012.
73. Clapier, C.R., et al., *Critical role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 875-83.
74. Clapier, C.R., K.P. Nightingale, and P.B. Becker, *A critical epitope for substrate recognition by the nucleosome remodeling ATPase ISWI*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(3): p. 649-55.
75. Ebralidse, K.K., S.A. Grachev, and A.D. Mirzabekov, *A highly basic histone H4 domain bound to the sharply bent region of nucleosomal DNA*. Nature, 1988. **331**(6154): p. 365-7.
76. Forne, I., et al., *Probing the conformation of the ISWI ATPase domain with genetically encoded photoreactive crosslinkers and mass spectrometry*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(4): p. M111 012088.
77. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Agarose gel electrophoresis*. CSH Protoc, 2006. **2006**(1).
78. Lowary, P.T. and J. Widom, *New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning*. J Mol Biol, 1998. **276**(1): p. 19-42.
79. Klinker, H., et al., *ISWI remodelling of physiological chromatin fibres acetylated at lysine 16 of histone H4*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88411.
80. Lieleg, C., et al., *Nucleosome spacing generated by ISWI and CHD1 remodelers is constant regardless of nucleosome density*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(9): p. 1588-605.
81. Maier, V.K., et al., *ACF catalyses chromatosome movements in chromatin fibres*. EMBO J, 2008. **27**(6): p. 817-26.
82. Sambrook, J. and D.W. Russell, *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*. CSH Protoc, 2006. **2006**(4).
83. Klinker, H., et al., *Rapid purification of recombinant histones*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104029.
84. Artimo, P., et al., *ExpASy: SIB bioinformatics resource portal*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Web Server issue): p. W597-603.
85. Luger, K., et al., *Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria*. J Mol Biol, 1997. **272**(3): p. 301-11.

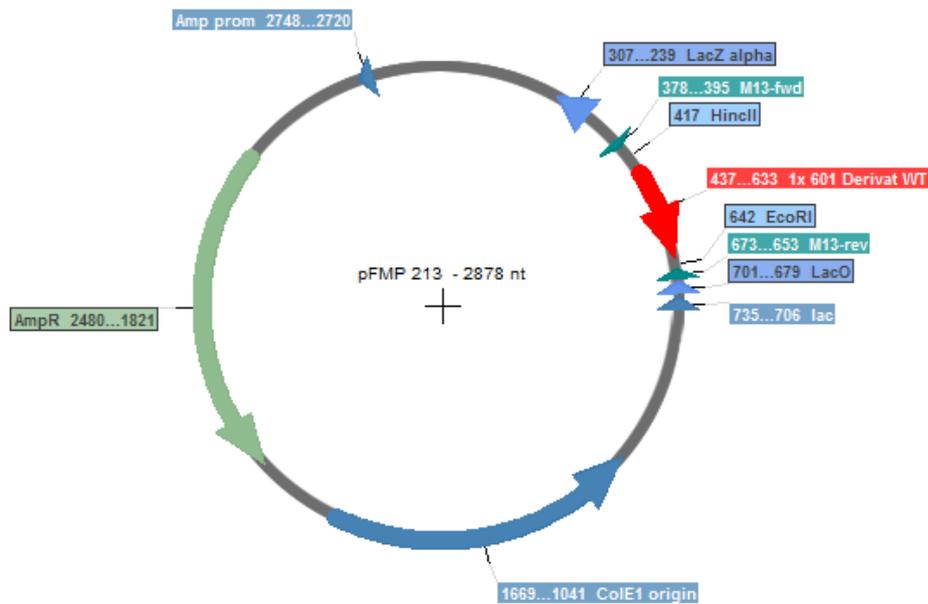
86. Huynh, V.A., P.J. Robinson, and D. Rhodes, *A method for the in vitro reconstitution of a defined "30 nm" chromatin fibre containing stoichiometric amounts of the linker histone*. J Mol Biol, 2005. **345**(5): p. 957-68.
87. Dyer, P.N., et al., *Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA*. Methods Enzymol, 2004. **375**: p. 23-44.
88. Lee, K.M. and G. Narlikar, *Assembly of nucleosomal templates by salt dialysis*. Curr Protoc Mol Biol, 2001. **Chapter 21**: p. Unit 21 6.
89. Schwarz, P.M., et al., *Reversible oligonucleosome self-association: dependence on divalent cations and core histone tail domains*. Biochemistry, 1996. **35**(13): p. 4009-15.
90. Schwarz, P.M. and J.C. Hansen, *Formation and stability of higher order chromatin structures. Contributions of the histone octamer*. J Biol Chem, 1994. **269**(23): p. 16284-9.
91. Schram, R.D., et al., *Computational study of remodeling in a nucleosomal array*. Eur Phys J E Soft Matter, 2015. **38**(8): p. 85.
92. McGinty, R.K., et al., *Chemically ubiquitylated histone H2B stimulates hDot1L-mediated intranucleosomal methylation*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 812-6.
93. Racki, L.R., et al., *The chromatin remodeller ACF acts as a dimeric motor to space nucleosomes*. Nature, 2009. **462**(7276): p. 1016-21.
94. Ludwigsen, J., H. Klinker, and F. Mueller-Planitz, *No need for a power stroke in ISWI-mediated nucleosome sliding*. EMBO Rep, 2013. **14**(12): p. 1092-7.
95. Logie, C. and C.L. Peterson, *Catalytic activity of the yeast SWI/SNF complex on reconstituted nucleosome arrays*. EMBO J, 1997. **16**(22): p. 6772-82.
96. Poirier, M.G., et al., *Dynamics and function of compact nucleosome arrays*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(9): p. 938-44.
97. Dorigo, B., et al., *Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail*. J Mol Biol, 2003. **327**(1): p. 85-96.
98. Blacketer, M.J., S.J. Feely, and M.A. Shogren-Knaak, *Nucleosome interactions and stability in an ordered nucleosome array model system*. J Biol Chem, 2010. **285**(45): p. 34597-607.
99. Hagerman, T.A., et al., *Chromatin stability at low concentration depends on histone octamer saturation levels*. Biophys J, 2009. **96**(5): p. 1944-51.
100. van Holde, K. and J. Zlatanova, *Chromatin fiber structure: Where is the problem now?* Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(5): p. 651-8.
101. Zheng, C., et al., *Salt-dependent intra- and internucleosomal interactions of the H3 tail domain in a model oligonucleosomal array*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33552-7.
102. Li, G., et al., *Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(1): p. 46-53.

103. Li, G. and J. Widom, *Nucleosomes facilitate their own invasion*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(8): p. 763-9.
104. Luger, K. and J.C. Hansen, *Nucleosome and chromatin fiber dynamics*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(2): p. 188-96.
105. Polach, K.J. and J. Widom, *Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation*. J Mol Biol, 1995. **254**(2): p. 130-49.
106. Poirier, M.G., et al., *Spontaneous access to DNA target sites in folded chromatin fibers*. J Mol Biol, 2008. **379**(4): p. 772-86.
107. Lemaitre, C. and E. Soutoglou, *Double strand break (DSB) repair in heterochromatin and heterochromatin proteins in DSB repair*. DNA Repair (Amst), 2014.
108. Yang, Z. and J.J. Hayes, *The divalent cations Ca²⁺ and Mg²⁺ play specific roles in stabilizing histone-DNA interactions within nucleosomes that are partially redundant with the core histone tail domains*. Biochemistry, 2011. **50**(46): p. 9973-81.
109. Dawson, M.A. and T. Kouzarides, *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy*. Cell, 2012. **150**(1): p. 12-27.
110. Garraway, L.A. and E.S. Lander, *Lessons from the cancer genome*. Cell, 2013. **153**(1): p. 17-37.
111. Kadoch, C., et al., *Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy*. Nat Genet, 2013. **45**(6): p. 592-601.
112. McBryant, S.J., X. Lu, and J.C. Hansen, *Multifunctionality of the linker histones: an emerging role for protein-protein interactions*. Cell Res, 2010. **20**(5): p. 519-28.

