

Untersuchungen zur Regulation  
des humanen *Zyklin D2*-Promotors  
mittels  
Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Von dem Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
Dr.rer.nat.

genehmigte Dissertation  
von

Diplom-Biologe Oliver Dittrich-Breiholz  
geboren am 15.9.1970, in Hannover

2002

Referent:

Prof. Dr. Bernhard Lüscher

Korreferent:

Prof. Dr. Jörg Schmidtke

Tag der Promotion:

13.12.2002

Myc/Max/Mad-Netzwerk

*Zyklin D2*-Regulation

Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Myc/Max/Mad-network

*Cyclin D2*-regulation

Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP)

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite:

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Zusammenfassung_____	1
1.2 Summary_____	3

## 2 EINLEITUNG

2.1 Die Regulation der Gentranskription_____	5
2.1.1 Die RNA-Polymerase II_____	6
2.1.2 Die Transkriptionsinitiation am Core-Promotor_____	6
2.1.3 Die spezifischen Transkriptionsfaktoren und DNA-Regulator-Elemente_____	8
2.1.4 Die Adapterkomplexe und Kofaktoren_____	8
2.1.5 Transkriptionsregulation im Chromatin-Kontext_____	9
2.1.6 Spezifische Steuerungsmechanismen bei der eukaryontischen Transkriptionsregulation_____	14
2.2 Das Myc/Max/Mad-Netzwerk spezifischer Transkriptionsfaktoren_____	21
2.2.1 Die Mitglieder des Netzwerkes und ihre biologischen Funktionen_____	21
2.2.2 Genregulation durch Mitglieder des Myc/Max/Mad-Netzwerkes_____	23
2.3 Zellzyklusregulation durch c-Myc_____	26
2.3.1 Die Regulation des Übergangs von der G1- zur S-Phase_____	26
2.3.2 Der Transkriptionsfaktor c-Myc als Vermittler zwischen externen Signalen und Zellwachstumsverhalten_____	27
2.3.3 <i>Zyklin D2</i> als c-Myc-Zielgen_____	29
2.4 Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)_____	31
2.4.1 Die Chromatin-Immunpräzipitation: Einsatzmöglichkeiten und Vergleich mit konventionellen Methoden_____	31
2.5 Zielsetzung_____	35

## 3 ERGEBNISSE

3.1 <i>Zyklin D2</i> mRNA-Expression in hematopoetischen Zellkultursystemen_____	36
3.2 c-Myc Protein-Expression in hematopoetischen Zellkultursystemen_____	38
3.3 <i>In-vivo</i> -Besetzung des <i>Zyklin D2</i> -Promotors durch c-Myc (HL-60-Zellen)_____	39
3.4 TPA-induzierter Differenzierungsprozeß in HL-60-Zellen: mRNA-Expression, Promotor-Besetzung und Acetylierungsstatus im Zeitverlauf_____	44
3.5 Acetylierungsniveau am <i>Zyklin D2</i> -Locus (HL-60-Zellen)_____	48

3.6 Interne ChIP-Normalisierung mit Daten zur RNA-Polymerase II-Besetzung des <i>GAPDH</i> -Promotors	53
3.7 <i>In-vivo</i> -Besetzung des <i>Zyklin D2</i> -Promotors durch c-Myc (Jurkat-Zellen)	55
3.8 Acetylierungsniveau am <i>Zyklin D2</i> -Locus (Jurkat-Zellen)	57
3.9 Versuche zur Induzierbarkeit des <i>Zyklin D2</i> -Promotors durch Trichostatin A: Einflüsse auf Acetylierungsniveau und Genaktivität	60

## **4 DISKUSSION**

4.1 Regulatorisch wirksame Potentiale bei der <i>Zyklin D2</i> -Geninduktion	64
4.1.1 Die Besetzung des <i>Zyklin D2</i> -Promotors durch Faktoren des Myc/Max/Mad-Netzwerkes	66
4.1.2 Die zeitliche Auflösung des Besetzungsmusters am <i>Zyklin D2</i> -Promotor	68
4.1.3 Das qualitativ wirksame Potential der Myc/Max/Mad-Faktoren	69
4.1.4 Zusätzliche Signale für die volle <i>Zyklin D2</i> -Induktion	72
4.1.5 Histon-Acetylierung am <i>Zyklin D2</i> -Promotor	77

## **5 MATERIAL UND METHODEN**

5.1 Material	81
5.1.1 Allgemeine Materialien und Reagenzien	81
5.1.2 Standard-Lösungen und -Puffer	81
5.1.3 Nährmedien und Antibiotika für die Arbeit mit Bakterien	81
5.1.4 Bakterienstämme	82
5.1.5 Vektoren	82
5.1.6 Antikörper	82
5.1.7 PCR-Primer	84
5.1.8 Eukaryontische Zelllinien	85
5.1.9 Materialien für die eukaryontische Zellkultur	85
5.1.10 Software	85
5.2 Methoden	86
5.2.1 Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen	86
5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen	86
5.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	86
5.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	87
5.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	87
5.2.6 Kulturbedingungen für die eukaryontische Zellkultur	87
5.2.7 Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen	87
5.2.8 Herstellung von Fraktion-Extrakten für Proteinanalysen	88
5.2.9 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	88
5.2.10 Nachweis von Proteinen im Immunoblot	89
5.2.11 RNA-Isolierung	89
5.2.12 Northern-Blot-Analyse	89
5.3 Chromatin-Immünpräzipitation	92
5.3.1 Beschreibung der Methode	92
5.3.2 Einführung von Messgrößen	95

5.3.3 Notwendige Kontrollen_____	96
5.3.4 Kriterien zur Interpretation erhaltener Daten_____	98
5.3.5 ChIP-Protokoll_____	100
5.3.6 Allgemeine Hinweise zur Durchführung von PCR-Reaktion und Quantifizierung_____	102

## **6 ANHANG**

6.1 Spezielle ChIP-Bedingungen_____	104
6.2 Abkürzungen_____	105
6.3 Wissenschaftlicher Werdegang _____	107
6.4 Publikationen mit Daten aus dieser Dissertation_____	108
6.5 Danksagungen_____	109
6.6 Die Regulation der Gentranskription -ungekürzte Fassung-_____	111
6.6.1 Die Bedeutung differentieller Genregulation im lebenden Organismus_____	111
6.6.2 Vier verschiedene Kategorien der Genregulation_____	111
6.6.3 Eukaryontische Transkriptionsregulation als Zusammenwirken einzelner Teilprozesse_____	115
6.6.4 Komponente 1: RNA-Polymerase-II_____	116
6.6.5 Komponente 2: Generelle Transkriptionsfaktoren und Core-Promotor-Elemente_____	117
6.6.6 Komponente 3: Spezifische Transkriptionsfaktoren und DNA-Regulator-Elemente_____	119
6.6.7 Komponente 4: Kofaktoren (Adaptoren, Mediatoren) und RNA-Pol-II Holoenzym_____	121
6.6.8 Komponente 5: Chromatin und Kofaktoren im Chromatin-Kontext_____	127
6.7 Literaturverzeichnis_____	139

# **1 ZUSAMMENFASSUNG**

## **1.1 Zusammenfassung**

Die Regulierbarkeit der Genexpression ist eine fundamentale Voraussetzung für Ontogenese, Integrität und Anpassungsfähigkeit des Vielzellers. Essenzielle zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose werden primär durch exakt koordinierte Expressionsprogramme gesteuert. Von fundamentaler Bedeutung hierfür ist die Regulierbarkeit auf der Ebene der Gentranskription.

Die enorme Komplexität mit der Transkriptionsregulation abläuft, macht es erforderlich, diese Vorgänge im zeitlichen Verlauf zu erfassen. Für die Untersuchung muss der Gesamtprozess in einzelne Teilabläufe untergliedert werden. Erst dann wird es möglich, kausale Abhängigkeiten zu erkennen und direkte von indirekten Effekten zu unterscheiden.

Die Möglichkeit einer derart differenzierten Analyse ist durch die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) gegeben. Mit dieser Technik kann die unmittelbare Besetzung von Genpromotoren durch regulatorische Proteine, sowie die Chromatinstruktur in diesen Bereichen analysiert werden. Durch die Fixierung lebender Zellen werden in einer Art „Momentaufnahme“ die physiologischen Prozesse an der DNA konserviert und somit einer Untersuchung zugänglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der ChIP-Technik Genregulation durch Proteine des Myc/Max/Mad-Netzwerkes untersucht. Diese Faktoren steuern die oben genannten Prozesse durch die Beeinflussung der Gentranskription.

Es wurde gezeigt, dass die Faktoren c-Myc und Max einen bestimmten Bereich des aktivierten *Zyklin D2*-Promotors in proliferierenden HL-60 Zellen besetzen. Im Verlauf eines durch Phorbolster induzierten Differenzierungsprozesses wird das *Zyklin D2*-Gen in diesen Zellen effektiv herunterreguliert. Bei diesem Prozess vollzieht sich auf molekularer Ebene ein Austausch von Myc/Max zu Mad/Max Heterodimeren, der mit der ChIP-Technik nachgewiesen wurde. Dieser Vorgang wird von einer Abnahme des nukleosomalen Acetylierungsniveaus begleitet. Die Verringerung der Acetylierung korreliert dabei direkt mit dem Austausch der Promotor-assoziierten Transkriptionsfaktoren und mit der Dissoziation des Adaptorproteins TRRAP vom Promotor. Dieses Protein konnte im Zustand aktiver Gentranskription ebenfalls am *Zyklin D2*-Promotor nachgewiesen werden. Es vermittelt die Rekrutierung von Histon-Acetyltransferase (HAT)-Komplexen zu Promotoren.

Durch eine vergleichende Analyse in Jurkat-Zellen wurde aufgezeigt, dass auch in diesen Zellen der *Zyklin D2*-Promotor mit dem Aktivator c-Myc besetzt ist. In diesen Zellen ist jedoch keine Genaktivität nachweisbar.

Innerhalb der durch c-Myc besetzten Region konnte in Jurkat-Zellen ein relativ erhöhtes Acetylierungsniveau gemessen werden. In diesem Promotorbereich korreliert in beiden untersuchten Zelllinien erhöhte Acetylierung mit c-Myc-Besetzung.

Einen abweichenden Befund ergab die Analyse der Acetylierung im Bereich der Transkriptionsstartpunkte: Ein deutlich verstärktes Acetylierungsniveau in HL-60-Zellen wurde als Marker für Genaktivität identifiziert. Innerhalb der transkriptionellen Startpunktregion korreliert die Acetylierungsintensität direkt mit der *Zyklin D2*-Genaktivität.

Unter Einbeziehung der Daten aus aktuellen Publikationen wurde auf der Grundlage der dargestellten Ergebnisse ein Modell zur Beschreibung des regulatorischen Potentials von c-Myc und Mad1 postuliert. Danach besteht die Hauptfunktion des Faktors c-Myc in einer Aufrechterhaltung eines lokal erhöhten Acetylierungsniveaus innerhalb von Zielpromotoren. Durch die physikalische und funktionelle Interaktion mit TRRAP wird Histon-Acetyltransferase Aktivität zur besetzten E-Box rekrutiert und ist ursächlich für die lokale Hyperacetylierung verantwortlich. Diese Acetylierung markiert einen potentiell aktivierbaren Zustand des Gens, reicht aber für eine Induktion nicht aus. Für eine „echte“ Aktivierung werden zusätzliche Signale benötigt.

Innerhalb der myeloisch-monozytären Zelldifferenzierung vollzieht sich ein molekularer Austausch von Myc/Max- zu Mad/Max-Komplexen am Promotor. Die parallel messbare Verringerung des Acetylierungsniveaus und die Dissoziation des Proteins TRRAP vom Promotor implizieren, dass die eingeleitete Genrepression mechanistisch über den damit verbundenen Austausch von HAT- zu Histon Deacetylase-Komplexen vermittelt wird.

## 1.2 Summary

The regulation of gene expression is a prerequisite for ontogenesis, integrity and physiological flexibility in metazoans. Important cellular processes like cell growth, differentiation or apoptosis are regulated by exactly co-ordinated gene expression programmes. In this respect, transcriptional regulation is of special importance.

The enormous complexity of such processes makes it necessary to examine single steps rather than whole processes. This enables the experimentator to identify causal dependencies and to discriminate between direct and indirect effects. Such analyses are possible when performing chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments. This method allows it to identify the occupancy and the chromatin status of a promoter.

Within this work, transcriptional regulation by members of the Myc/Max/Mad family of proteins was examined. These factors are potent regulators of the above mentioned processes due to their influence on transcriptional regulatory mechanisms.

It could be shown that the factors c-Myc and Max occupy a specific region within the activated *cyclin D2* promoter in proliferating HL-60 cells. When these cells are induced to undergo a myeloid/monocyte differentiation process, the *cyclin D2* gene is efficiently down-regulated. During this process, a molecular switch from Myc/Max to Mad/Max heterodimers occurs at the level of promoter occupancy. This has been documented by ChIP-analyses. The event is accompanied by a decrease in histone acetylation levels. The process also correlates with the dissociation of TRRAP, a protein previously identified as c-Myc interaction partner, from the gene promoter. This factor has been shown to be physically and functionally linked to histone acetyltransferases.

In the context of a comparative analysis in Jurkat cells, it could be shown that in these cells, as in HL-60 cells, the *cyclin D2* promoter is occupied by the activator protein c-Myc. This was unexpected since *cyclin D2* is not expressed at detectable levels in Jurkat cells. Within the region of c-Myc occupancy, chromatin shows elevated acetylation levels in Jurkat cells. Thus, nucleosomal acetylation and c-Myc occupancy do correlate at this location.

The intensity of acetylation around the transcriptional start sites was identified as a marker of gene activity, since a correlation of gene activity and elevated acetylation levels was obvious. Taken published data into account and based on my own work, a model to explain Myc/Max/Mad function has been postulated:

The main function of the transcription factor c-Myc is to maintain hyperacetylated regions within target promoters. Through physical and functional interactions with TRRAP, histone



acetyltransferase activity is recruited. This activity is responsible for locally elevated acetylation levels and marks a potentially inducible gene. For full induction of the gene, additional signals are necessary.

During myeloid/monocytic cell differentiation a molecular switch from Myc/Max to Mad/Max complexes takes place. The simultaneously detectable decrease in overall histone acetylation and the dissociation of TRRAP from the complex strongly support a model, in which the initiated gene repression is mediated by an exchange of HAT- and HDAC complexes at the target promoter.