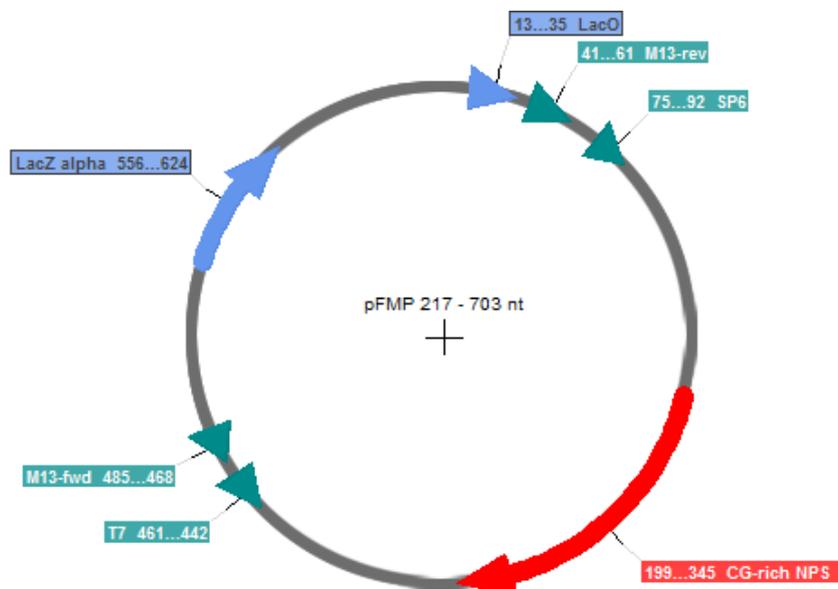
7 Anhang

7.1 Plasmidkarten

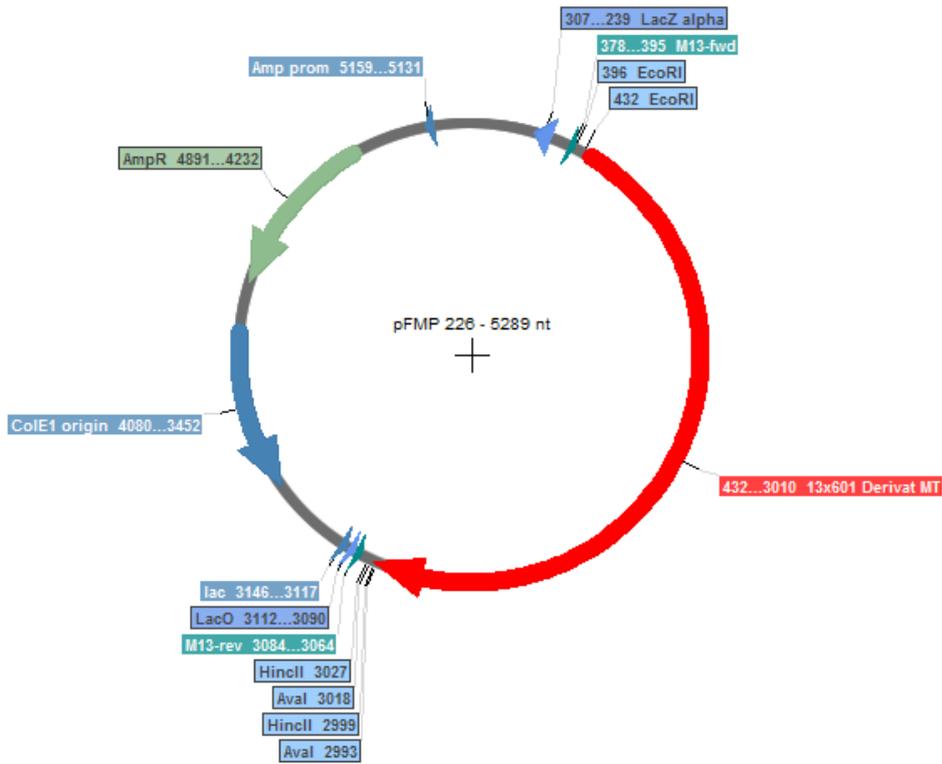
7.1.1 Plasmidkarte pFMP 213



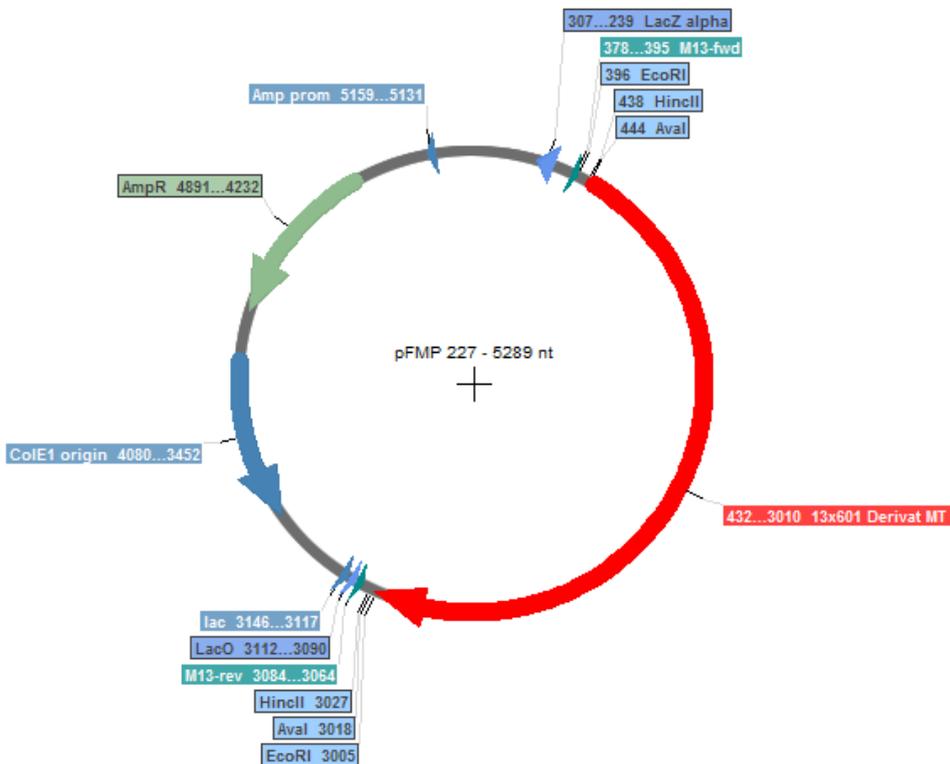
7.1.2 Plasmidkarte pFMP 217



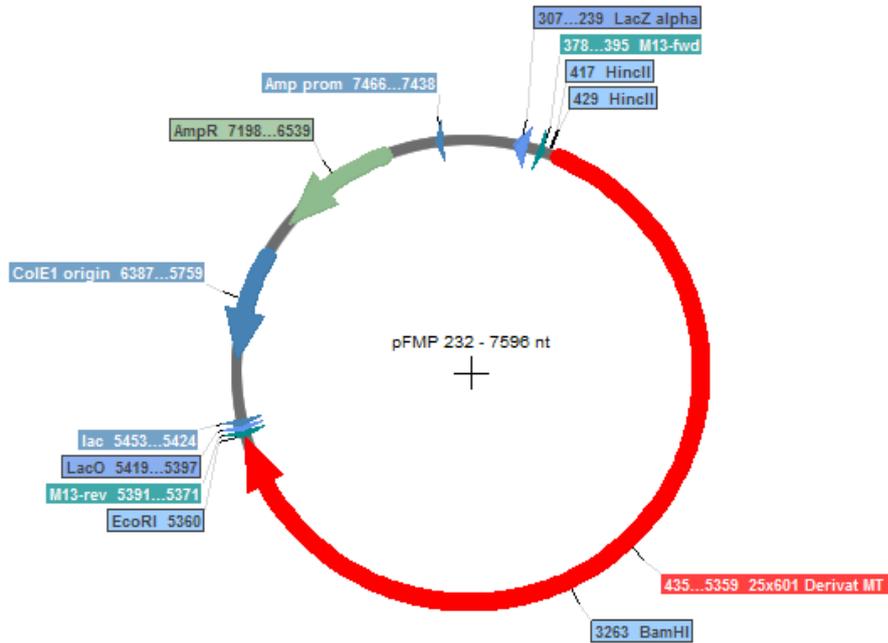
7.1.3 Plasmidkarte pFMP 226



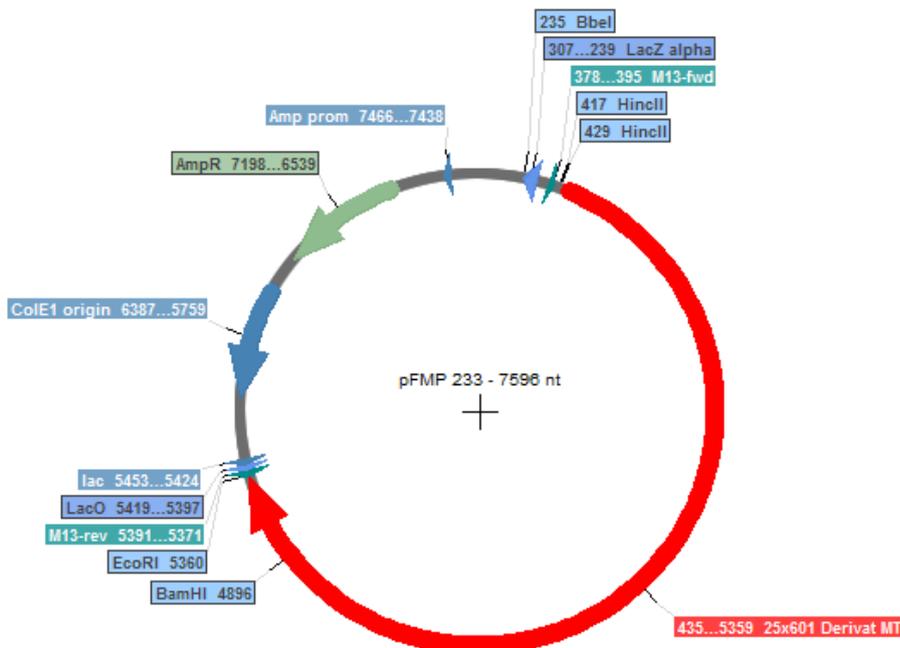
7.1.4 Plasmidkarte pFMP 227



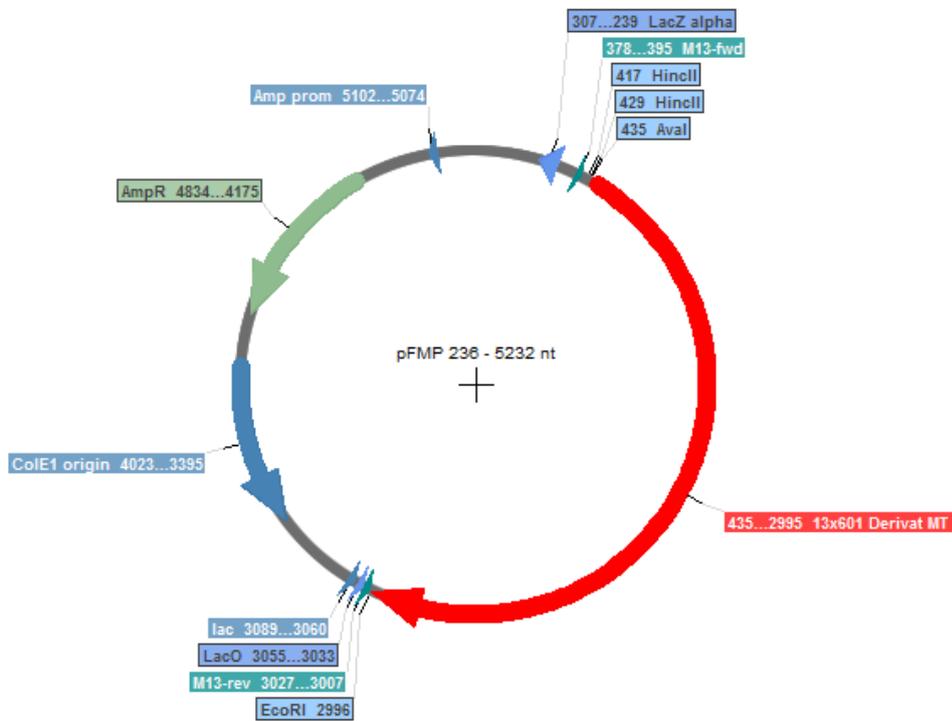
7.1.5 Plasmidkarte pFMP 232



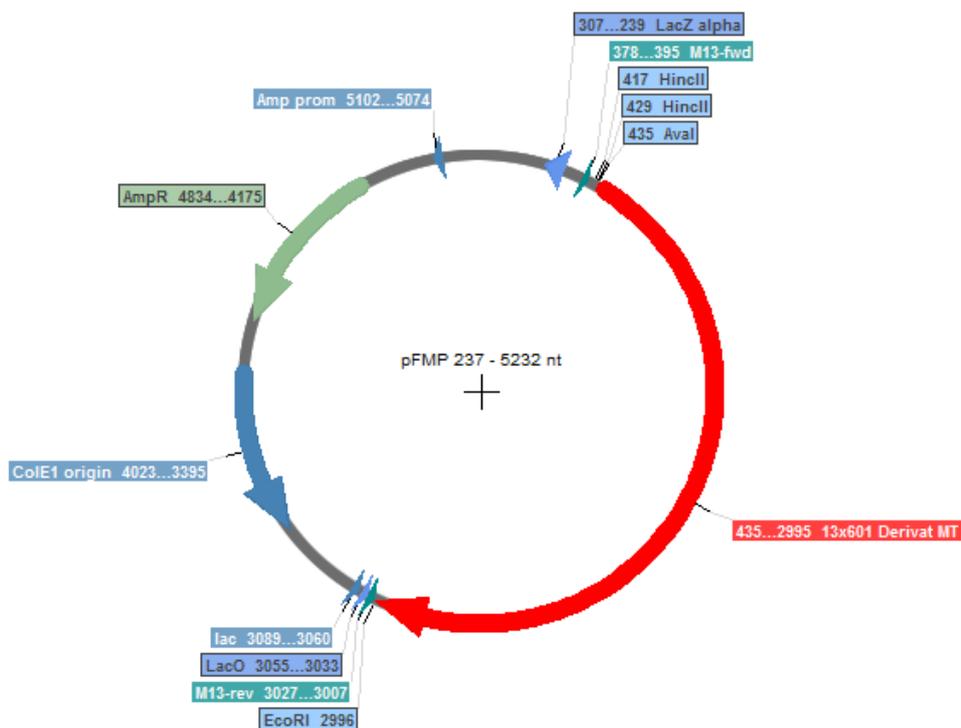
7.1.6 Plasmidkarte pFMP 233



7.1.7 Plasmidkarte pFMP 236



7.1.8 Plasmidkarte pFMP 237



7.2 Ergebnisse und Daten

7.2.1 Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays mit 13-mer Arrays

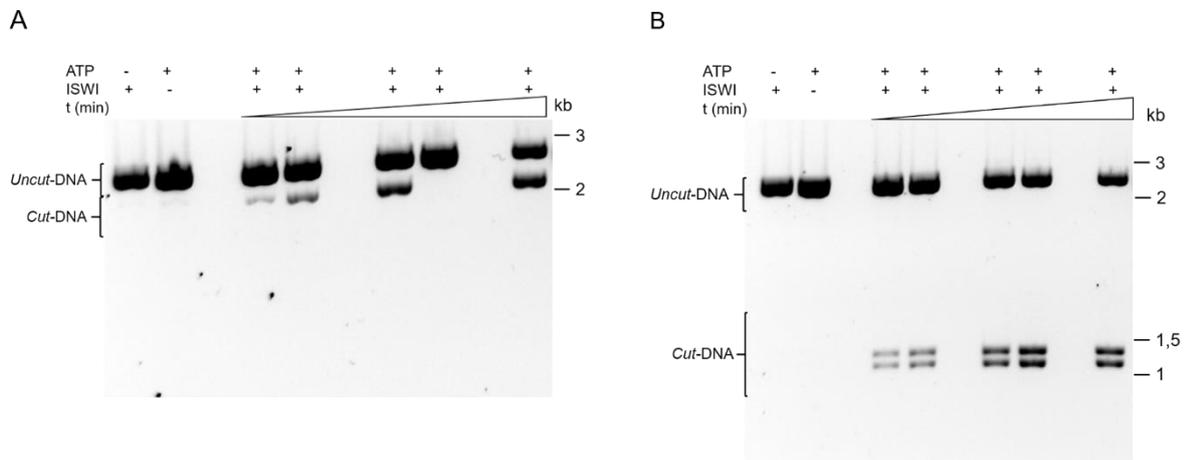


Abb. 48: Replik des Versuchs, beschrieben in 3.3 und Abb. 21. Gelelektrophoresen der externen (A) und internen (B) Nucleosomenpositionen. Es wurden 0,9 % Agarosegele verwendet und mit EtBr gefärbt. Die Versuche wurden fast identisch durchgeführt (200 nM ISWI, Mononucleosomen-Konzentration von 100 nM, 1 mM Mg^{2+} , 1x *Remodeling*-Puffer A (siehe 2.2.8), 1x ATP-Regenerierungssystem (siehe Tab. 6) und 5 μ M ATP). Einzige Abweichungen waren die *Remodeling*-Reaktions-Zeitpunkte, die bei diesem *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assay* 1, 3, 10, 30, und 120 min betragen. (A) Der Zeitpunkt nach dreißig Minuten enthielt kein Restriktionsenzym.