## **2 EINLEITUNG**

### **2.1 Die Regulation der Gentranskription\***

#### ***Einführung (Die Regulation der Gentranskription):***

*Die Regulierbarkeit der Expression von Genen stellt eine fundamentale Voraussetzung für die Existenz aller Lebewesen dar. Im weitesten Sinne gewährleistet eine genau koordinierte Genexpression die strukturelle und funktionelle Integrität einer individuellen Zelle. Zusätzlich befähigt regulierbare Genexpression Lebewesen, auf wechselnde Umwelteinflüsse angemessen und vorteilhaft reagieren zu können.*

*Wird ein vielzelliger Organismus betrachtet, so wird auch die Notwendigkeit der Steuerung ontogenetischer Abläufe deutlich. Jeder Teilprozess im Rahmen der Entwicklung eines Vielzellers, aus der befruchteten Eizelle bis hin zum vollständig ausdifferenzierten Lebewesen, bedarf einer genauesten Koordination der Genexpression.*

*Wie komplex die Anforderungen an das zugrundeliegende regulatorische System sind, spiegelt sich auch wider, wenn betrachtet wird, auf welche unterschiedliche Weise einzelne Gene prinzipiell reguliert werden können und müssen:*

*Die Produkte der Haushaltsgene werden ständig benötigt, so dass konstitutive Genexpression gewährleistet sein muss. Auf der anderen Seite muss die Mehrzahl aller Gene in den meisten Fällen konstitutiv inaktiv gehalten werden. Einige Gene werden erst ab einem bestimmten Zeitpunkt zellulärer oder ontogenetischer Differenzierung signalabhängig induziert. Derart regulierte Gene werden dann entweder bald wieder inaktiviert, weil der entsprechende Entwicklungsschritt vollzogen worden ist, oder bleiben jetzt konstitutiv aktiv. Einige Gene müssen in einem zeitlich alternierenden Wechsel an- und abgeschaltet werden, wie eine Reihe von Zyklinen im Rahmen der Zellzyklusregulation. Bei den sogenannten Tumorsuppressorgenen und den Onkogenen kommt es ebenfalls auf eine exakte Koordination der zeitlichen Aktivierungs- und Inaktivierungsprozesse an. Bei diesen Genen muss außerdem in verstärktem Maße der Gefahr inadäquater Regulation vorgebeugt werden. Anhand dieser Beispiele zur speziellen Form von Genregulation wird deutlich, wie vielfältig die Anforderungen an ein Steuerungssystem der Genexpression sind.*

\*Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde ein ausführliches Kapitel zum Thema: Regulation der Gentranskription in Eukaryonten verfasst. Da eine Reihe der dort beschriebenen Aspekte für das Verständnis der experimentellen Arbeit nicht entscheidend notwendig ist, wurden in das Einleitungskapitel nur Teile dieser Beschreibung eingearbeitet. Der vollständige Text findet sich im Anhang unter Punkt 6.6.

*Vor dem Hintergrund identischen genetischen Materials individueller Zelltypen müssen Entwicklungs- und Wachstumsprozesse koordiniert werden. Auch Spezialisierung und Aufgabenteilung zwischen Zellen und Gewebeverbänden sind zu gewährleisten. Besteht die Gefahr, dass durch fehlreguliertes Wachstumsverhalten oder autoaggressive Zell-Zell-Interaktionen der vielzellige Organismus in seiner Gesamtheit bedroht ist, so muss die Gewichtung immer auf die Konstitution des Gesamtorganismus hin ausgerichtet sein. Gegebenenfalls müssen Einzelzellen durch den als Apoptose bezeichneten Mechanismus selektiv eliminiert werden. Auch diesem Prozess liegt spezifisch gesteuerte Genregulation zugrunde.*

*Aus der wissenschaftlichen Sicht kann die lebende Natur auf verschiedenen Ebenen untersucht und beschrieben werden. Die Regulation von Genen hat sich jedoch als so grundlegend aussagekräftiges System herausgestellt, dass alle beobachtbaren Effekte oder ganz allgemein, alle Veränderungen im Rahmen lebender Systeme, am genauesten und uneingeschränkt auf der Ebene veränderbarer Expressionsprofile beschrieben werden können. Die Funktionsweise des steuernden Koordinationssystems zu verstehen, bedeutet in diesem Zusammenhang zu einem fundamentalen (aber naturwissenschaftlichen) Verständnis der belebten Natur zu gelangen.*

### 2.1.1 Die RNA-Polymerase II

Im eukaryontischen System wird die Gesamtheit der für Proteine kodierenden Gene von der RNA-Polymerase II (RNA-Pol-II) transkribiert. Dieses Enzym katalysiert die Vorläufer-RNA-Synthese. Als Voraussetzung hierfür muss der Bereich des Transkriptionsstartes innerhalb von Promotoren erkannt und von der Polymerase besetzt werden. Die entsprechende Region wird auch als Core-Promotor bezeichnet. Dem isolierten RNA-Polymerase-II-Enzym fehlt die entsprechende Aktivität zur spezifischen Erkennung des Core-Promotors. Assoziierte Faktoren gewährleisten die korrekte Promotorerkennung und Initiation der Gentranskription (Roeder 1996).

### 2.1.2 Die Transkriptionsinitiation am Core-Promotor

Die Erkennung eines Core-Promotors und die initiale physikalische Interaktion der RNA-Pol-II mit dem entsprechenden DNA-Abschnitt wird durch die sogenannten Generellen

Transkriptionsfaktoren (GTFs) vermittelt. Diese Faktoren sind teilweise aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt. Anfang der (19)90-er Jahre wurden eine Vielzahl von Untersuchungen zur Funktion dieser Faktoren durchgeführt (Buratowski et al. 1989; Zawel and Reinberg 1993). Unter Einsatz rekombinanter oder aufgereinigter GTFs wurden dabei *in-vitro* Transkriptionssysteme rekonstituiert, um die zeitlichen Abläufe bei der Promotorerkennung zu analysieren. Anhand der erhaltenen Daten wurde das Modell des schrittweisen Aufbaus eines Initiationskomplexes entwickelt (Buratowski 1994; Roeder 1996):

In einem ersten Schritt bindet der Faktor TFIID an die TATA-Box, ein DNA-Element innerhalb von Core-Promotoren, das im Bereich des Nukleotids –30 (relativ zum Transkriptionsstart) lokalisiert ist. TFIID setzt sich aus dem TATA-Box bindenden Protein (TBP) und einer großen Anzahl von TBP assoziierten Faktoren (TAFs) zusammen. Während die Erkennung der TATA-Box über die direkte physikalische Interaktion von TBP mit der TATA-Box vermittelt wird, interagieren einige TAFs mit benachbarten DNA-Abschnitten. Die Erkennung und Besetzung der TATA-Box stellt den ersten Schritt im Aufbau eines sogenannten basalen Transkriptionskomplexes dar.

TFIIB bindet an den TFIID-DNA-Komplex, stabilisiert die Bindung und bewirkt die Korekrutierung des Faktors TFIIF und der RNA-Pol-II. Damit ein transkriptionskompetenter Initiationskomplex entstehen kann, binden zum Schluss die GTFs TFIIE und TFIIH. TFIIE weist eine intrinsische DNA-Helikase-Aktivität auf und bewirkt eine ATP-abhängige Dissoziation der DNA-Einzelstränge im Promotorbereich. TFIIF hat Kinase-Aktivität und stimuliert durch die Phosphorylierung des C-Terminus der RNA-Pol-II die Transkriptionsinitiation.

Neben der TATA-Box können das Initiator-Element (Inr) und eine Reihe weiterer identifizierter Elemente eine Rolle bei der Erkennung von Core-Promotoren und der korrekten Positionierung des Initiationskomplexes spielen (Weis and Reinberg 1992; Ince and Scotto 1995; Verrijzer and Tjian 1996; Lagrange et al. 1998).

Die wesentliche Aufgabe von GTFs und Core-Promotor-Elementen besteht in der Koordination der Transkriptions-Initiation. Core-Promotoren werden spezifisch erkannt und nur an diesen Stellen bildet sich ein transkriptionskompetenter Komplex aus. Durch dieses Erkennungssystem wird es dem Transkriptionsapparat möglich, Gene im Kontext des Genoms zu identifizieren.

### 2.1.3 Die spezifischen Transkriptionsfaktoren und DNA-Regulator-Elemente

Zusätzlich zum Core-Promotor-Bereich beinhalten eukaryontische Promotoren sequenz-spezifische Regulator-Elemente, die die Transkription positiv (Enhancer-Elemente) oder negativ (Silencer-Elemente) beeinflussen können. Für die Vermittlung dieser Effekte binden spezifische Transkriptionsfaktoren selektiv an die responsiven DNA-Bindungselemente. Die spezifische DNA-Bindung dieser Faktoren stellt die Voraussetzung für eine direkte physikalische Interaktion mit Komponenten des basalen Transkriptionskomplexes, oder eine funktionelle Einflussnahme auf den Ablauf des Genregulationsprozesses dar .

Aufgrund ihrer Eigenschaft ganz bestimmte Regulator-Elemente erkennen und binden zu können, werden spezifische Transkriptionsfaktoren in unterschiedliche Familien eingeteilt (Mitchell and Tjian 1989).

### 2.1.4 Die Adapterkomplexe und Kofaktoren

Für die Vermittlung des Regulationspotentials spezifischer Transkriptionsfaktoren kommt es zu einer funktionellen Interaktion mit dem zentralen Molekül der Transkription, der RNA-Polymerase-II. Bei der Suche nach derartigen Interaktionen standen in den (19)80-er und (19)90-er Jahren die Identifikation und Analyse direkter physikalischer Kontakte im Vordergrund. In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass viele spezifische Transkriptionsfaktoren nicht direkt mit der RNA-Pol-II, sondern mit assoziierten Proteinen interagieren, die ihrerseits physikalisch mit der RNA-Pol-II verbunden sind. Mittlerweile ist bekannt, dass derartige, auch als Adaptern zu bezeichnende Proteine strukturell sehr heterogen sein können und in Form größerer Proteinkomplexe mit der RNA-Pol-II interagieren (Lemon and Tjian 2000).

Ein derartiges Adapter-System stellt der aus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) isolierte Mediator-Komplex dar, der in der Hefe mit dem C-Terminus der RNA-Pol-II physikalisch verbunden vorliegt (Bjorklund and Kim 1996). Für einzelne Komponenten des Mediators konnten physikalische Interaktionen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Im Vielzeller sind mittlerweile eine große Anzahl hochmolekularer Proteinkomplexe isoliert worden, in denen Homologe der Untereinheiten des Mediators, sowie zusätzliche Proteine identifiziert worden sind (Jones and Kadonaga 2000; Lemon and Tjian 2000). Auch in diesen Komplexen beinhalten einzelne Untereinheiten Interaktionsoberflächen für spezifische Transkriptionsfaktoren.

Zu den Adapterkomplexen kann auch TFIID gezählt werden. Im Rahmen der Transkriptions-Initiation kommt es zu einer direkten Assoziation mit der RNA-Pol-II. Für eine Reihe spezifischer Transkriptionsfaktoren konnten darüber hinaus physikalische Kontakte mit einzelnen TAFs nachgewiesen werden (Verrijzer and Tjian 1996). Diese spezifischen Interaktionen scheinen für die selektive Aktivierung einzelner Gruppen von Genen *in-vivo* relevant zu sein (Holstege et al. 1998).

Ein weiteres Beispiel für einen molekularen Adapter stellen die beiden stark homologen Koaktivatoren CBP und p300 dar. Für diese Proteine konnten eine enorme Menge von Interaktionen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren dokumentiert werden (Goodman and Smolik 2000). Diese Moleküle binden nicht DNA, sondern stellen einen physikalischen Kontakt zwischen spezifischen Transkriptionsfaktoren und dem RNA-Pol-II-Komplex her. Kotransfektions-Experimente belegen, dass CBP prinzipiell in der Lage ist, Transaktivierungspotentiale mehrerer Faktoren zu integrieren. Durch diesen Mechanismus können auch synergistische Effekte vermittelt werden (Oelgeschlager et al. 1996; Carey 1998).

### 2.1.5 Transkriptionsregulation im Chromatin-Kontext

Eukaryontische genomische DNA liegt im Zellkern nicht isoliert, sondern Protein-assoziiert als Chromatin vor. Die hauptsächlichen Protein-Komponenten sind die Core-Histone H2A, H2B, H3 und H4 das Linker-Histon H1 und verschiedene Gruppen von High-Mobility-Group- (HMG-) Proteinen (Kornberg and Lorch 1999; Thomas and Travers 2001). Die repetitive Einheit des Chromatins ist das Nukleosom. Das Nukleosom besteht aus einem Oktamer, das sich aus je zwei Molekülen der Core-Histone zusammensetzt. 146 Bp DNA sind in zwei Windungen um den Histon-Kern (Nukleosomen-Core) „gewickelt“. Die in ihrer Länge leicht variablen DNA-Abschnitte zwischen den Nukleosomen (Linker-Regionen) werden von je einem Molekül H1 gebunden. Während der zentrale Teil des Core-Partikels eine hoch geordnete Struktur aufweist, zeigen jeweils 15-30 Aminosäuren der N-terminalen Enden aller vier Core-Histone in hochauflösenden Strukturanalysen einen wenig geordneten Aufbau und ragen in unterschiedlichen Orientierungen aus dem Core-Partikel heraus (Luger et al. 1997). Diese Regionen werden auch als Nukleosomen-Tails bezeichnet.

Die „Verpackung“ genomischer DNA in Chromatin hat einen generell inhibitorischen Einfluss auf Gentranskription. Am deutlichsten kann dieser Effekt in rekonstituierten *In-vitro*

Transkriptionssystemen aufgezeigt werden: Werden aufgereinigte essentielle GTFs (TFIID, TFIIB, TFIIF, TFIIE, TFIIH), das RNA-Pol-II-Enzym und die zwei Kofaktoren TFIIA und PC4 mit nicht nukleosomal verpackter („nackter“) Promotor-DNA inkubiert, so kann ein bestimmtes „basales“ Transkriptionsniveau ermittelt werden. Wird die Template-DNA zuvor mit einem aus *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) isolierten Extrakt (S-190) und einem Überschuss an Histonen vorinkubiert, so bildet sich eine nukleosomale DNA-Struktur aus. In dieser Form wird die basale Transkription inhibiert und kann nicht oder vergleichbar schlecht durch spezifische Transkriptionsaktivatoren induziert werden.

Mittlerweile ist allgemein akzeptiert, dass Chromatin-bedingte Repression über einen entscheidenden Mechanismus vermittelt wird: Im Gegensatz zu freier DNA ist die „Zugänglichkeit“ nukleosomal verpackter DNA-Elemente für Transkriptionsfaktoren und für RNA-Pol-II-Komplexe in drastischer Weise eingeschränkt.

Im eukaryontischen Organismus haben sich zwei fundamentale, evolutionär konservierte Systeme entwickelt, durch die Transkription im Chromatin-Kontext gewährleistet bleibt und durch die zusätzlich ein enormes regulatorisch wirksames Potential entsteht: Das sogenannte „Nukleosomen-Remodeling“ und die „Acetylierung der Core-Histon-Tails“.

Nukleosomen-Remodeling:

Es ist mittlerweile eine große Anzahl von Protein-Komplexen identifiziert worden, deren Gemeinsamkeit im Vorhandensein von Helikase-Aktivität, sowie dem Potential zum sogenannten Nukleosomen-Remodeling besteht. Sehr gut charakterisiert sind die aus der Hefe isolierten Remodeling-Komplexe SWI/SNF und der essentielle RSC-Komplex (Travers 1999). Die katalytische Untereinheit ist im Fall des SWI/SNF-Komplexes das Swi2/Snf2-Protein und im RSC-Komplex eine homologe Helikase. Beide Komplexe steigern *in-vitro* das DNA-Bindungspotential spezifischer Transkriptionsfaktoren in ATP-abhängigen Reaktionen. Dabei katalysieren die Helikasen Reaktionen, die zu einer Auflockerung der DNA-Histon-Kontakte und damit zu einer gesteigerten Mobilisierbarkeit der Nukleosomen führen (Bazett-Jones et al. 1999; Lorch et al. 1999; Travers 1999). Im Fall des SWI/SNF-Komplexes konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass ein Nukleosom auf einem DNA-Molekül „verschoben“ werden kann (Whitehouse et al. 1999). Für beide Komplexe wurde beschrieben, dass sie den Transfer eines intakten Nukleosoms auf ein separates DNA-Molekül katalysieren (Owen-Hughes and Workman 1996; Lorch et al. 1999). Neben diesen *in-vitro* Daten existieren zahlreiche Hinweise für die biologische Bedeutung dieser beiden Komplexe im Rahmen spezifischer Genregulation (Holstege et al. 1998; Biggar and Crabtree 1999; Sudarsanam et al. 1999).

### 2) Acetylierung der Core-Histon-Tails:

Wie bereits beschrieben, ist der allgemein reprimierende Einfluss des Chromatins auf eine Inhibierung der Interaktionen von Transkriptions-Komponenten mit der DNA zurückzuführen. Neben dem System des Nukleosomen-Remodeling hat sich ein zweiter Mechanismus entwickelt, durch den die Zugänglichkeit responsiver DNA-Elemente für DNA-bindende Faktoren reguliert werden kann:

Alle 4 Core-Histone können im Bereich ihrer N-terminalen Tail-Regionen posttranslational modifiziert werden. Die mittlerweile am besten charakterisierte Modifikation ist die Acetylierung konservierter Lysine. Diese Reaktion wird von sogenannten Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) katalysiert (Roth et al. 2001). In der Reaktion werden Acetyl-Gruppen vom Acetyl-CoA-Donor auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe der konservierten Lysine übertragen. Die jeweilige Rückreaktion wird innerhalb von Zellen von Histon-Deacetylase(n) (HDACs) ausgeführt.

Eine Fülle von Daten, die hauptsächlich innerhalb der letzten 10 Jahre generiert wurden, implizieren einen engen Zusammenhang von Histon-Acetylierung, Zugänglichkeit von Promotor-Elementen und differentieller Genregulation in eukaryontischen Lebewesen:

Histon-Acetylierung verringert die Affinität von Histon-Tails zur DNA, verändert die nukleosomale Konformation und führt *in-vitro* zu einer verbesserten Zugänglichkeit von Promotor-DNA-Abschnitten für Transkriptionsregulatoren (Norton et al. 1989; Hong et al. 1993; Lee et al. 1993; Vettese-Dadey et al. 1996).

Bei Untersuchungen zur Funktion von identifizierten HATs konnte 1998 zum ersten Mal gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität der HATs direkten Einfluss auf die Regulation von Genen *in-vivo* ausübt (Kuo et al. 1998; Martinez-Balbas et al. 1998; Wang et al. 1998).

Eine große Anzahl verschiedener HATs konnten mittlerweile identifiziert werden (Roth et al. 2001). Die Enzyme liegen in der Regel gebunden innerhalb größerer Proteinkomplexe vor. Obwohl für die Mehrzahl dieser Komplexe eine Funktion bei der Stimulation der Gentranskription aufgezeigt werden konnte, beeinflussen HATs auch andere zelluläre Prozesse wie z. B. RNA-Elongation und DNA-Replikation (Roth et al. 2001) und spielen vermutlich eine Rolle bei der Erkennung UV-geschädigter DNA (Brand et al. 2001).

Am besten charakterisiert sind mittlerweile die HAT-Komplexe, die als katalytische Untereinheit das erstmals in der Bäckerhefe aufgereinigte GCN5 oder das stark homologe (aber nicht orthologe) Protein PCAF, das nur in Säugetieren vorkommt, enthalten. Hierzu



gehören die Komplexe ADA und SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) aus der Bäckerhefe (Grant et al. 1998b), sowie der humane PCAF-Komplex (Ogryzko et al. 1998).

Auch die bereits beschriebenen Adapterproteine CBP/p300 weisen HAT-Aktivität auf. Ein gut fundiertes Modell ihrer Funktionsweise dokumentiert, wie über einen prototypischen Mechanismus die Histon-Acetylierung zu spezifischer Genregulation beiträgt:

Durch die große Anzahl von spezifischen Transkriptionsfaktoren, die physikalisch mit CBP/p300 interagieren können (Goodman and Smolik 2000), können diese Adaptoren Kontext- und Gen-spezifisch zu verschiedenen Promotoren rekrutiert werden. Im Bereich der Promotor-DNA werden Nukleosomen durch CBP/p300 acetyliert (Chen et al. 1999b). Sowohl die physikalische Assoziation mit dem Promotor, als auch die Erhöhung des Acetylierungsniveaus sind in diesem Fall transiente Prozesse (Chen et al. 1999b; Shang et al. 2000). Ein acetylierter Core-Promotorbereich ist Voraussetzung für die Ausbildung eines Präinitiationskomplexes aus generellen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Pol II, da die Zugänglichkeit des Promotors durch die Acetylierung steigt. Es gibt Hinweise, dass innerhalb derartiger Abläufe auch andere Substrate durch CBP/p300 acetyliert werden können (Chen et al. 1999b).

Durch Untersuchungen der letzten Jahre wird zunehmend deutlicher, dass ein hoher Acetylierungsgrad in Promotor-Bereichen in vielen Fällen nicht direkt mit dem Ausmaß an Gentranskription korreliert, sondern primär einen Zustand voraktivierten Chromatins darstellt, welches einen potentiell aktivierbaren Promotor beinhaltet. Dieser Zusammenhang wird im Englischen auch als „Potentiation of Chromatin“ oder „Priming“ bezeichnet (O'Neill and Turner 1995; Ford et al. 1996; Kramer et al. 1998; Francastel et al. 2000).

Wie bereits beschrieben, sind für die jeweiligen Rückreaktionen, den Deacetylierungsvorgängen an den Histonen, die HDACs verantwortlich. In Säugetierzellen werden die HDACs in zwei Familien unterteilt. Je nachdem zu welcher der zwei HDACs aus der Bäckerhefe, Rpd3 oder Hda1 die größere Homologie besteht, werden die Mitglieder der zwei Gruppen als Klasse 1- oder Klasse 2-HDACs bezeichnet (Knoepfler and Eisenman 1999).

Auch die HDACs liegen in Zellen in größeren Proteinkomplexen vor. Dies konnte zumindest für die beiden Klasse 1-Mitglieder HDAC-1 und HDAC-2 gezeigt werden. Zwei gut charakterisierte HDAC-Komplexe sind der Sin3-Komplex und der Mi-2- bzw. NuRD-Komplex (Tong et al. 1998; Xue et al. 1998). In beiden Fällen wurden jeweils sowohl HDAC-1 als auch HDAC-2 identifiziert und beide Komplexe vermitteln Genrepression.

Zusammen mit den Proteinen RbAP46 und –48 bilden die HDAC-Enzyme einen sogenannten „enzymatischen Kernkomplex“, der die Deacetylase-Aktivität im Falle beider Komplexe beinhaltet (Knoepfler and Eisenman 1999). Im Sin3-Komplex liegt dieser Kern mit den Proteinen Sin3A bzw. Sin3B, sowie zusätzlich den Proteinen SAP18 und SAP30 assoziiert vor. Bei Sin3 handelt es sich um molekulare Adapterproteine, für die Interaktionen mit einer Reihe verschiedener Transkriptionsfaktoren bzw. –Repressoren beschrieben wurden. In Analogie zur Situation bei den HAT-Komplexen, scheinen HDAC-Komplexe dieser Gruppe über die DNA-bindenden Faktoren zu den jeweiligen Zielpromotoren rekrutiert zu werden. In diesem Fall wird das Histon-Acetylierungsniveau durch Deacetylierung von Histonen lokal gesenkt, um Genaktivität zu inhibieren (Kadosh and Struhl 1998).

Der Mi-2/NuRD-Komplex beinhaltet neben der Deacetylase-Aktivität zusätzlich Nukleosomen-Remodeling-Aktivität. Die Proteinkomponente Mi-2 $\beta$  weist die zugrundeliegende Helikase/ATP-ase-Aktivität auf. Außerdem ist im Komplex mit MDB-3 ein Protein enthalten, welches spezifisch methylierte CpG DNA-Sequenzen erkennt und bindet (Bird and Wolffe 1999). Die Methylierung von CpG-reichen DNA-Abschnitten stellt einen Mechanismus dar, über den DNA-Bereiche transkriptionell inaktiviert werden können ( im Englischen: „Silencing“). Die Rekrutierung von Mi-2/NuRD oder eines verwandten Komplexes über ein MDB-Protein stellt den zugrundeliegenden Mechanismus dar, durch den die spezifische Genrepression in diesen Fällen vermittelt wird.

Acetylierungs- und Deacetylierungsvorgänge von Chromatin-Komponenten stellen sich als antagonistische Mechanismen zur Regulierung eukaryontischer Gene dar. Die verantwortlichen Enzyme, sowie die durch sie ausgelösten strukturellen Veränderungen an Promotoren dürfen jedoch nicht isoliert betrachtet werden. Ihre Wirkungsweise kann nur im Kontext des gesamten Genregulationsvorgangs verstanden werden. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass ein hohes Acetylierungsniveau in Promotorregionen noch nicht notwendigerweise aktive Gentranskription impliziert. Vielmehr scheinen Acetylierungsprozesse in Promotorbereichen in vielen Fällen nur einen notwendigen Teilschritt auf dem Weg zur vollen Geninduktion darzustellen. Entsprechend etablierte Modelle beschreiben daher einen Zwei-Stufen-Prozess der Genaktivierung: Einem als „Derepression“ bezeichneten Schritt, in dem das Chromatin im Promotorbereich aus einem hoch kondensierten und deacetylierten Zustand in einen Zustand verstärkter nukleosomaler Acetylierung und daher verbesserter Zugänglichkeit übergeht, folgt ein auch als „Echte Aktivierung“ bezeichneter Prozess. Erst im Rahmen dieses zweiten Vorgangs wird es vielen

Faktoren und dem RNA-Pol-II-Komplex möglich, physikalisch mit der DNA im Promotorbereich zu interagieren und schlussendlich mRNA-Synthese zu gewährleisten. Beim beschriebenen Zwei-Stufen-Modell der Genaktivierung stellt sich die Frage, durch welchen Mechanismus initial eine lokale Aktivierung des kondensierten Chromatins (also der erste Schritt) erfolgen kann, solange die Zugänglichkeit für DNA-bindende Regulatoren noch deutlich vermindert ist. In vielen beschriebenen Fällen besteht die Lösung dieses Problems in der Aufrechterhaltung kurzer Abschnitte gut zugänglichen Chromatins. Dies können DNA-Bindungsstellen innerhalb von Linker-Regionen oder größere konstitutiv Nukleosomen-freie Gebiete sein (Gaudreau et al. 1997; Agalioti et al. 2000). Diese Bereiche gewährleisten, dass Transkriptionsfaktoren in einem frühen Stadium des Aktivierungsprozesses mit der DNA wechselwirken können, um einen komplexen, zeitlich geordneten Ablauf der nächsten Schritte initial auszulösen. Im folgenden Prozess können Nukleosomen-Remodeling und HAT-Aktivitäten schrittweise zum Promotor rekrutiert werden, um das Chromatin im Core-Promotorbereich so zu modifizieren, dass RNA-Pol-II-Komplexe am Promotor etabliert werden können (Cosma et al. 1999; Agalioti et al. 2000).

### 2.1.6 Spezifische Steuerungsmechanismen bei der eukaryontischen Transkriptionsregulation

Die kombinatorische Vielfalt, die sich aus der großen Anzahl verschiedener spezifischer Transkriptionsfaktoren und der Anordnung unterschiedlicher Regulator-Elemente in Promotoren ergibt, leistet einen großen Beitrag zur Spezifität von Genregulation. In vielen Beispielen werden Transkriptionsfaktoren Gewebe-spezifisch exprimiert, damit auch die entsprechenden Zielgene streng Gewebe-spezifisch aktiviert werden können.

Innerhalb der hematopoetischen Zell-Differenzierung vollzieht sich die Spezifizierung ganzer Entwicklungslinien im Rahmen eines zeitlich exakt determinierten Genexpressionsprogramms. Für diese genau koordinierte Aktivierung zahlreicher Zelltyp-spezifischer Gene ist die Kooperativität von Zelltyp-spezifisch exprimierten Transkriptionsfaktoren verantwortlich (Lenny et al. 1997; Glimcher and Singh 1999).

Damit ein bestimmtes Gen induziert werden kann, müssen neben dem Vorhandensein aller kooperativ regulierenden spezifischen Transkriptionsfaktoren in der Zelle eine Reihe zusätzlicher Bedingungen erfüllt werden, die direkt diese Faktoren betreffen. Diese zusätzlichen Bedingungen können als eine weitere Möglichkeit des zellulären

Transkriptionsapparates angesehen werden, regulativ wirksam zu werden, bzw. die Intensität der transkriptionellen Antwort in diesem Fall zu modulieren. Derartige Steuerungen greifen beispielsweise auf der Ebene signalabhängig regulierbarer Translokation von Faktoren in den Zellkern (Scheidereit 1998).

Auch im Zellkern unterliegen Transkriptionsfaktoren der regulativen Kontrolle. Beispielsweise kann das DNA- Bindungspotential, die funktionelle Interaktion mit dem Polymerase-Komplex oder Kooperativität mit anderen Faktoren durch posttranslationelle Modifikationen moduliert werden (Kwok et al. 1994; Oelgeschlager et al. 1995; Gu and Roeder 1997; Patikoglou and Burley 1997; Radhakrishnan et al. 1997; Burley and Roeder 1998; Soutoglou et al. 2000).

Aus Experimenten zur Analyse des Transaktivierungspotentials von Faktoren (Transiente Transfektion, *In vitro*-Transkription,...) geht hervor, dass in den meisten Fällen eine experimentell herbeigeführte Erhöhung der Faktorkonzentration oder die artifizielle Verbindung mehrerer Regulator-Elemente hintereinander zu einer gesteigerten Transkriptionsstimulation führen. Möglicherweise dienen beispielsweise die in der Hefe identifizierten „geclustert“ vorliegenden Regulator-Elemente genau dem Zweck, eine erhöhte lokale Faktor-Konzentration im Bereich von Promotoren hervorzurufen, um die Transkriptionsrate zu erhöhen (Ptashne and Gann 1997).

Genau festgelegte Kombinationen spezifischer Transkriptionsfaktoren, die ihre reponsiven Elemente erkennen und bestimmte Promotoren spezifisch besetzen, stellen nur eine erste Ebene im Rahmen differentieller Genregulation dar. Das große Ausmaß an Variabilität, dass sich aus der kombinatorischen Vielfalt spezifischer Faktoren ergibt, wird durch eine selektive Kooperation mit spezifischen Adaptoren bzw. Kofaktoren noch einmal erweitert.

Für eine selektive Genaktivierung müssen spezifische Transkriptionsfaktoren kooperieren. Im Rahmen des sogenannten „Rekrutierungsmodells“ wird Kooperativität möglich: Die Aktivitäten der einzelnen Transkriptionsfaktoren sind auf das gleiche Ziel gerichtet. Dieses Ziel besteht diesem Modell zufolge in einer möglichst effizienten Rekrutierung der RNA-Pol II zum Zielpromotor (Ptashne and Gann 1997). Diese Rekrutierung findet aber in den meisten Fällen nicht direkt, sondern über die wechselseitigen physikalischen Interaktionen mit den Adaptoren statt. Auf diese Weise können auch synergistische Effekte vermittelt werden und es wird ein Beitrag zu einer großen Auslenkbarkeit von Induktionsprozessen geliefert (Carey 1998).

In den großen Kofaktor-Komplexen TFIID und Mediator sind jeweils auch inhibierende Komponenten oder Subkomplexe identifiziert worden, die zum Teil hoch Gen-spezifisch Repression vermitteln (Bjorklund and Kim 1996; Holstege et al. 1998; Liu et al. 1998). Neben der Potenz solcher Kofaktoren, Gene in einem inaktiven Zustand zu halten, erweitern solche Elemente die potentielle Auslenkbarkeit der transkriptionellen Antwort bzw. die Dynamik transkriptioneller Prozesse.