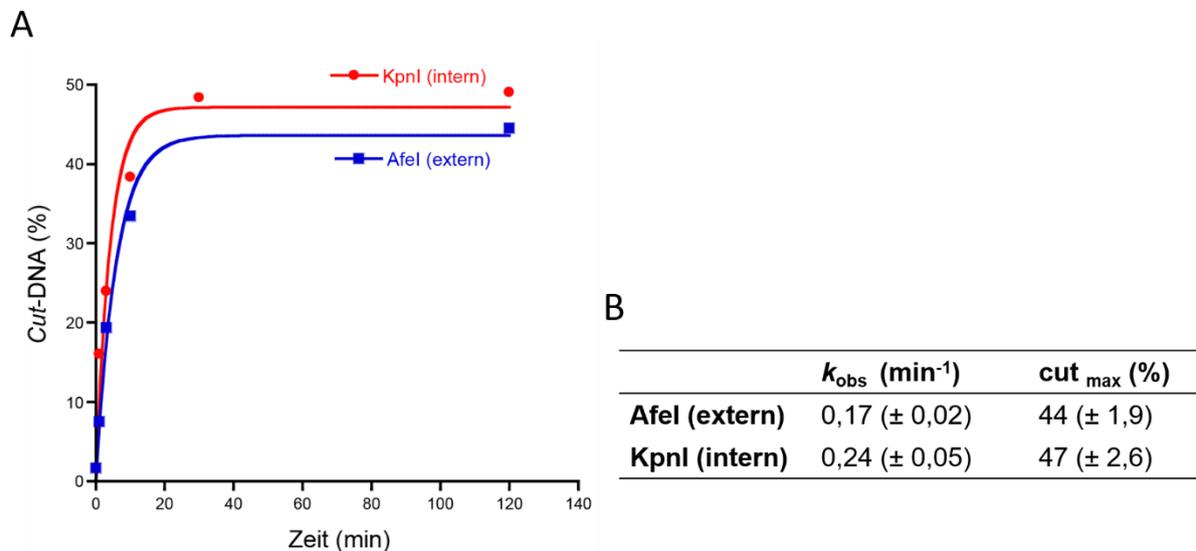


Abb. 49: Replik des Versuchs aus Abb. 22. Die Exponentialfunktionen wurden anhand der Gelbilder in Abb. 48 ermittelt. Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

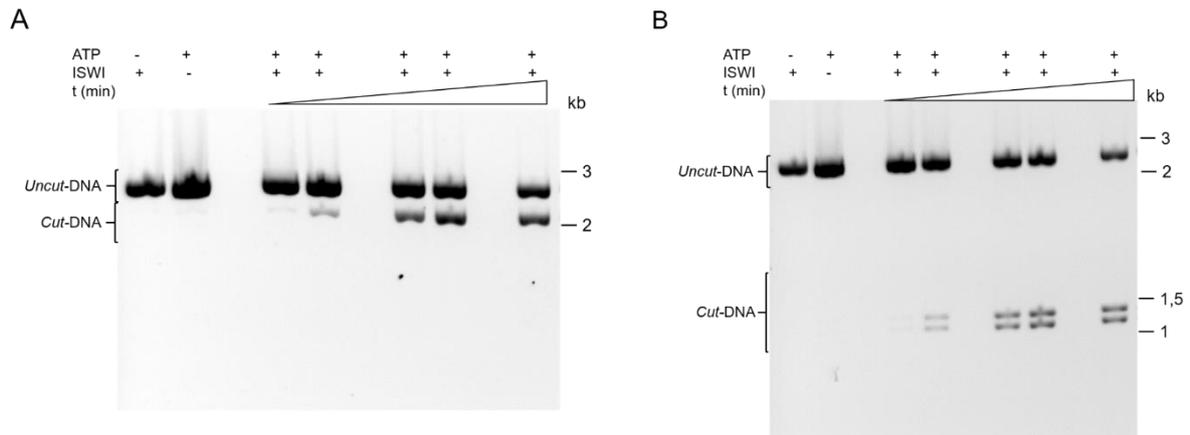


Abb. 50: Replikat des Versuchs, beschrieben in 3.3 und Abb. 21. Die Gelanalyse der *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays* mit externer (A) und interner (B) Nukleosomenposition wurden mittels 0,9 % Agarosegel und EtBr-Färbung analysiert. Die Versuche wurden beinahe identisch durchgeführt (Mononukleosomen-Konzentration von 100 nM, 1 mM Mg²⁺, 1x *Remodeling*-Puffer A (siehe 2.2.8), 1x ATP-Regenerierungssystem (siehe Tab. 6) und 5 µM ATP). Einzige Abweichungen waren die ISWI Konzentration von 800 nM und die *Remodeling*-Reaktions-Zeitpunkte, die bei diesem Replikat 1, 3, 10, 30, und 120 min betragen.

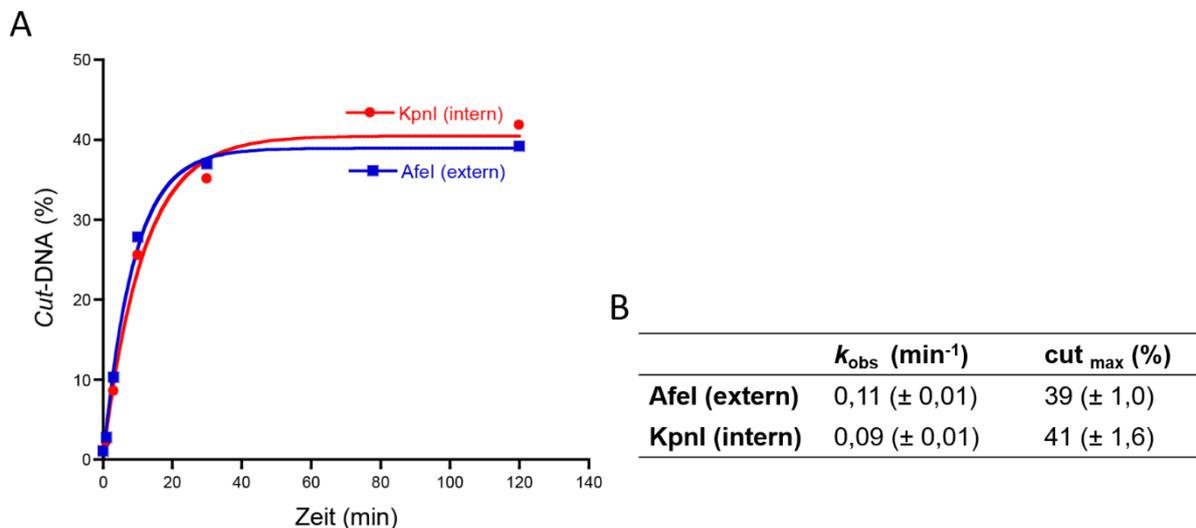


Abb. 51: Replikat des Versuchs, beschrieben in Abb. 22 mit den Exponentialfunktionen, die anhand der Gelbilder in Abb. 50 analysiert wurden. Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