Zellen müssen in der Lage sein, unter veränderten Bedingungen mitunter einen sehr schnellen Wechsel der Expressionsmuster von Genen zu koordinieren. Durch mehrere Arbeiten konnte innerhalb der letzten drei Jahre ein Mechanismus aufgezeigt werden, der vermutlich ein schnelles Ausschalten von Genen bewirken kann. In mehreren beobachteten Fällen scheint die Stabilität DNA-bindender Faktoren am Zielpromotor reziprok von deren Transaktivierungspotential abzuhängen (Molinari et al. 1999; Salghetti et al. 1999). Ein Ubiquitin-vermittelter Abbau des Transkriptionsfaktors sorgt in den analysierten Fällen sofort nach der initialen Aktivierung für den Abbau des spezifischen Aktivators (Thomas and Tyers 2000; Chi et al. 2001; Tansey 2001).

Obwohl immer noch viele Aspekte eukaryontischer Genregulation mit einem RNA-Pol-II Rekrutierungsmodell kompatibel sind, so zeigt sich bei der nächsten „Dimension“ in Form der regulatorischen Mechanismen auf Chromatin-Ebene, dass für die physikalische Formation eines transkriptionskompetenten Initiationskomplexes im Chromatin-Kontext noch weitaus komplexere Mechanismen erforderlich sind, als sie das einfache Rekrutierungsmodell impliziert. Hierdurch entstehen aber andererseits noch vielschichtigere Regulationsmöglichkeiten.

Das bisher beschriebene Bild der Genregulation im Eukaryonten kann auf folgende Weise schematisiert wiedergegeben werden: Für die spezifische Regulation eines Gens müssen die essentiellen Einzelkomponenten (Proteine) vorhanden sein, adäquat posttranslational modifiziert worden sein, zum richtigen Zeitpunkt zum Promotor rekrutiert werden, um durch enzymatische Aktivität oder die Gewährleistung physikalischer Interaktionen kooperativ zur Steuerung der Genaktivität beizutragen.

Viele Teilschritte dieses allgemeinen Ablaufs können signalabhängig beeinflusst bzw. gesteuert werden. Die weitaus umfangreichste Steuerungsmöglichkeit ergibt sich jedoch direkt am Genpromotor, genauer an der Chromatinstruktur im Promotorbereich. Durch das intrinsische Potential des Chromatins, variable Zugänglichkeit zu DNA-Abschnitten vermitteln zu können, bleibt die Etablierung eines transkriptionskompetenten RNA-Pol-II-

Komplexes an jeder Stelle, an der Einzelkomponenten notwendigerweise mit Promotor-DNA interagieren müssen, regulierbar.

Für kein anderes Protein sind in einer Region vergleichbarer Größe (ca. 30 Aminosäuren) so viele unterschiedliche posttranslationale Modifikationsmöglichkeiten beschrieben worden, wie für den Bereich der N-terminalen Histon-Tails. Neben der bereits ausführlich beschriebenen Acetylierung wurden Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinylierung und ADP-Ribosylierung dokumentiert. Es beginnt sich abzuzeichnen, dass neben den Acetylierungsvorgängen auch andere dieser kovalenten Modifikationen direkt an der Genregulation beteiligt sind (Strahl and Allis 2000). Beispielsweise korreliert die spezifische Phosphorylierung des Serins 10 am Histon H3 direkt mit der Aktivierung der sogenannten „immediate-early“ Gene c-Jun und c-Fos, sowie des c-Myc Gens durch mitogene Stimuli. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass verschiedene HATs das Histon H3 mit erhöhter Effizienz acetylieren, wenn H3 am Serin 10 phosphoryliert ist und das beide Prozesse bei der Regulation spezifischer Zielgene *in-vivo* funktionell eng gekoppelt sind (Cheung et al. 2000; Lo et al. 2000).

Auf der Grundlage umfangreicher Daten wurde ein entgegengesetzt gerichteter Prozess postuliert, der zu einer transkriptionellen Repression durch Chromatinkondensation führt, aber ebenfalls am Histon-Tail von H3 initiiert wird (Rea et al. 2000; Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001): Die dem Serin 10 in H3 unmittelbar benachbarte Aminosäure Lysin 9 kann durch das Enzym SUV39H1 methyliert werden. Diese spezifische Modifikation ermöglicht dem Protein HP-1 (Heterochromatin Protein 1) die physikalische Interaktion mit H3. Innerhalb dieser Bereiche wird Chromatin-Kondensation induziert und damit Genrepression vermittelt. Möglicherweise führt eine Art Kettenreaktion entlang des Chromatins zu einer Ausbreitung konstitutiv reprimierter Chromatinabschnitte (Heterochromatin).

Zahlreiche Publikationen der letzten drei bis vier Jahre liefern weitere Beispiele für die entscheidende Funktion der posttranslationalen Modifikationen der Histon-Tails für die Transkriptionsregulation und dessen Steuerung durch aktivierte Signalwege. Die Histon-Tail-Regionen stellen sich als Adapter für unterschiedliche Signalwege dar, und werden in eng benachbarten Regionen Kontext-spezifisch modifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass einige dieser Prozesse unmittelbare Voraussetzung für Folgeprozesse darstellen und dass sich verschiedene andere Modifikationen gegenseitig ausschließen.

Unter Verweis auf den im Jahre 2000 erstmals eingeführten Begriff „Histon-Code“ (Strahl and Allis 2000) kann abschließend noch einmal die Bedeutung des Chromatins als fundamentale Komponente eukaryontischer Genregulation herausgestellt werden:

Neben dem Vorhandensein und dem adäquaten Zustand transkriptioneller Regulatoren müssen diese Einzelkomponenten in einem zeitlich und funktionell hoch geordneten Ablauf schrittweise zum Zielpromotor gelangen. Genau die Ausbildung der dann erforderlichen physikalischen Kontakte wird signalabhängig über die Chromatinstruktur und mittelbar über den akuten posttranslationellen Status der Histone reguliert.

Die Autoren verwenden den Begriff um zu verdeutlichen, dass bestimmte Kombinationen entsprechender Histon-Modifikationen ganz genau definierte biologische Programme (z.B. Genaktivierung oder –Inaktivierung) einleiten. Vor diesem Hintergrund sind nicht einzelne Modifikationen aussagekräftig, sondern das Veränderungsmuster an den Histonen in seiner Gesamtheit, dass wie eine Art Code durch spezifisch bindende Faktoren “entziffert“ werden kann.

### ***Zusammenfassung (Die Regulation der Gentranskription):***

*Im vollständig entwickelten, vielzelligen Organismus sind die Individualität und der physiologische Zustand eines jeden Zelltyps über ein charakteristisches genomweites Expressionsmuster determiniert. Da jede Zelle des Vielzelllers jedoch mit dem identischen genetischen Material ausgestattet ist, bedarf es eines hoch selektiven Regulationssystems um in jedem Zelltyp die Aktivierung unterschiedlicher Gengruppen gewährleisten zu können. Ein außerordentlich vielschichtiges System aus basalem Transkriptionskomplex, spezifischen Transkriptionsfaktoren und Adaptoren (Kofaktoren), die sich Kontext-spezifisch und vor allem Promotor-spezifisch formieren, hat sich innerhalb von Vielzellern ausgebildet. Es handelt sich bei den einzelnen Komponenten nicht um starre Gebilde, sondern vielmehr in allen Fällen um immer wieder Kontext-abhängig umgruppierbare Module. Diese Module müssen in einer zeitlich und lokal ganz genau aufeinander, aber auch auf den jeweils betrachteten Zielpromotor abgestimmten Weise kooperativ interagieren. An den meisten Stellen physikalischer Interaktionen kann dann durch das zelluläre Steuerungssystem bzw. Signal-induziert der Gesamtprozess regulativ gesteuert werden bzw. eine Feinabstimmung der jeweils erforderlichen transkriptionellen Aktivität erfolgen.*

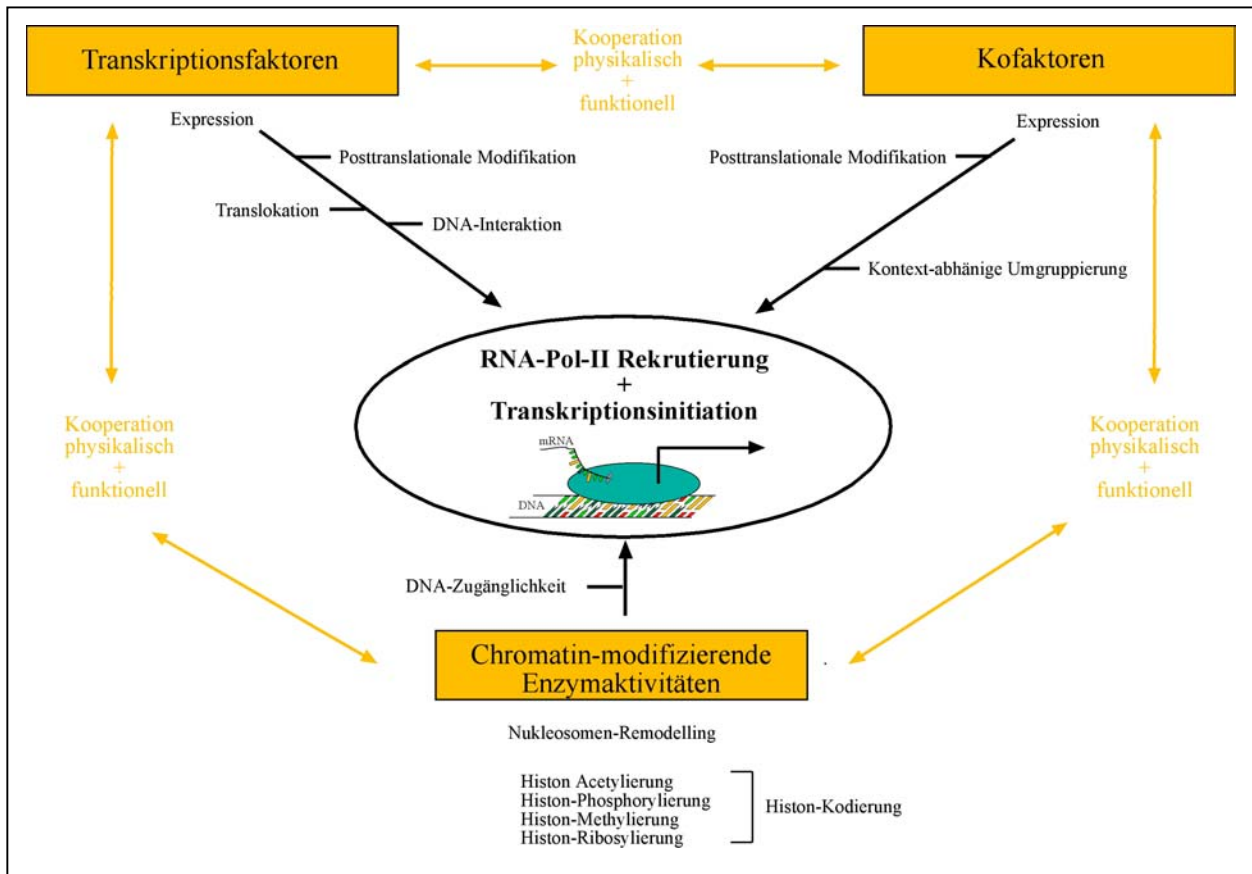
*Das Steuerungssystem der eukaryontischen Zelle muss unter wechselnden Umständen an Tausenden von Genloci ständig adäquate Expressionsprofile hervorrufen, damit die Zelle und vor allem der Gesamtorganismus überlebensfähig bleibt.*

*Durch das bei den Eukaryonten evolutionär entstandene System einer zusätzlichen Verpackung oder „Verschlüsselung“ von Genpromotoren in Form von Chromatin ist gewährleistet, dass nur durch einen ganz genau definierten Ablauf eines Regulationsprozesses Gentranskription stattfindet. An allen Stellen, an denen Einzelkomponenten notwendigerweise mit Promotor-DNA interagieren müssen, bleibt das An- und Abschalten von Genen Kontext-spezifisch regulierbar, weil eben auch der Grad der Zugänglichkeit zur DNA an dieser kritischen Stelle hoch variabel gestaltet und reguliert werden kann.*

*Aus einem etwas veränderten Blickwinkel kann das Chromatin als eine Art Verrechnungsinstanz angesehen werden. Ähnlich einer Nervenzelle im Bereich synaptischer Verschaltungen besteht die Hauptfunktion des Chromatins in der Festlegung einer resultierenden biologischen Aktivität aus unterschiedlichen und zum Teil entgegengesetzt gerichteten Einzelpotentialen. Im Fall der Genregulation muss aus der Summe der positiven und negativen Faktoren und den jeweils aktivierten Signalwegen (bzw. deren Auswirkungen auf Faktoren und Chromatinstruktur) ein adäquater Aktivierungsgrad der jeweiligen Gene eingestellt werden. Aufgrund der beschriebenen vielfältigen Akzeptorstellen für Signalwege im Bereich der Histon-Tails und dem daraus resultierenden Potential, die DNA-Zugänglichkeit in weitem Umfang regulieren zu können, eignet sich das Chromatin hierfür in ausgezeichneter Weise.*



# EINLEITUNG



**Abbildung 1 Die Regulation der Gentranskription:** Das zentrale Ereignis der Gentranskription ist die Rekrutierung der RNA-Polymerase-II zum jeweiligen Genpromotor. Die Rekrutierung wird im kooperativen Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren und Chromatin-modifizierenden Enzymaktivitäten herbeigeführt. Während die dicken schwarzen Pfeile den Einfluss der drei Hauptkomponenten auf die RNA-Pol-II-Rekrutierung anzeigen, sind jeweils an den eingezeichneten Verzweigungen einige der Ebenen eingetragen, auf denen regulativ eingegriffen werden kann. Der Übersichtlichkeit halber sind die Einflussnahmen der drei Hauptkomponenten untereinander nur sehr allgemein dargestellt (orange Pfeile und Texte). Der zeitlichen Dynamik, in welcher entsprechende Regulationsprozesse ablaufen, wird die Abbildung nicht gerecht. Wie auch ausführlich im Text beschrieben, sind mehrere Beispiele bekannt, aus denen sich eine prototypische Modellvorstellung zur Genaktivierung ableiten lässt: In diesem Modell ist ein Molekül erforderlich, welches eine Serie von zeitlich und funktionell koordinierten Prozessen initial auslöst. Hierbei handelt es sich um einen spezifischen Transkriptionsfaktor, der im Zellkern vorhanden- und eventuell adäquat posttranslational modifiziert sein muß. Dieser Faktor bindet innerhalb eines konstitutiv zugänglichen DNA-Bereiches im Zielpromotor. Im nächsten Schritt werden über diese Interaktion Chromatin-modifizierende Komplexe zum Promotor rekrutiert. Die enzymatischen Aktivitäten dieser Komplexe wirken auf die Chromatinstruktur ein und erhöhen die Zugänglichkeit größerer DNA-Abschnitte im Promotor. Jetzt werden weitere Faktoren und Kofaktoren rekrutiert damit letzten Endes ein transkriptionskompetenter RNA-Pol-II-Komplex etabliert werden kann.

## 2.2 Das Myc/Max/Mad-Netzwerk spezifischer Transkriptionsfaktoren

### ***Einführung (Das Myc/Max/Mad-Netzwerk spezifischer Transkriptionsfaktoren):***

*Wie bereits ausführlich beschrieben worden ist, werden Individualität und Differenzierungsstatus eines Zelltyps intern vom genomweiten Expressionsprofil bestimmt. Die Individualität leitet sich aus dem Muster aktivierter Zelltyp-spezifischer Gene ab. Der unmittelbare Zustand einer Zelle kann darüber hinaus noch präziser beschrieben werden: Zu jedem gegebenen Zeitpunkt wird die Expression von Genen gesteuert, die, zum Teil Zelltyp-unabhängig, das unmittelbare Schicksal einer Zelle bestimmen. Prinzipiell ergeben sich für Zellen die Möglichkeiten 1) des Wachstums bzw. der Zellteilung (Fortschreiten im Zellzyklus), 2) der Zelldifferenzierung, 3) eines Ruhezustandes (G0-Phase) oder 4) des programmierten Zelltodes (Apoptose). Alle diese Prozesse werden nicht von einzelnen Genen, sondern von hierarchisch organisierten Expressionsprogrammen gesteuert. Bei der Koordination dieser fundamentalen biologischen Prozesse nehmen die Mitglieder des sogenannten Myc/Max/Mad-Netzwerkes Schlüsselfunktionen ein (Henriksson and Luscher 1996; Grandori et al. 2000).*

### 2.2.1 Die Mitglieder des Netzwerkes und ihre biologischen Funktionen

Die Mitglieder der Myc/Max/Mad-Familie sind spezifische Transkriptionsfaktoren. Sie enthalten eine charakteristische basische Helix-Loop-Helix Leucin-Zipper Domäne (bHLHZip). Die basische Region vermittelt sequenzspezifisch den physikalischen Kontakt zur DNA. Das entsprechende DNA-Element weist die Konsensus-Sequenz CACGTG auf und wird als E-Box bezeichnet. Das zentrale Protein des Netzwerkes ist Max, das über die HLHZip-Region sowohl Homodimere, als auch Heterodimere mit anderen Komponenten ausbildet. Abhängig vom Interaktionspartner resultieren transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren. Aktivatoren entstehen wenn Max- und Myc-Proteine heterodimerisieren. In Säugetieren kommen drei paraloge Myc Proteine vor: das Proto-Onkogenprodukt c-Myc, sowie L-Myc und N-Myc.

Auf der anderen Seite stehen die Mad-Proteine: Mad1, Mxi1, Mad3 und Mad4. Diese Faktoren vermitteln Repression, wenn sie mit Max heterodimerisieren. Anfang der (19) 90-er Jahre wurde ein allgemeiner Mechanismus postuliert, wonach sich die Aktivierung von Zielgenen über einen molekularen Austausch von Mad/Max- zu Myc/Max-Komplexen

vollzieht (Ayer and Eisenman 1993; Ayer et al. 1993). Mittlerweile ist allgemein akzeptiert, dass dieses Modell nur die Regulation eines Teils von Zielgenen angemessen beschreibt.

Myc- und Mad-Proteine vermitteln entgegengesetzt gerichtete biologische Prozesse. In erster Näherung stimulieren Myc-Proteine das Wachstum von Zellen, während Mad-Proteine Wachstum inhibieren und an Differenzierungsprozessen beteiligt sind.

Da die beiden Netzwerkkomponenten c-Myc und Mad1 am besten charakterisiert sind und viele der im folgenden beschriebenen Effekte durch die paralogen Vertreter in vergleichbarer Weise ausgelöst werden, werden in den nächsten Absätzen ausschließlich Daten über diese beiden prototypischen Vertreter der Untergruppen zitiert.

Die Expression von c-Myc wird durch eine Vielzahl mitogener Stimuli induziert (Grandori et al. 2000). In der Regel kann c-Myc in wachsenden bzw. proliferierenden Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu wird Mad1 in verschiedenen Differenzierungsprozessen induziert (Sommer et al. 1998; Pulverer et al. 2000). Der für derartige Prozesse notwendige „Austritt“ aus dem Zellzyklus, sowie die Induktion der terminalen Differenzierung kann durch die Überexpression von c-Myc wirksam inhibiert werden (Grandori et al. 2000).

Eine verstärkte c-Myc Expression führt nicht unter allen Umständen zum Wachstum von Zellen. Fehlen sogenannte „Überlebensfaktoren“, so löst die Überexpression von c-Myc neben Wachstum auch Apoptose aus (Askew et al. 1993; Prendergast 1999). Auf der anderen Seite kann durch exogene Mad1-Expression Apoptose wirksam inhibiert werden (Gehring et al. 2000). Das Potential von c-Myc, neben Wachstum unter bestimmten Bedingungen auch Apoptose auslösen zu können, ist von einigen Autoren als zellulärer Schutzmechanismus interpretiert worden, welcher den dominanten Einfluss von Myc-Proteinen auf Zellwachstum begrenzt (Grandori et al. 2000; Luscher 2001). Vor dem Hintergrund, dass in einer Vielzahl von Tumoren fehlregulierte, meist verstärkte Myc-Expression beobachtet werden kann, ist ein derartiger Mechanismus physiologisch sinnvoll.

Ein funktioneller Antagonismus von c-Myc und Mad1 zeigt sich auch im Potential zur Transformation von Zellen. Während c-Myc in Kooperation mit aktiviertem H-Ras sehr effizient Zellen transformieren kann, wird dieses Potential durch Koexpression von Mad1 unterdrückt (Henriksson and Luscher 1996).

### 2.2.2 Genregulation durch Mitglieder des Myc/Max/Mad-Netzwerkes

Dem dargestellten funktionellen Antagonismus zwischen c-Myc und Mad1 entspricht ein Antagonismus auf der molekularen Ebene. Wie bereits beschrieben, können sich Myc/Max-Komplexe als Aktivatoren oder Mad/Max-Komplexe als Repressoren ausbilden. Da der Aktivierungs- bzw. Repressionsgrad durch derartige Komplexe in transienten Transfektionsexperimenten gering ist, wurde postuliert, dass diese Komplexe den Transkriptionsprozess primär über Veränderungen in der Chromatinstruktur beeinflussen (Amati et al. 2001; Eisenman 2001). Zur Unterstützung dieser These gibt es eine Reihe experimenteller Befunde: Für Mad1 konnte gezeigt werden, dass dieser Faktor *in vivo* direkt mit Sin3 interagiert (Sommer et al. 1997). Über diese Interaktion formieren sich in Zellen HDAC-Komplexe (Laherty et al. 1997) (siehe Abschnitt 2.1.5). Die enzymatische Aktivität dieser Komplexe ist entscheidend für durch Mad1 hervorgerufene biologische Effekte, wie beispielsweise die Blockierung des Zellzyklus innerhalb der S-Phase oder das inhibitorische Potential von Mad1 in Kolonie-Formierungs-Experimenten. Werden Zellen mit dem Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) behandelt, so verliert Mad1 seine repressorische Aktivität und damit das beschriebene Potential, die beschriebenen biologischen Prozesse zu beeinflussen (Laherty et al. 1997; Sommer et al. 1997; Gehring et al. 2000).

Für c-Myc konnte eine physikalische Interaktion mit dem Protein TRRAP (Transformation / Transcription domain-associated protein) beschrieben werden (McMahon et al. 1998). TRRAP ist ein ca. 400 kD grosses Protein, welches Homologie zur ATM/PI3-Kinasefamilie aufweist. In vielen der bislang identifizierten HAT-Komplexe (z. B. SAGA, NuA4, PCAF/GCN5, TFTC, siehe auch Abschnitt 2.1.5) konnte TRRAP bzw. das Ortholog aus der Bäckerhefe (Tra 1) als integrierter Bestandteil nachgewiesen werden (Brand et al. 1999; Roth et al. 2001). Durch Immunpräzipitations-Experimente konnte gezeigt werden, dass TRRAP mit der HAT GCN5 sowie mit c-Myc und Max in einem Proteinkomplex vorliegt (McMahon et al. 2000). Außerdem kann nach spezifischer c-Myc- oder Max-IP endogene Histonacetyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden.

In Analogie zur Situation bei Mad1 sind eine Reihe der durch c-Myc hervorgerufenen biologischen Effekte direkt von der Interaktion mit TRRAP und der korekrutierten HAT-Aktivität abhängig. Wird beispielsweise eine kurze Region innerhalb der c-Myc Transaktivierungsdomäne, die sogenannte Myc-Box II, deletiert, so kann die physikalische Interaktion mit TRRAP unterbunden werden. Dies führt zum kompletten Verlust des transformatorischen Potentials von c-Myc (McMahon et al. 2000). Ein vergleichbarer Effekt

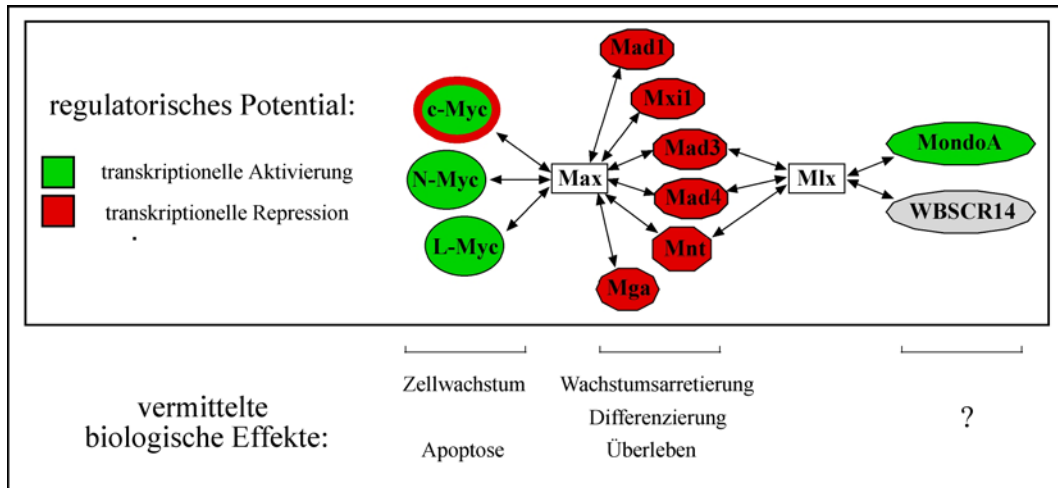
resultiert im klassischen Transformationsversuch mit c-Myc und H-Ras, wenn eine katalytisch inaktive Mutante der HAT GCN5 kotransfiziert wird. Das Transformationspotential nimmt drastisch ab.

Aus den oben beschriebenen Daten resultiert ein Modell, wonach über die spezifischen DNA-Bindungseigenschaften von Myc/Max- bzw. Mad/Max-Komplexen HAT- bzw. HDAC-Aktivitäten zu Zielpromotoren rekrutiert werden können, um auf diese Weise aktivierend oder inhibierend auf Gentranskription einzuwirken.

Dieses Modell zweier Gruppen von Faktoren, die in streng antagonistischer Weise Transkription identischer Zielgene über E-Boxen regulieren, hat nur für einen Teil der untersuchten Regulationsprozesse Gültigkeit. Mittlerweile ist bekannt, dass sich die Interaktionen innerhalb des Netzwerkes und die Auswirkungen auf transkriptionelle Prozesse vielschichtiger darstellen als zuerst angenommen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Myc/Max-Komplexe E-Box-unabhängig Transkription über Initiator-Elemente von Zielgenen steuern können. Im Fall des *p15 INK4b*-Promotors führt die Assoziation von Myc/Max mit dem Protein Miz-1 am Initiator-Element zu aktiver Genrepression (Staller et al. 2001). c-Myc agiert in diesem Kontext also als Repressor.

Eine kategorische Trennung von aktivierenden Myc-Komponenten und reprimierenden Mad-Mitgliedern des Netzwerkes kann auch aus einem zweiten Grund nicht streng aufrecht erhalten werden: Innerhalb der letzten Jahre wurde das Netzwerk durch die Identifizierung weiterer E-Box-bindender Faktoren erweitert. Hierzu gehören Mnt und Mga, zwei Repressoren, die mit Max interagieren können (Hurlin et al. 1997; Hurlin et al. 1999).

Ein weiteres Protein, das strukturell und funktionell mit Max verwandt ist, wurde kürzlich entdeckt. Es handelt sich um Mlx, einen Faktor, der im Gegensatz zu Max nur mit bestimmten Repressoren der Mad-Untergruppe und nicht mit Myc-Proteinen heterodimerisiert (Billin et al. 1999; Meroni et al. 2000). MondoA und WBSCR14 sind die vorerst neusten Mitglieder des Netzwerkes (Billin et al. 1999; Cairo et al. 2001). Sie bilden mit Mlx heterodimere Komplexe aus. Im Fall von MondoA wurde eine Funktion als Aktivator beschrieben. In der Abbildung 2, Seite 25, sind die bislang identifizierter Mitglieder des Netzwerkes und, soweit bekannt, physiologische Funktionen und regulatorische Potentiale angegeben/abgebildet.



**Abbildung 2 Die Myc/Max/Mad-Familie von Transkriptionsfaktoren:** Dargestellt sind die bislang identifizierten Mitglieder des Myc/Max/Mad-Netzwerkes sowie ihre physiologischen Funktionen. Das regulatorische Potential und die physiologische Funktion des Faktors WBSCR 14 (Grau unterlegt) sind bislang nicht bekannt.

**Zusammenfassung (Das Myc/Max/Mad-Netzwerk spezifischer Transkriptionsfaktoren):**

*c-Myc und Mad1 stellen die prototypischen Vertreter der beiden Seiten des Myc/Max/Mad-Netzwerkes dar. Durch diese Transkriptionsfaktoren werden über die Steuerung von Zielgenen elementare biologische Prozesse wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Transformation und Apoptose reguliert. Diese Steuerung erfolgt in antagonistischer Weise. Während c-Myc Zellwachstum stimuliert und unter bestimmten Bedingungen Zellen transformieren oder Apoptose auslösen kann, werden alle diese Prozesse durch Mad1 inhibiert. Dem beschriebenen Antagonismus entspricht auf der molekularen Ebene ein entgegengesetzt gerichtetes regulatorisches Potentia: c-Myc bildet Aktivator-Komplexe aus und kooperiert mit HATs, über Mad1 werden HDAC-Komplexe formiert und es entstehen Repressoren. Während für die paralogen Vertreter des Netzwerkes (die weiteren Myc- und Mad-Proteine) ähnliche Mechanismen postuliert werden können, stellt sich aufgrund neuerer Untersuchungen ein erweitertes und vielschichtigeres Myc/Max/Mad-Netzwerk dar. Die Identifizierung eines weiteren zentralen Heterodimerisierungspartners, Mlx, zusätzliche Aktivatoren und Repressoren, sowie die Identifizierung eines Repressionsmechanismus durch c-Myc über Initiator-Elemente verdeutlichen: Ein großer Teil der Zusammenhänge im Rahmen der Kooperation einzelner Netzwerk-Mitglieder ist noch weitgehend unbekannt.*

## 2.3 Zellzyklusregulation durch c-Myc

### **Einführung (Zellzyklusregulation durch c-Myc):**

*Im Abschnitt 2.2 ist beschrieben worden, dass das unmittelbare Schicksal einer Zelle durch zeitlich und hierarchisch geordnete Genexpressionsprogramme gesteuert wird. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Steuerung des Wachstums von Zellen im Rahmen der Zellzyklusregulation. Wachstum und Zellteilung können im Rahmen von vier aufeinander folgenden Zellzyklusphasen, G1, S, G2 und M, als Kreisprozess beschrieben werden. M bezeichnet die Phase der mitotischen Zellteilung und S die Phase der semikonservativen DNA-Replikation. Dazwischen liegen die G1- und die G2-Phase, in denen Wachstums- und Stoffwechselprozesse und die Vorbereitung auf die jeweils nachfolgende Zellzyklusphase im Vordergrund stehen. Ein entscheidender Punkt, der auch als Restriktionspunkt R bezeichnet wird, markiert den Übergang von der G1- zur S-Phase. Wird dieser Punkt überschritten, so wird das Genexpressionsprogramm für die DNA-Replikation initiiert und die Zelle tritt „unwiderruflich“ in die S-Phase ein. Die „Entscheidung“ in einen neuen Zyklus von DNA-Verdopplung und anschließender Zellteilung einzutreten, wird an dieser Stelle getroffen. Gleichzeitig fällt die Entscheidung gegen die alternativen Optionen (Ruhezustand, Differenzierung, Apoptose). Da hier also das unmittelbare Zellschicksal determiniert wird, muss die Zelle bei diesem Entscheidungsprozess ihre Umgebung, genauer die Nährstoffsituation und das Vorhandensein von extrazellulären Signalmolekülen einbeziehen. Zusätzlich muss sichergestellt sein, dass keine Schäden bzw. Veränderungen innerhalb der DNA vorliegen, die bei einem Replikationsprozess an zukünftige Zellgenerationen weitergegeben würden. Aus diesen Gründen bedarf der Ablauf der G1-Phase und der Übergang zur S-Phase einer genauen Regulation. An dieser Regulation ist der Transkriptionsfaktor c-Myc maßgeblich beteiligt.*

### 2.3.1 Die Regulation des Übergangs von der G1- zur S-Phase

Zellen treten nur genau dann in die S-Phase des Zellzyklus ein, wenn bestimmte Gruppen von Genen aktiviert werden. Hierzu gehören Gene, die direkt Zellzyklusregulation steuern, wie beispielsweise *Zyklin E* und *Zyklin A*. Zusätzlich wird die Expression von Genen erforderlich, welche am Prozess der DNA-Replikation beteiligt sind, wie zum Beispiel das *DNA-Polymerase alpha-*, das *DHFR (Dehydrofolat Reduktase)*-Gen und eine Reihe weiterer Gene

(Amati et al. 1998; Takahashi et al. 2000; Wells et al. 2000). Alle diese Gene werden primär durch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie reguliert. E2F-Faktoren bilden mit den sogenannten Pocket-Proteinen Komplexe, welche die beschriebenen „S-Phase-Gene“ aktiv reprimieren (Harbour and Dean 2000). Werden die Pocket-Proteine durch intensive Phosphorylierungsprozesse modifiziert, so wird die Interaktion mit den E2F-Faktoren unterbunden. Die E2F-Faktoren werden hierdurch zu Aktivatoren und induzieren Transkription der beschriebenen „S-Phase-Gene“.