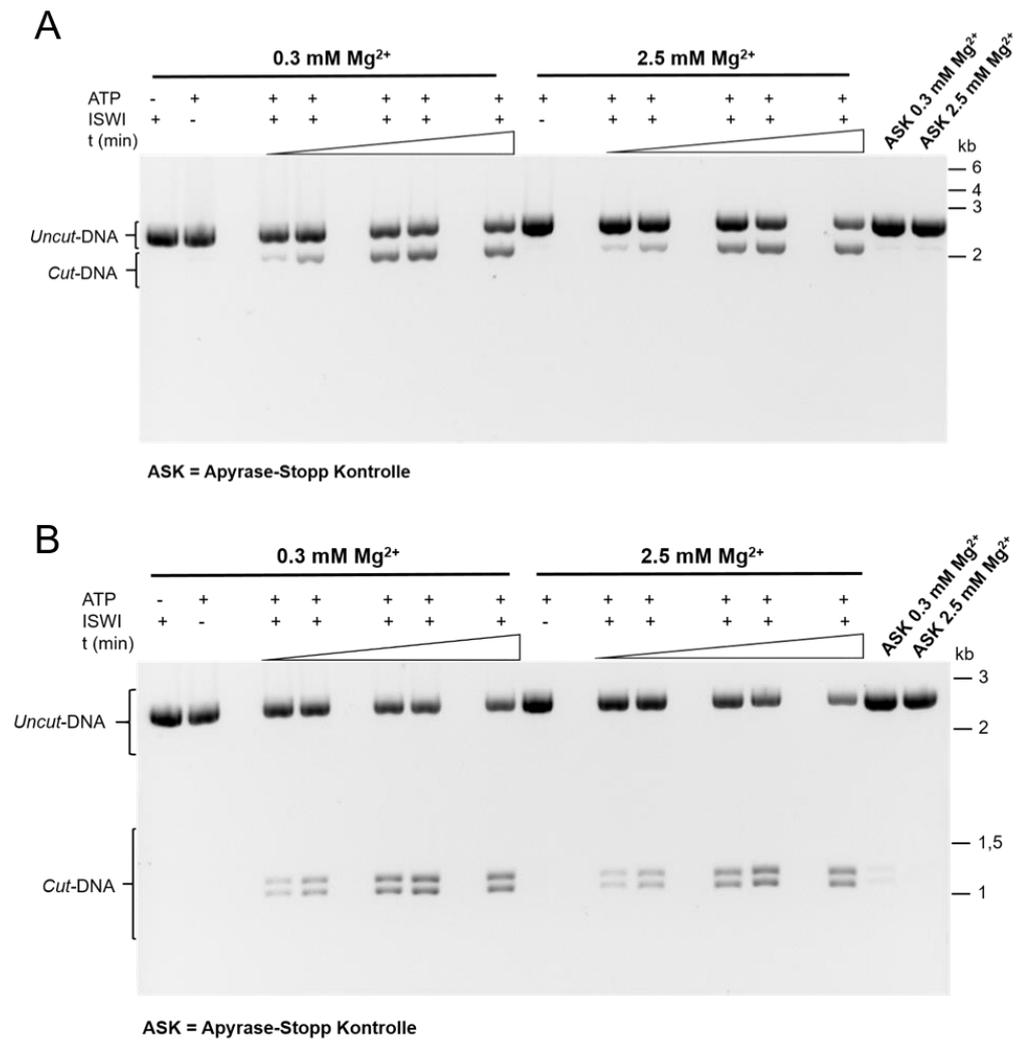


Abb. 53: Gelelektrophoresen des *Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays*, dessen Ergebnisse und Exponentialfunktionen in Abb. 26 aufgeführt wurden. Das Agarosegel (0,9 %) wurde mit EtBr gefärbt. Die *Remodeling-Assays* wurden mit unterschiedlichen Magnesiumionenkonzentrationen durchgeführt (0,3 und 2,5 mM Mg²⁺) und enthielten zudem 200 nM ISWI, eine Mononukleosomen-Konzentration von 100 nM, 1x *Remodeling-Puffer B* (siehe 2.2.8), 1x ATP-Regenerierungssystem (siehe Tab. 6) und 5 µM ATP. *Remodeling* wurde an externen (A) und internen (B) Nukleosomen untersucht. (A und B). Die Apyrase-Stopp-Kontrollen (ASK) mit unterschiedlichen Mengen Mg²⁺ sowie die Kontrollen ohne ATP oder ohne ISWI wiesen keine bedeutenden Mengen an geschnittener DNA (*Cut-DNA*) auf.

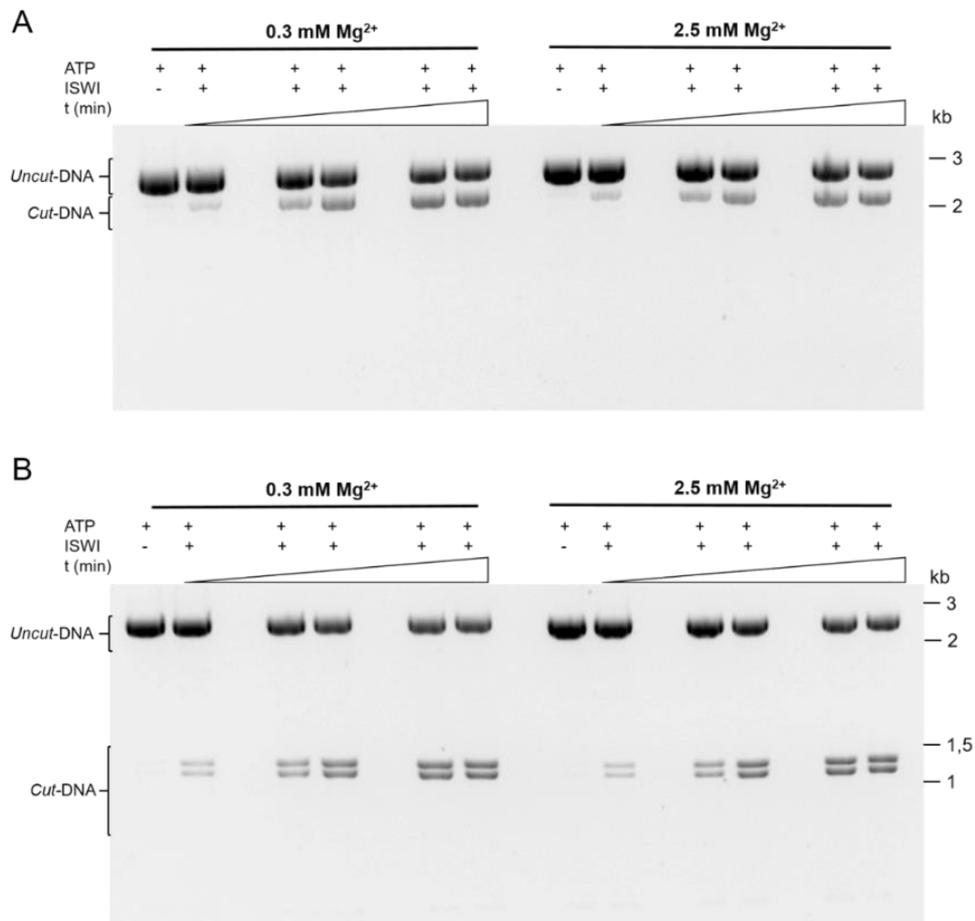


Abb. 54: Gelanalysen der Versuchswiederholung des 13-mer Assays mit unterschiedlichen Magnesiumionenkonzentrationen (siehe 3.5 und Abb. 53). *Remodeling* der externen (A) und internen (B) Nukleosomenposition mit unterschiedlichen Magnesiumionenkonzentrationen. Die Versuche wurden unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt (200 nM ISWI, Mononukleosomen-Konzentration von 100 nM, 1x *Remodeling*-Puffer B (siehe 2.2.8), 1x ATP-Regenerierungssystem (siehe Tab. 6) und 5 μ M ATP). Das Gel beinhaltete 0,9 % Agarose und wurde mit EtBr gefärbt. Die Negativ-Kontrollen ohne ISWI wurden nicht *remodelt*, da die Gelanalysen kaum geschnittene DNA beinhalteten.

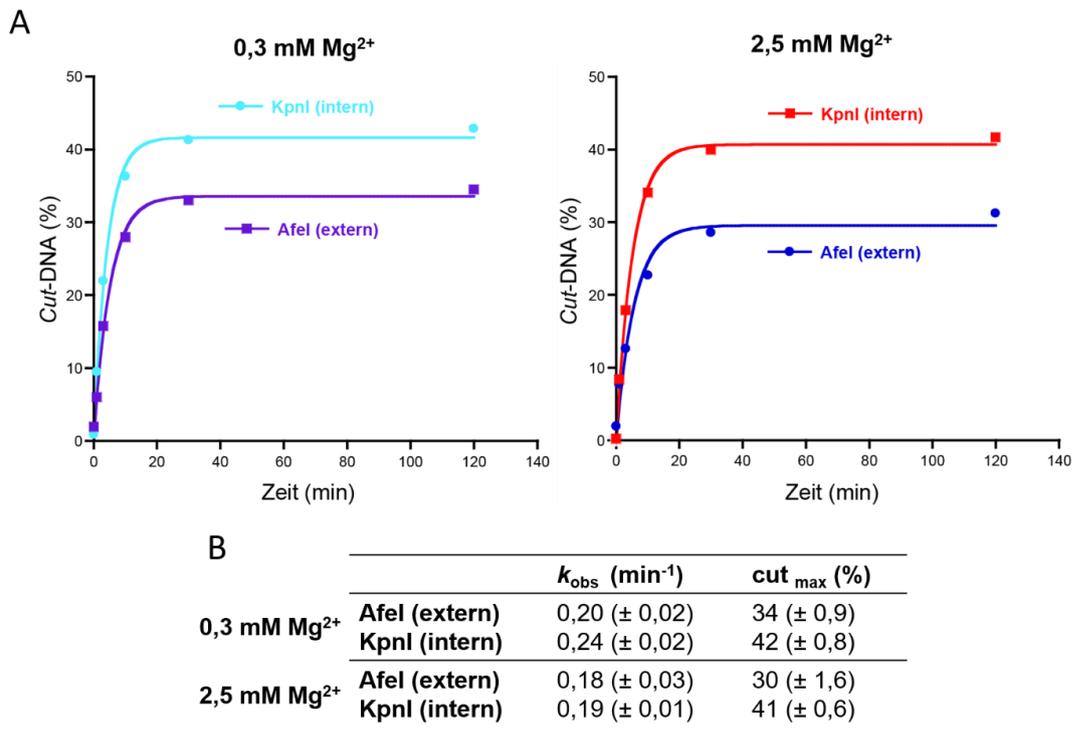


Abb. 55: Replikat des Versuchs aus Abb. 26 und die Exponentialfunktionen der Gelanalysen aus Abb. 54. Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