Die beschriebenen Phosphorylierungsprozesse an den Pocket-Proteinen stellen einen zentralen Punkt innerhalb der Zellzyklusregulation dar. Ein höchst komplexes System aus unterschiedlichen Gruppen von Molekülen steuert Ausmaß und zeitlichen Verlauf dieser Phosphorylierungsvorgänge (Sherr and Roberts 1999). Die Reaktionen werden von drei sogenannten Zyklin-abhängigen Kinasen (im englischen: cyclin dependent kinases), CDK2, CDK4 und CDK6, katalysiert. Damit diese Kinasen aktiv werden können, müssen in Zellen folgende Bedingungen erfüllt sein: 1) Einige der CDKs müssen durch einen spezifischen Dephosphorylierungsprozess durch die Phosphatase Cdc25A aktiviert werden, 2) ein zusätzlicher Aktivierungsschritt erfolgt über eine Phosphorylierung der CDKs durch sogenannte CDK activating kinases (CAKs), 3) spezifische Kofaktoren, bestimmte Zykline, müssen gebildet werden und einen Komplex mit den CDKs ausbilden, um diese zu aktivieren und 4) spezifische CDK-inhibitoren (CKIs), die sich in zwei Gruppen, die INK4- Gruppe (CKI<sub>INK4</sub>) und die CIP/KIP-Gruppe (CKI<sub>CIP/KIP</sub>) zusammenfassen lassen, müssen inaktiviert werden (Kaldis, 1999)(Sherr and Roberts 1999).

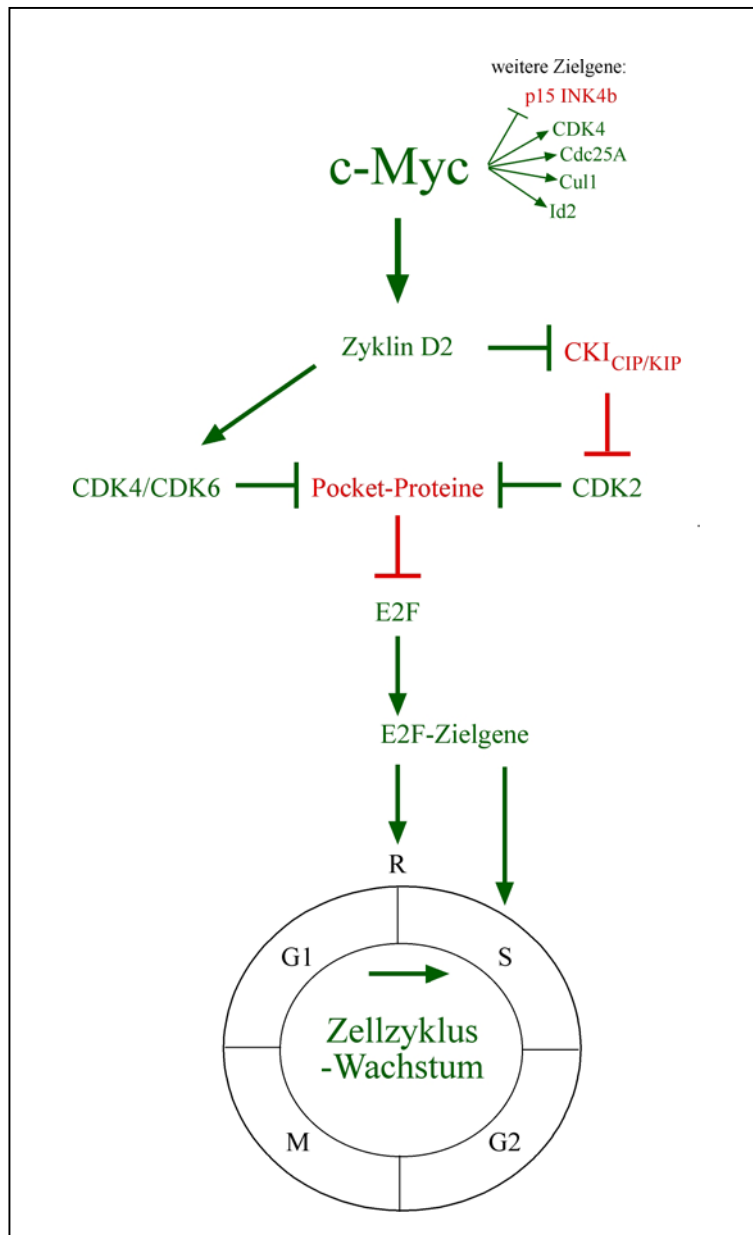
### 2.3.2 Der Transkriptionsfaktor c-Myc als Vermittler zwischen externen Signalen und Zellwachstumsverhalten

Durch die Regulation bestimmter Zielgene ist der Transkriptionsfaktor c-Myc in der Lage, die im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Prozesse grundlegend zu beeinflussen (Amati et al. 1998; Bouchard et al. 1998).

Da die Regulation der Aktivität von c-Myc in erster Linie durch Wachstumsfaktoren und externe Signalmoleküle erfolgt, wird c-Myc als entscheidende Vermittlungsstelle zwischen externen Bedingungen und dem resultierenden individuellen Wachstumsverhalten von Zellen angesehen (Grandori et al. 2000; Luscher 2001). Die Aktivität dieses Faktor dient Zellen



dazu, unter Einbeziehung externer Signale, wichtige Entscheidungen in bezug auf das unmittelbare Zellschicksal zu treffen.



**Abbildung 3 c-Myc und Zellzyklus-Kontrolle:** Der Transkriptionsfaktor c-Myc stimuliert zelluläres Wachstumsverhalten über die transkriptionelle Steuerung kritischer Zielgene. Alle 6 der im oberen Teil abgebildeten Gene werden durch c-Myc transkriptionell reguliert und beeinflussen wesentliche Abläufe bei der Zellzyklus-Regulation. Detailliert aufgezeigt ist der Mechanismus, über den die Induktion von Zyklin D2 zum „Voranschreiten“ im Zellzyklus führt. Faktoren, die Zellzyklus-Wachstum stimulieren sind grün- inhibitorisch wirkende Komponenten sind rot dargestellt. Pfeilspitzen deuten eine positive Beeinflussung der benachbarten Komponente an, Pfeilenden kennzeichnen eine inhibitorische Beeinflussung. Die dargestellten Zusammenhänge sind im Text beschrieben.

In der Abbildung 3, Seite 28, sind die beschriebenen Zusammenhänge der Steuerung des Zellzyklus durch c-Myc vereinfacht und grob schematisiert wiedergegeben. Da nur die Regulation des *Zyklin D2*-Gens Inhalt der vorliegenden Arbeit ist, wird im folgenden nicht weiter auf die anderen der im Schema abgebildeten c-Myc Zielgene eingegangen.

### 2.3.3 *Zyklin D2* als c-Myc-Zielgen

Das *Zyklin D2*-Gen stellt ein umfangreich charakterisiertes c-Myc Zielgen dar. Es konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass eine Aktivierung bzw. Überexpression von c-Myc eine Aktivierung des endogenen *Zyklin D2*-Gens bewirkt (Dey et al. 2000; Bouchard et al. 2001). In transienten Transfektionsexperimenten kann im murinen System ein *Zyklin D2*-Reporterkonstrukt durch Mad1 reprimiert werden. Diese Repression wird durch Kotransfektion mit c-Myc aufgehoben (die Autoren sprechen in diesem Zusammenhang von einer Derepression des Gens durch c-Myc) (Bouchard et al. 1999).

Im Rahmen der Steuerung des Zellzyklus durch c-Myc erfüllt eine zeitlich exakt koordinierte Aktivierung des *Zyklin D2*-Gens zwei wesentliche Aufgaben: 1) Das kodierte Protein Zyklin D2 dient sowohl CDK4, als auch CDK6 als Kofaktor. Zum Zeitpunkt, wenn in Zellen der Übergang von der G1- zur S-Phase „vorbereitet“ wird, vermittelt die ansteigende Zyklin D2-Konzentration eine erhöhte CKD4/CDK6-Aktivität und führt damit zu einem erhöhten Potential für die Phosphorylierung von Pocket-Proteinen. 2) Es wurde gezeigt, dass ein Teil des zellulären Zyklin D2 Proteins an Mitglieder der CKI<sub>CIP/KIP</sub> bindet (Bouchard et al. 1999; Perez-Roger et al. 1999). Diese Inhibitoren reprimieren sehr effektiv das katalytische Potential der CDK2-Kinase (Sherr and Roberts 1999). Im Komplex mit dem Zyklin E ist die Aktivität von CDK2 essentiell für die Phosphorylierung der Pocket-Proteine und damit für das Überschreiten des Restriktionspunktes. Der Anstieg der intrazellulären Zyklin D2-Menge führt zu einem Squelching-Effekt: Zyklin D2 „entzieht“ CDK2/Zyklin E/CKI<sub>CIP/KIP</sub> -Komplexen eine CKI<sub>CIP/KIP</sub> -Komponente, p27Kip1 oder p21CIP1 (Bouchard et al. 1999; Perez-Roger et al. 1999). Dieser Vorgang führt zu einer Aktivierung der CDK2-Kinase. Die Assoziation von Zyklin D2 mit p27Kip1 oder mit p21CIP1 scheint ihrerseits keinen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der CDK4- und CDK6-Kinasen zu haben (Sherr and Roberts 1999).

### ***Zusammenfassung (Zellzyklusregulation durch c-Myc):***

*Der Transkriptionsfaktor c-Myc trägt in entscheidender Weise zur Regulation des Zellzyklus bei. Hierbei stellt c-Myc eine Vermittlungsinstanz zwischen extrazellulären mitogenen Stimuli und dem resultierenden Wachstumsverhalten von Zellen dar. Die Aktivität von c-Myc wirkt stimulatorisch auf den Übertritt von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus. Durch die transkriptionelle Steuerung mehrerer kritischer Zielgene wird ein System aus CDKs, CKIs und Zyklinen entsprechend eines „Voranschreitens“ im Zellzyklus beeinflusst.*

*Zyclin D2 stellt ein gut charakterisiertes c-Myc-Zielgen dar. Durch die transkriptionelle Aktivierung dieses Gens wird durch verschiedene Mechanismen die Aktivität der essentiellen Kinasen CDK2, CDK4 und CDK6 erhöht. Hierdurch steigt das Potential zur Phosphorylierung der Pocket-Proteine. Werden Pocket-Proteine hyperphosphoryliert, so können Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktoren das Programm zum Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus initiieren.*

## 2.4 Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

### ***Einführung (Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)):***

*Eine wesentliche Voraussetzung für das Verständnis eines eukaryontischen Gen-Regulationsprozesses ist die Identifikation der beteiligten Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren sind per Definition Proteine, die über eine spezifische Bindung an DNA-Sequenzen im Promotorbereich die Transkriptionsrate (Anzahl synthetisierter mRNA-Moleküle pro Zeiteinheit) beeinflussen. Neben dem quantitativen Maß, mit dem ausschließlich das resultierende Endprodukt (in Form der veränderten Transkriptionsrate) ermittelt und dokumentiert wird, ist für ein biologisches Verständnis des Gesamtzusammenhangs zusätzlich entscheidend, auf welche Weise ein bestimmter Faktor seinen Einfluss in qualitativer Hinsicht ausübt. Eukaryontische Genregulation kann als ein sehr komplexes Zusammenwirken einzelner Teilprozesse beschrieben werden (siehe auch Abschnitt 2.1). Vor diesem Hintergrund kann das regulatorisch wirksame Potential eines Transkriptionsfaktors in qualitativer Hinsicht weitaus genauer beschrieben werden. Hierfür wird definiert, wie die einzelnen Teilprozesse kausal zusammenhängen und auf welche Weise einzelne- oder entsprechend kooperativ zusammenwirkende Faktoren eine Veränderung des Genexpressionsniveaus induzieren. Im Bereich molekularbiologischer Arbeitsmethoden stehen eine große Anzahl experimenteller Ansätze zur Verfügung um jeweils einzelne Teilaspekte der Genregulation zu erforschen. Je nach experimentellem Ansatz resultieren präferenziell Daten zur quantitativen oder zur qualitativen regulatorischen Aktivität eines spezifischen Transkriptionsfaktors.*

*Erst durch die Entwicklung der Chromatin-Immunpräzipitation ist es möglich geworden, das Besetzungsmuster von Transkriptionsfaktoren, sowie die Chromatinstruktur in Promotorbereichen innerhalb intakter Zellen zu analysieren.*

### 2.4.1 Die Chromatin-Immunpräzipitation: Einsatzmöglichkeiten und Vergleich mit konventionellen Methoden

In der Transienten Transfektion wird das Transaktivierungspotential von Faktoren auf quantitativem Niveau ermittelt. Hierfür wird bei der Analyse des Zielpromotors die Aktivität des jeweiligen Reportergenproduktes gemessen und stellt ein absolutes quantitatives Maß für das regulatorische Potential eines kotransfizierten Faktors dar (Oelgeschlager et al. 1996).

Im Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA) wird überprüft, ob sich in den zu untersuchenden Zellkernen Proteine oder Komplexe mit spezifischer DNA-Bindungskapazität für ein bestimmtes DNA-Fragment befinden (Sommer et al. 1998). Durch den Einsatz verschiedener Oligofragmente, bzw. durch Konkurrenzexperimente mit nicht-markierten DNA-Oligos, können innerhalb dieses Systems sowohl Stärke als auch Spezifität der DNA-Bindung ermittelt werden. Daten zur qualitativen regulatorischen Funktion der Faktoren werden im EMSA-Experiment jedoch nicht erhalten.

Im Rahmen von Footprinting-Experimenten kann die Besetzung definierter DNA-Abschnitte nachgewiesen werden (Mizuguchi et al. 1995). Dieser Nachweis ist aber insofern unspezifisch, als der entsprechend beteiligte Faktor nicht identifiziert werden kann. Diese Methode eignet sich dafür, die Besetzung einer bestimmten Region zu bestätigen, wenn bereits Daten zur spezifischen Bindung des Faktors in diesem Bereich existieren.

Eine adäquate Methode um das regulatorische Potential von Faktoren gezielt *in-vitro* zu ermitteln ist die *In-vitro*-Transkription. In den Experimenten wird ausgenutzt, dass mittlerweile sehr genau bekannt ist, welche Kombination von allgemeinen Transkriptionsfaktoren für ein basales Expressionsniveau an reiner (nicht in Chromatin verpackter) DNA ausreicht (LeRoy et al. 1998). Die entsprechenden Faktoren werden aufgereinigt und durch die Zugabe ebenfalls isolierter RNA-Polymerase-II wird *in-vitro* ein Transkriptionskomplex rekonstituiert. Alternativ kommen verschiedene transkriptionskompetente Kernextrakte zum Einsatz. Die elementare Messgröße stellt in beiden Fällen direkt die Menge der synthetisierten mRNA bzw. deren Veränderung im Experiment dar. Das regulatorische Potential der getesteten Faktoren wird über die detektierte Veränderung des Transkriptionsniveaus definiert. Diese Methode eignet sich sehr gut, um den Einfluss verschiedener Faktoren oder Faktorkombinationen auf den basalen Transkriptionskomplex zu untersuchen. Werden bestimmte Komponenten weggelassen oder kommen mutierte Proteinversionen zum Einsatz, so können neben den primär quantitativ aussagekräftigen Ergebnissen auch Daten zum mechanistischen Ablauf der jeweiligen Regulationsprozesse gesammelt werden (Holstege et al. 1997; Ranish et al. 1999).

Mit der innerhalb der letzten Jahre entwickelten Chromatin-Immun-Präzipitation (ChIP) ist es erstmals möglich, innerhalb intakter Zellen die Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotorregionen potentieller Zielgene nachzuweisen. Der große Vorteil im Vergleich zu den beschriebenen konventionellen Methoden besteht darin, dass zum entscheidenden Zeitpunkt, wenn im Experiment die Grundlagen für die nachfolgende Detektierbarkeit gelegt werden (Fixierung durch Formaldehyd-Zugabe zu lebenden Zellen, siehe auch Abschnitt 5.3), von

einer vergleichbar geringen Beeinflussung des biologischen Systems ausgegangen werden kann.

Im transienten Transfektionsexperiment entspricht der Verpackungsstatus der Reporterkonstrukte nur bedingt der Situation im endogenen Chromatin-Kontext (Reeves et al. 1985; Jeong and Stein 1994). Eine adäquate Berücksichtigung des Einflusses der verschiedenen Kern-Kompartimente ist nicht gewährleistet und die auszutestenden Faktoren werden überexprimiert, so dass zum Teil unphysiologisch hohe Mengen resultieren.

Sowohl im EMSA- als auch im *In-vitro*-Transkriptions-Experiment werden die entsprechenden Messungen (DNA-Bindungsfähigkeit, Transaktivierungspotential) bei der Verwendung von Kernextrakten und aufgereinigten DNA-Fragmenten bzw. aufgereinigten Faktoren vollständig *in-vitro* durchgeführt. So resultiert auch hier, dass elementare Parameter, die innerhalb der lebenden Zelle die Regulierbarkeit von Genen determinieren (Chromatinstatus, Kernkompartimentalisierung, physiologische Faktor-Konzentrationen, spezifische endogene Interaktionspartner) nicht oder nur teilweise Berücksichtigung finden.

Durch den Einsatz der ChIP-Methode wird es theoretisch möglich, jede Veränderung, die sich im Verlauf eines physiologischen Genregulationsprozesses an der Promotor-DNA abspielt, in einem weitaus physiologischeren Kontext zu detektieren. Voraussetzung ist eine effiziente Fixierung an die DNA sowie die Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern, mit denen die entsprechende Veränderung mittels ChIP-Analyse nachgewiesen werden kann. Praktisch kann das zeitliche Besetzungsmuster von Promotoren durch Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren oder Komponenten des basalen Transkriptionskomplexes untersucht werden (Cosma et al. 1999; Kuras and Struhl 1999). Innerhalb bestimmter Grenzen kann ein lokales Mapping der besetzten DNA-Region durchgeführt werden. Durch den Einsatz von Antikörpern, die spezifisch Komponenten des Chromatins binden, können lokal und / oder zeitlich auftretende Veränderungen der Chromatinstruktur im Rahmen von Regulationsprozessen dokumentiert werden (Kadosh and Struhl 1998).

In der Abbildung 14, Seite 94, ist der methodische Ablauf bei der ChIP-Analyse schematisiert dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung der Methode wird im Abschnitt 5.3 gegeben.

### ***Zusammenfassung (Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)):***

*Das Maß für die Aktivität eines Gens ist ein quantitatives Maß, das sich in der RNA-Syntheserate ausdrückt. Wie eine bestimmte Genaktivität erzeugt wird, ist von dem kooperativen Wechselspiel von Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren, der DNA-Promotorsequenz und der Chromatinstruktur abhängig. Ein einzelner Transkriptionsfaktor*

*hat innerhalb des Regulationsprozesses in der Regel eine Teilaufgabe, welche ein spezifisches intrinsisches regulatorisches Potential des Faktors erforderlich macht. Für die Analyse dieses Potentials (bzw. das biologische Verständnis der individuellen Funktion des Faktors) stehen eine Reihe molekularbiologischer Techniken zur Verfügung. Alle der herkömmlichen Methoden haben aber den gemeinsamen Nachteil, dass elementare Parameter, die in lebenden Zellen Genregulation steuern, insbesondere der Chromatinstatus, keine Berücksichtigung finden. Erst durch die ChIP-Methode wird es möglich, die Besetzung von Promotoren intakter Zellen zu analysieren. Durch eine parallele Untersuchung des Chromatinstatus wird es erstmals möglich, transkriptionelle Regulationsprozesse umfassender zu untersuchen und den Gesamtprozess auch in seiner zeitlichen Dynamik festzuhalten und verstehen zu können.*

## 2.5 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von Mitgliedern des Myc/Max/Mad-Netzwerkes auf die Regulation des humanen *Zyklin D2*-Gens untersucht werden. Unter Anwendung der ChIP-Methode soll eine Analyse der Promotorbesetzung durch einzelne Mitglieder, sowie des Acetylierungsstatus am *Zyklin D2*-Locus erfolgen. Am System einer induzierten Zelldifferenzierung sollen Daten zur zeitlichen Dynamik der *Zyklin D2*-Genregulation gewonnen werden. Herkömmliche Modelle zur Beschreibung des regulatorischen Potentials von Myc/Max/Mad-Komponenten sollen vor dem Hintergrund der Analyse an intakten Zellen bestätigt, modifiziert oder gegebenenfalls erweitert werden. Das *Zyklin D2*-Gen soll durch die Anwendung der ChIP-Methode als Myc/Max/Mad-Zielgen in lebenden Zellen verifiziert werden.

Da die Transkriptionsfaktoren des Myc/Max/Mad-Netzwerkes fundamental wichtige zellphysiologische Prozesse steuern, sollen die am Beispiel des *Zyklin D2*-Promotors herausgearbeiteten Daten einem verbesserten Verständnis des entscheidenden Zusammenhangs von unmittelbarem Zellschicksal und koordinierter Genregulation beitragen.



### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 *Zyklin D2* mRNA-Expression in hematopoetischen Zellkultursystemen**

Der zelluläre Differenzierungsprozess der promyelozytären humanen HL-60-Zelllinie stellt ein gut charakterisiertes Modellsystem zur Analyse des Myc/Max/Mad-Netzwerkes dar. Werden HL-60-Zellen mit dem Phorbolster 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) behandelt, so differenzieren die Zellen in Kultur in Richtung Monozyten. Innerhalb der ersten Stunden dieses Prozesses, treten starke Veränderungen im Expressionsniveau von c-Myc und Mad1 auf. Während das c-Myc-Protein herunterreguliert wird, wird das zuvor inaktive *Mad1*-Gen induziert. Es wird sowohl Mad1 mRNA, als auch Protein gebildet. Parallel hierzu kommt es zu einer Wachstumsarretierung der Zellen. Der Proteingehalt des Heterodimerisierungspartners Max bleibt im Verlaufe dieses Prozesses konstant (Sommer et al. 1998).

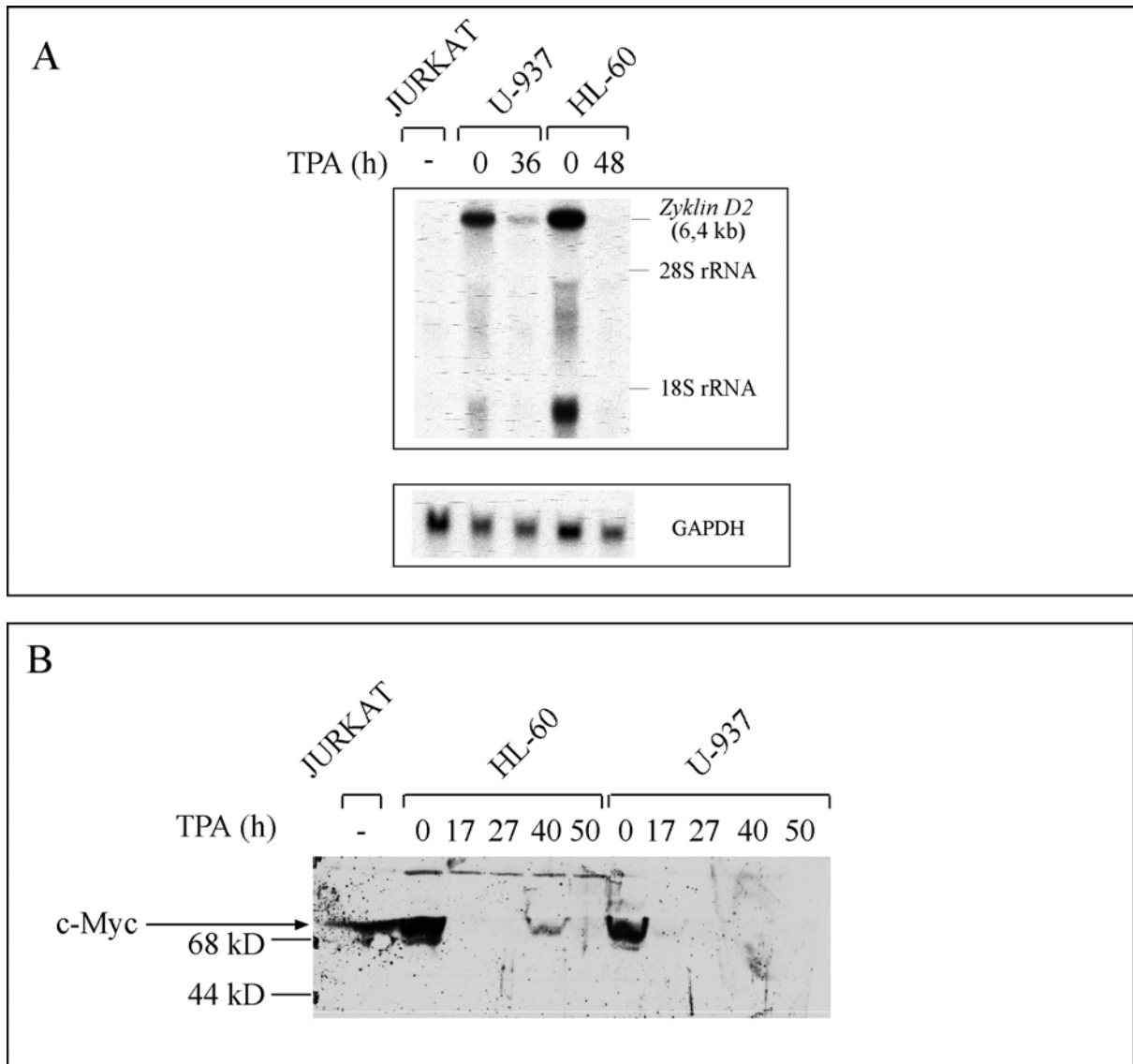
Da die Expression vieler Zykline mit Proliferationsprozessen assoziiert ist, wurde in einem ersten Experiment überprüft, ob es während des HL-60-Differenzierungsprozesses zu einer Herunterregulation der *Zyklin D2* mRNA kommt. Durch die Zugabe von 50 ng TPA pro Milliliter Zellmedium wurde in HL-60-Zellen ein Differenzierungsprozeß induziert. Parallel dazu wurde auf die gleiche Weise in U-937-Zellen, einer ebenfalls myeloiden Zelllinie, Differenzierung ausgelöst. Die RNA aus diesen Zellen und aus Jurkat-Zellen, einer lymphoblastoiden T-Zelllinie, wurde in der Northern-Blot-Analyse untersucht (siehe Abbildung 4A, Seite 37). Hierfür wurde die an die Membran kreuzvernetzte RNA mit einem radioaktiv markiertem humanen *Zyklin D2* cDNA-Fragment hybridisiert:

Deutlich erkennbar ist das Vorkommen eines 6,4 kb-Transkriptes in unbehandelten U-937- und HL-60-Zellen. Die Größe dieses Transkriptes von ca. 6,4 kb stimmt mit dem am 11.11.1992 veröffentlichten NCBI-Datenbankeintrag (Accession: NM\_001759) überein. Kurz unterhalb der 18 S rRNA ist in beiden Zelllinien (jedoch deutlich intensiver in HL-60-Zellen) die Bande eines kleineren Spleiß-Produktes sichtbar. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um eines der beschriebenen Transkripte mit verkürztem 3'-UTR (Accession: M90813, X68452). Sowohl in U-937- als auch in HL-60-Zellen bewirkt der durch TPA-Behandlung induzierte Differenzierungsprozeß eine deutliche Abnahme der *Zyklin D2*

## ERGEBNISSE

mRNA-Menge. In Jurkat-Zellen ist unter den gegebenen Bedingungen kein *Zyklin D2*-Transkript nachweisbar.

Zur Normalisierung wurde die eingesetzte RNA mit einem humanen GAPDH-cDNA-Fragment hybridisiert.



**Abbildung 4 c-Myc Proteinexpression und *Zyklin D2* mRNA-Expression in hematopoetischen Zelllinien.** **A:** Aus unbehandelten- oder für die angegebene Zeit mit TPA-stimulierten Zellen wurde RNA aufgearbeitet. Hiervon wurden jeweils 20 µg in der Northern-Analyse untersucht. Als Sonde wurde ein Fragment der humanen *Zyklin D2* cDNA (oben) und als Kontrolle ein humanes GAPDH-cDNA-Fragment eingesetzt. **B:** Aus unbehandelten Zellen oder für die angegebene Zeit mit TPA-stimulierten Zellen (50ng/ml) wurden Frackelton-Extrakte hergestellt. Jeweils  $2 \cdot 10^6$  Zelläquivalente wurden im dargestellten Western-Blot eingesetzt. Als primärer Antikörper bei der Detektion diente  $\alpha$ -c-Myc (N-262).