7.2.2 Restriction-Enzyme-Accessibility-Assays mit 25-mer Arrays

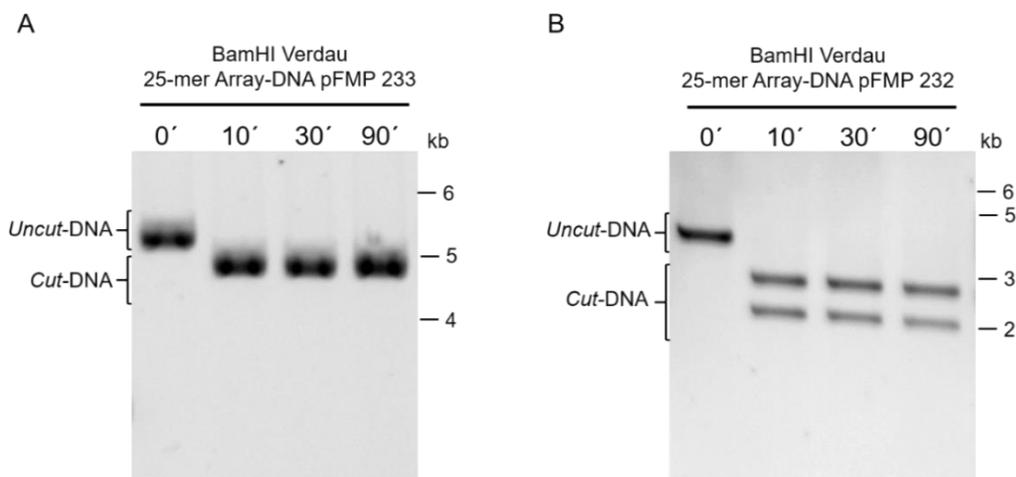


Abb. 56: Gelanalysen des BamHI Verdau mit 25-mer Array-DNA aus pFMP 232 und 233 (siehe 3.8). (A) Der BamHI Verdau der Array-DNA aus pFMP 233 war bereits nach 10 min vollständig abgeschlossen. Die Negativ-Kontrolle zeigt den Verdau zum Zeitpunkt 0. (B) Auch der BamHI Verdau der Array-DNA pFMP 232 war nach 10 min komplett. Die Negativ-Kontrolle zeigt nur ungeschnittene DNA zum Zeitpunkt 0 des Verdau.

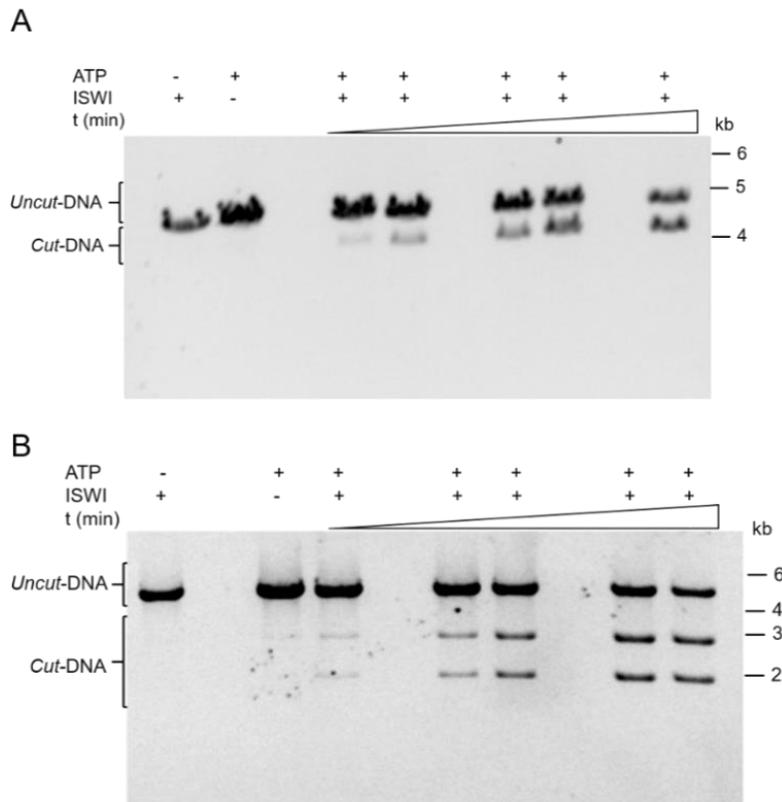


Abb. 57: Replikate des in 3.8 und Abb. 33 gezeigten Versuchs. Die Versuche wurden auf gleiche Art und Weise durchgeführt (200 nM ISWI, eine Mononukleosomen-Konzentration von 100 nM, 1 mM Mg^{2+} , 1x *Remodeling*-Puffer A (siehe 2.2.8), 1x ATP-Regenerierungssystem (siehe Tab. 6) und 5 μ M ATP). Externes *Remodeling* (A) wurde mit einem 0,7 % Agarosegel analysiert, internes *Remodeling* (B) hingegen mittels 0,9 % Agarosegels. Alle Gele wurden mit EtBr gefärbt.

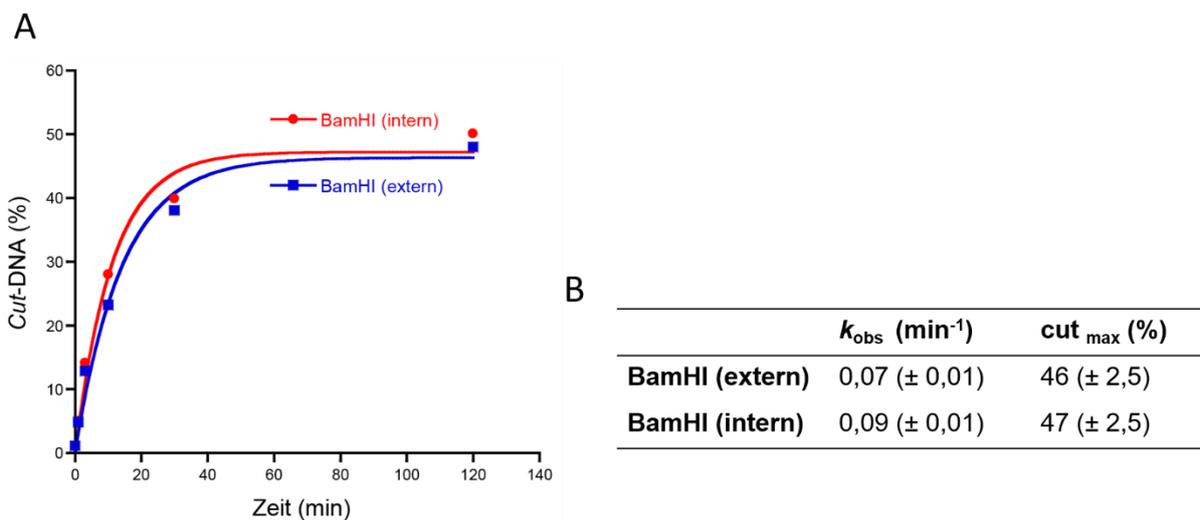


Abb. 58: Exponentialfunktionen der in Abb. 57 dargestellten Gelanalysen und Replikate der in Abb. 34 gezeigten Ergebnisse. Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

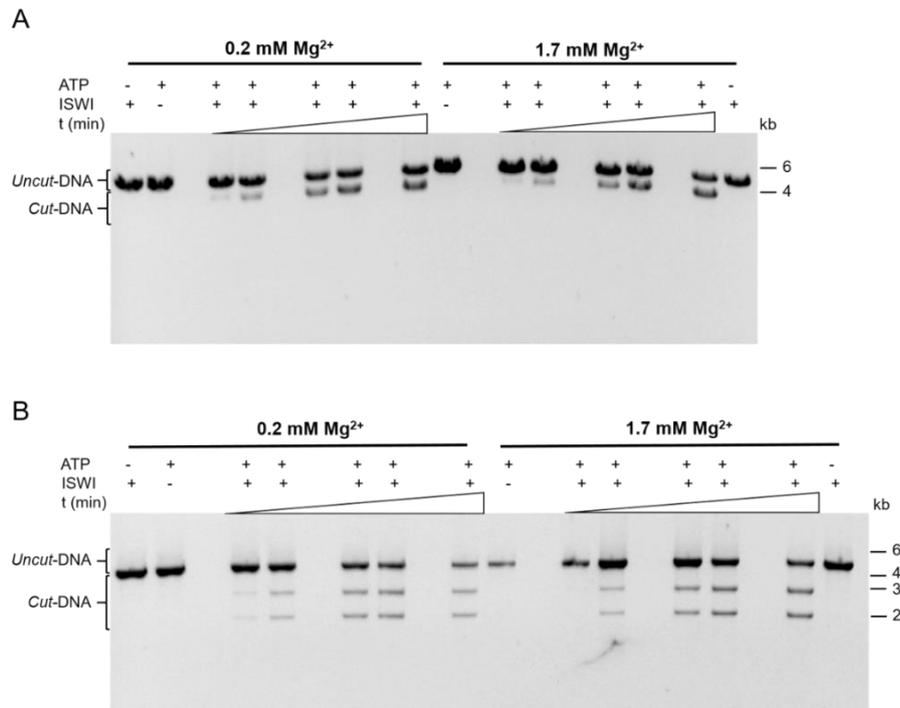


Abb. 60: Gelelektrophoresen der Wiederholung des Versuchs aus Abschnitt 3.9 und Abb. 59. Die Versuche und dazugehörigen Versuchsreplikate wurden identisch durchgeführt (200 nM ISWI, eine Mononukleosomen-Konzentration von 100 nM, 1x *Remodeling*-Puffer B (siehe 2.2.8), 1x ATP-Regenerierungssystem (siehe Tab. 6) und 5 μ M ATP). Die Gelelektrophoresen wurde exakt wie in Abb. 59 beschrieben analysiert und beschriftet.

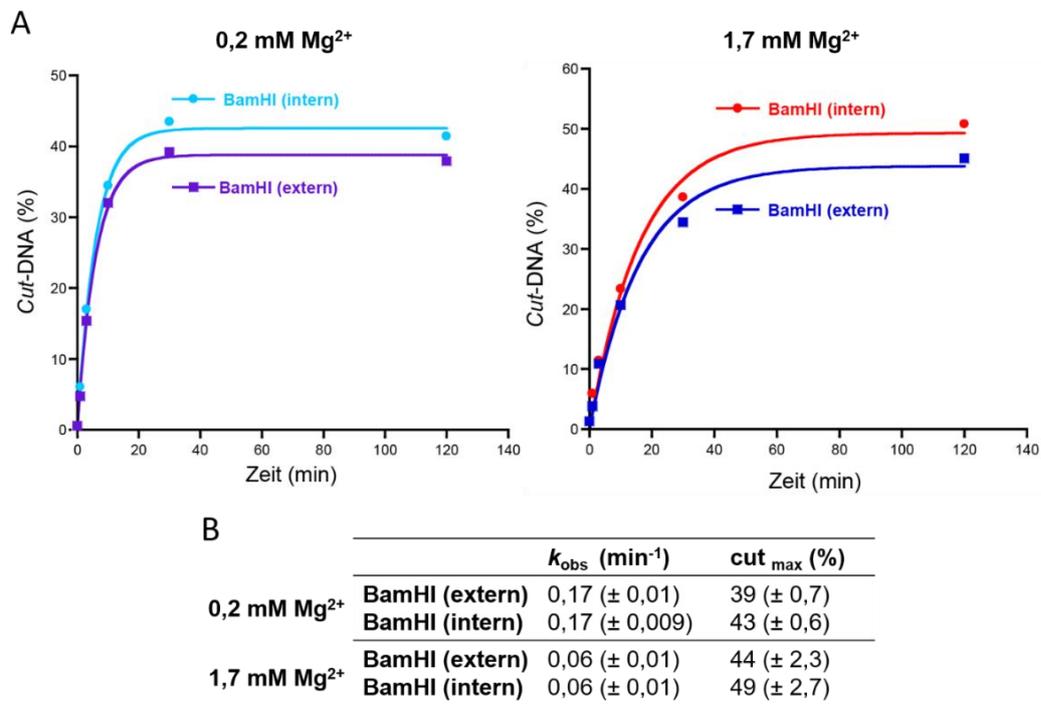


Abb. 61: Replikate des in Abb. 35 gezeigten Versuchs. Die Exponentialfunktionen wurden aus den Gelelektrophoresen in Abb. 60 ermittelt. Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

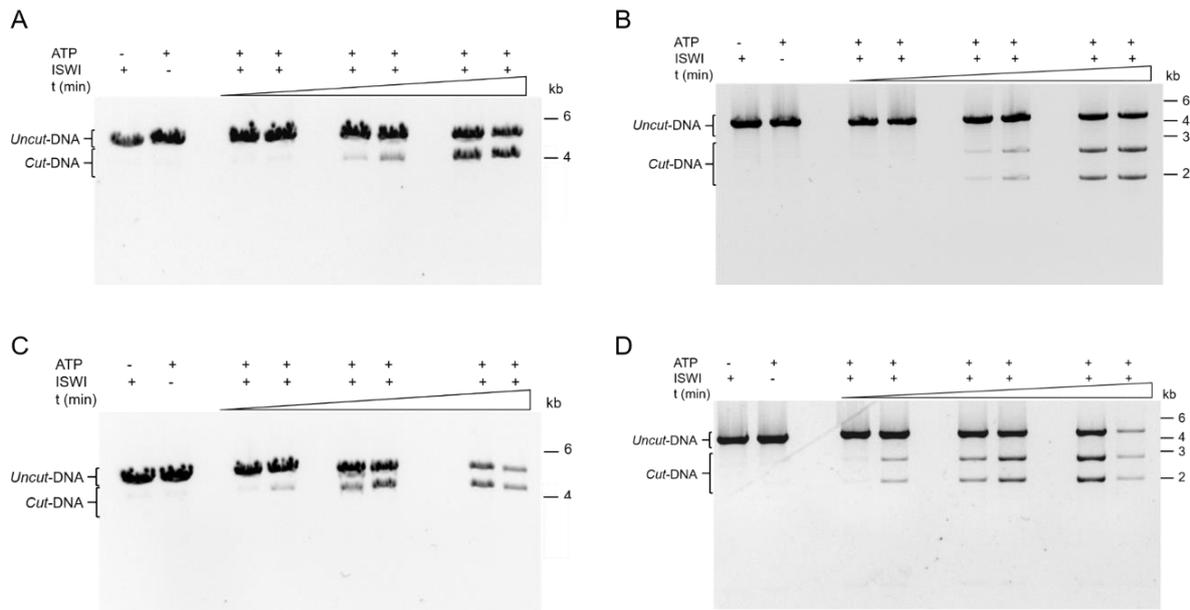


Abb. 62: Gelanalysen der in Abb. 36 gezeigten Ergebnisse. Die *Remodeling*-Assays wurden mit 40 nM (A und B) sowie 500 nM (C und D) ISWI durchgeführt. Dabei wurde *Remodeling* zwischen den externen (A und C) und internen (B und D) Nukleosomenpositionen verglichen. Die *Remodeling*-Reaktionen enthielten eine Mononukleosomen-Konzentration von 400 nM, 1 mM Mg^{2+} , 1x *Remodeling*-Puffer A (siehe 2.2.8), 1x ATP-Regenerierungssystem (siehe Tab. 6) und 5 μ M ATP. Die Gele A und C enthielten 0,7 % Agarose, die Gelanalysen der internen Nukleosomenpositionen hingegen 9,0 %. Alle Gele wurden mit EtBr gefärbt.

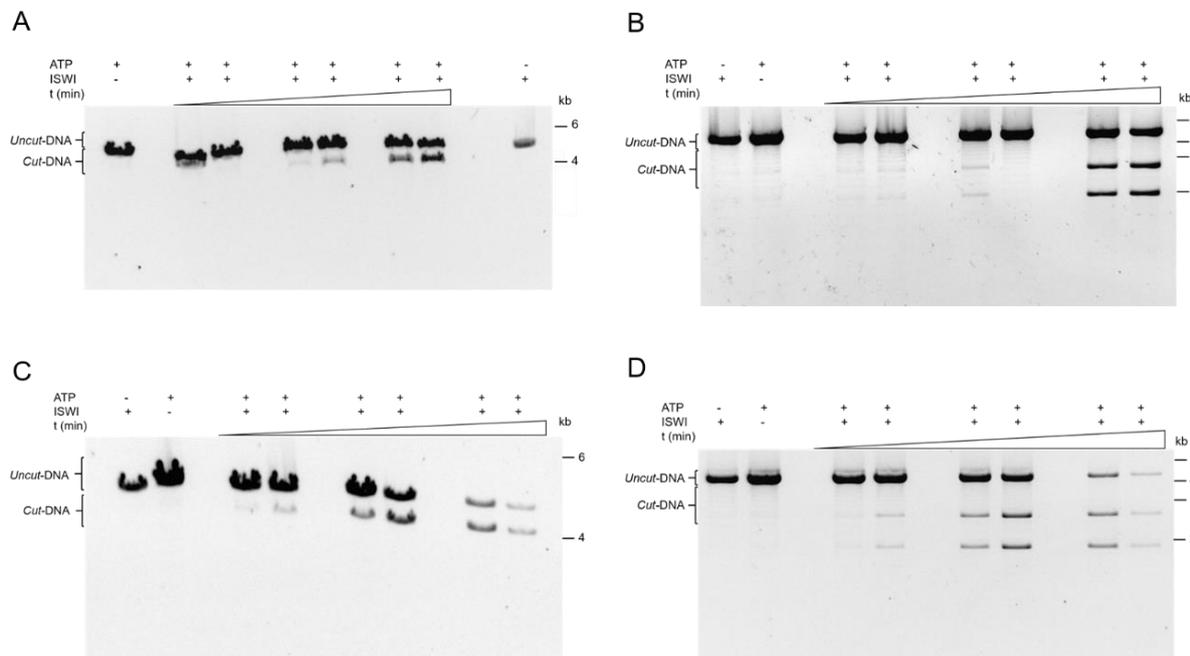


Abb. 63: Versuchswiederholung des in 3.9 beschriebenen Versuchs. Die Versuche wurden auf gleiche Art und Weise durchgeführt (Mononukleosomen-Konzentration 400 nM, 1 mM Mg^{2+} , 1x *Remodeling*-Puffer A (siehe 2.2.8), 1x ATP-Regenerierungssystem (siehe Tab. 6) und 5 μ M ATP). Die Gelanalysen wurden wie in Abb. 62 beschrieben durchgeführt und beschriftet.

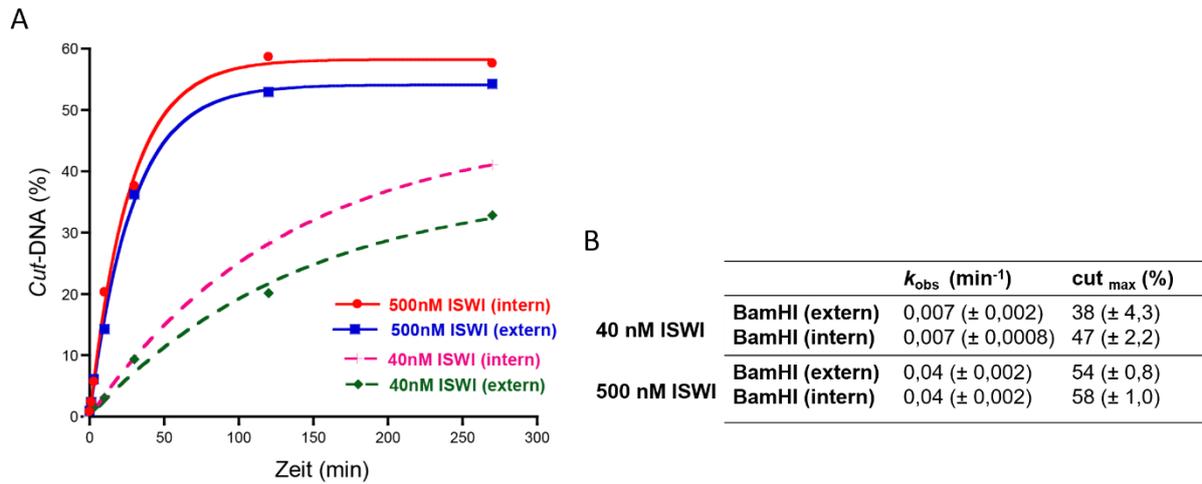


Abb. 64: Replikat des Versuchs aus Abb. 36. Die Exponentialfunktionen entstammen der Gelanalysen aus Abb. 63. Die Fehler sind Standardfehler des Kurvenfits (KaleidaGraph 4.0).

7.2.3 Ergebnisse der Magnesiumfällung mit 13-mer und 25-mer Arrays

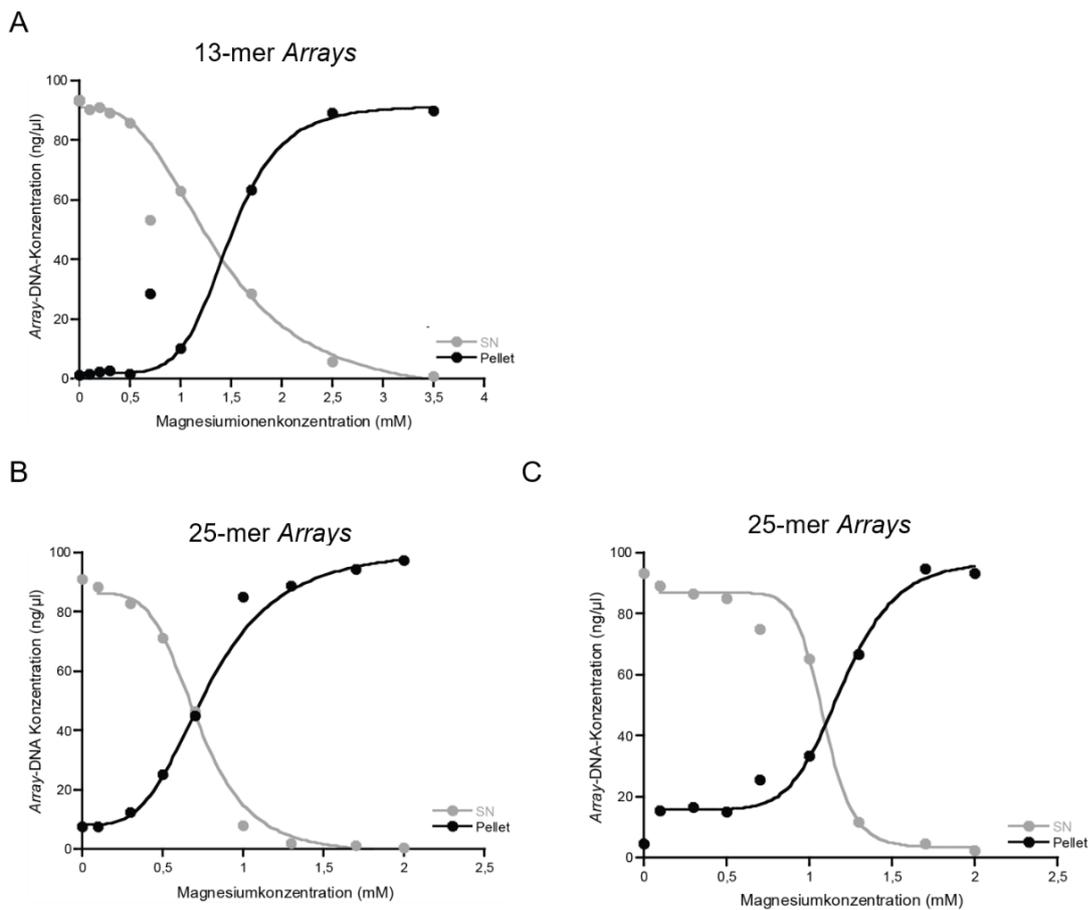


Abb. 65: Ergebnisse der graduellen Magnesiumfällung mit 13-mer und 25-mer Arrays (siehe 2.9.2 sowie 3.5 und 3.7).

7.3 Alignment der MT und WT 601 Sequenzen (197 bp)

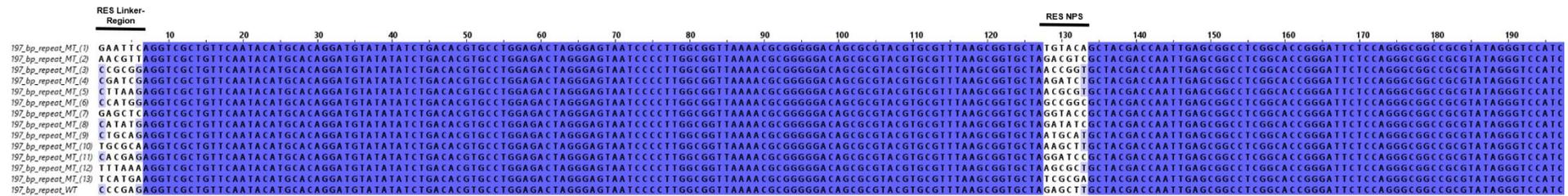


Abb. 66: Alignment der repetitiven 197 bp langen 601 Sequenzen: Die dreizehn 197 bp langen, repetitiven Sequenzen der 13-mer 601 MT Sequenzen (197 bp_repeat MT 1-13) wurden jeweils einzeln mit der 197 bp langen 601 WT Sequenz (197 bp_repeat WT) aligned. Die mutierten Restriktionsschnittstellen der Linker-Regionen (RES Linker-Region) und der Nukleosomen positionierenden Sequenzen (RES NPS) sind farblich hervorgehoben (weiß). Abgesehen von den mutierten Restriktionsstellen unterscheiden sich die repetitiven 197 bp Sequenzen der mutierten 13-mer 601 Sequenzen nicht von der WT 601 Sequenz (lila). Das Alignment wurde mit Hilfe der *ClustalX2.1* Software erstellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm *Jalview 2.10.0* realisiert.

8 Danksagung

Ich möchte mich gerne recht herzlich bei Prof. Peter Becker bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat meine medizinische Doktorarbeit im Bereich der Chromatinforschung zu absolvieren. Die freundliche Atmosphäre in seinem Labor und seine offene Art waren immer eine große Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Felix Müller-Planitz für die ausgezeichnete Betreuung während der Laborzeit und die Unterstützung während des Schreibens der Arbeit. Er hat mir mit großer Geduld das wissenschaftliche Arbeiten beigebracht und dieses Projekt mit seiner Kreativität möglich gemacht.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bedanken bei:

Henrike Klinker für die gute Einarbeitung, Betreuung und fachliche Unterstützung im Labor.

Johanna Ludwigsen für die Zusammenarbeit im Kühlraum sowie für die Freundschaft und Unterstützung darüber hinaus.

Catherine Regnard, dass sie immer eine gute ZuhörerIn war und den Laboralltag verschönert hat.

Zuletzt möchte ich mich auch gerne bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, dass sie mich immer unterstützt haben und für mich da sind.