### 3.2 c-Myc Protein-Expression in hematopoetischen Zellkultursystemen

In den 3 hematopoetischen Tumorzelllinien wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob das c-Myc-Protein in den myeloiden Zellen unter TPA-Einfluss wie erwartet herunterreguliert wird. Zusätzlich sollte c-Myc-Protein in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden. In einem Zeitverlaufsexperiment wurden HL-60 und U-937-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von TPA geerntet. Frackelton-Extrakte wurden hergestellt und jeweils gleiche Zelläquivalente wurden in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt: Sowohl der bereits in der Literatur beschriebene hohe c-Myc Proteingehalt in exponentiell wachsenden Zellen, als auch die TPA-induzierte Herunterregulation des c-Myc-Proteins konnte in den eingesetzten myeloiden Zelllinien bestätigt werden. Nach 17 h TPA-Behandlung ist unter den gegebenen Bedingungen in beiden Zelllinien kein Protein mehr nachweisbar. Interessanterweise kommt es in HL-60-Zellen nach 40 h TPA-Stimulation zu einer schwachen Reinduktion des Proteins. In den parallel analysierten Jurkat-Zellen ist eindeutig c-Myc-Protein nachweisbar.

### 3.3 In-vivo-Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors durch c-Myc (HL-60-Zellen)

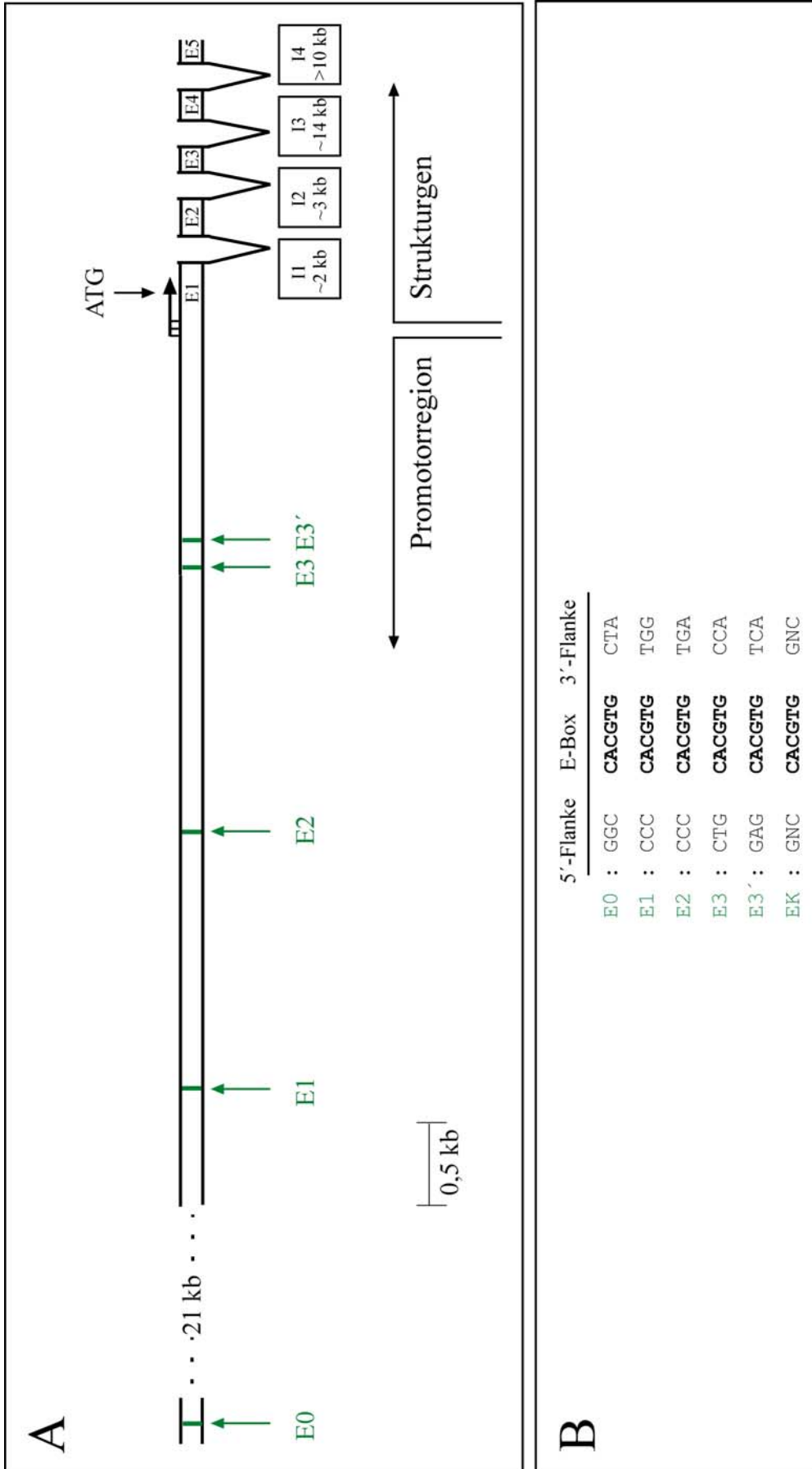
Eines der potentiellen c-Myc-Zielgene ist *Zyklin D2* (siehe Abschnitt 2.3.3). Durch die Anwendung der Chromatin-Immunpräzipitation wird es möglich, Zielgene bestimmter Faktoren auf der Ebene der Promotorbesetzung *in-vivo* zu bestätigen. Darüber hinaus kann das potentielle responsive DNA-Bindungselement verifiziert werden (siehe auch Abschnitt 5.3).

Um für eine detaillierte ChIP-Analyse in adäquater Weise die zu amplifizierenden DNA-Abschnitte festlegen zu können, wurde ein weiter Bereich des humanen *Zyklin D2*-Locus nach Konsensus-E-Boxen durchsucht. Für diese Suche wurde das NCBI-Datenbankfragment AC006122 zugrundegelegt. Innerhalb des Contigs von Nukleotid 52331 bis 97953 befinden sich Transkriptions- und Translationsstart, das erste Exon und der 5'-Bereich des ersten Introns. Zusätzlich ist ein Bereich von ca. 43 kb „stromaufwärts“ vom *Zyklin D2*-Strukturgen enthalten. Im Rahmen dieser Suche wurden 4 Konsensus E-Boxen innerhalb eines Bereiches von 4,6 kb vor dem Translationsstart des Gens identifiziert. Die E-Boxen wurden in 5'-3'-Richtung mit E1, E2, E3 und E3' durchnummeriert. \*

Innerhalb eines Bereiches von fast 22 kb stromaufwärts von E1 wurde keine weitere Konsensus E-Box identifiziert. Die nächstgelegene E-Box im 5'-Bereich wurde mit E0 bezeichnet. In der Abbildung 5, Seite 40, ist die Anordnung von humanem *Zyklin D2*-Promotor und -Strukturgen, sowie die Lokalisation der identifizierten E-Boxen schematisch abgebildet. Zusätzlich sind die Sequenzen der einzelnen E-Boxen mit flankierenden Sequenzen dargestellt, da Einflüsse von 5'- und 3'-Flanke auf das Bindungsverhalten von E-Box-bindenden Faktoren beschrieben worden sind (Luscher und Larsson, 1999).

Die Transkription des *Zyklin D2*-Gens kann über verschiedene Transkriptionsstartpunkte initiiert werden (Brooks et al. 1996).

\*Die Bezeichnung E4 wurde vermieden, da im (über weite Abschnitte homologen) murinen Promotor eine näher am Transkriptionsstart lokalisierte E-Box mit E4 bezeichnet wurde (Bouchard et al. 1999). Diese E-Box ist im humanen Promotor nicht konserviert. Die humane E-Box E3' ist darüber hinaus im murinen Promotor nicht als Konsensus-E-Box konserviert.



**Abbildung 5 Der Aufbau des humanen Zyklin D2 Promotors.** A: Der Aufbau des humanen *Zyklin D2*-Locus ist schematisch wiedergegeben. Dargestellt sind die Lokalisation aller identifizierten E-Boxen (grün) und Translations- und Transkriptionsstartpunkte. Die ersten 5 Exons (in schwarz; E1, E2...), sowie Lokalisation und Größe der Introns 1-4 (in schwarz; I1, I2,...) sind angedeutet. B: Dargestellt sind die „Core“-Sequenzen der E-Boxen des *Zyklin D2*-Locus mit jeweils drei flankierenden Nukleotiden. Im Vergleich ist die aus der Literatur hervorgehende Konsensus-Sequenz (EK) unten abgebildet.

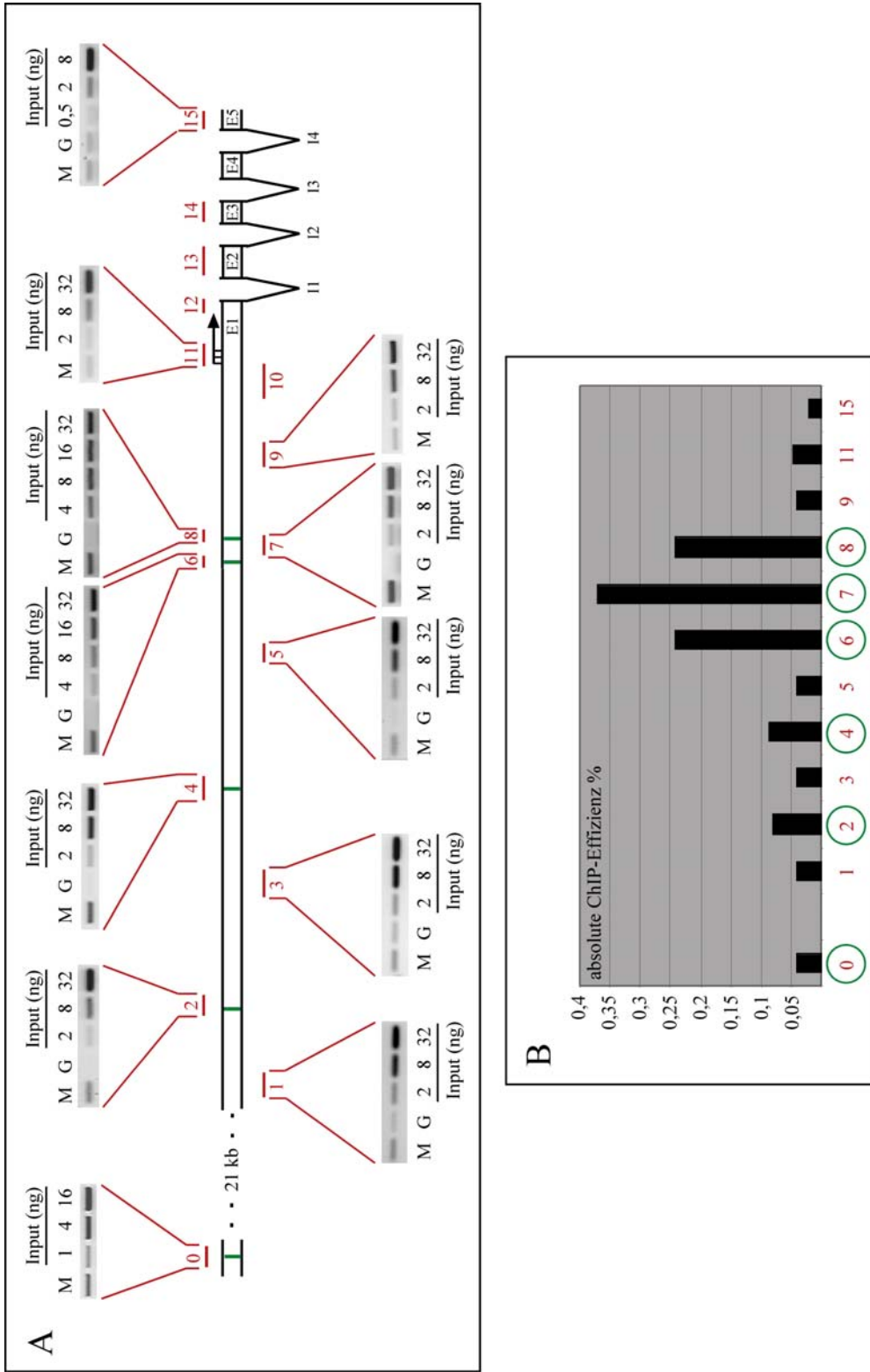
Um mit Hilfe der ChIP-Methode die Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors durch den Transkriptionsfaktor c-Myc zu kartieren, wurden exponentiell wachsende HL-60-Zellen für eine ChIP-Analyse aufgearbeitet.

Mit den Lysaten wurde sowohl eine spezifische c-Myc-ChIP, als auch eine Negativ-Kontroll-ChIP ( $\alpha$ -GAL-4) durchgeführt. Die aufgearbeiteten ChIP-DNAs wurden anschließend als Templates für die analytischen PCR-Reaktionen eingesetzt. Als Normalisierungskontrolle diente jeweils aus dem sonifizierten Gesamtlysat isolierte, fragmentierte genomische DNA unterschiedlicher Verdünnungsstufen (Input-DNA).

In der Abbildung 6A, Seite 42, sind die entsprechenden PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung und die Lokalisation der entsprechend amplifizierten DNA-Abschnitte dargestellt. Im Kontext des *Zyklin D2*-Locus sind zur PCR-Analyse eingesetzte DNA-Abschnitte durchnummeriert. Die Produktintensität aller Banden wurde mit Hilfe der Aida-Software ermittelt. Anschließend wurden für jede PCR die relative Signalintensität der c-Myc-ChIP-Produkte und die absolute ChIP-Effizienz ermittelt (siehe Abschnitt 5.3.2).

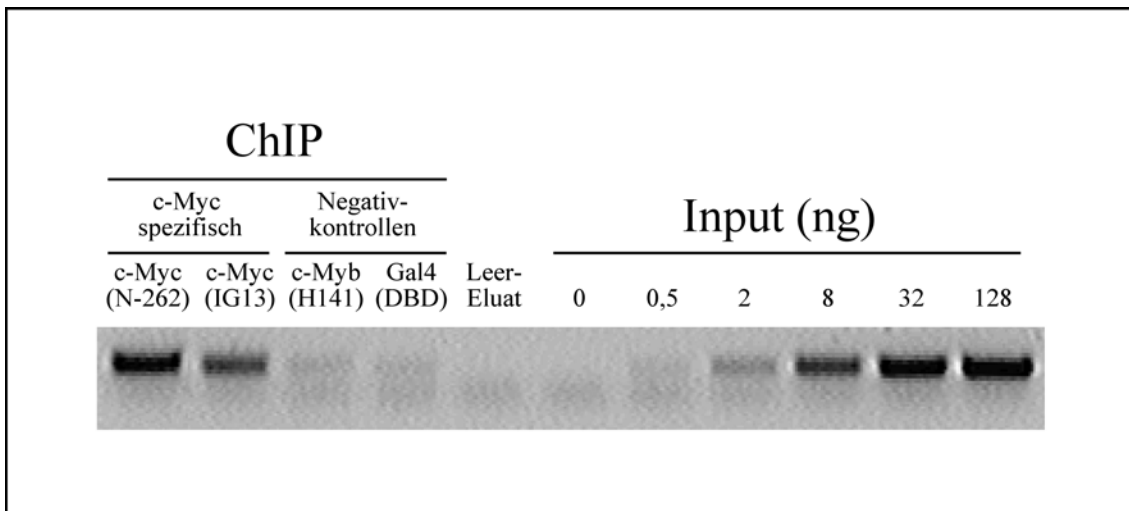
In Abbildung 6B, Seite 42, sind die c-Myc-spezifischen absoluten ChIP-Effizienzen graphisch dargestellt.

Das Experiment dokumentiert eine *in-vivo*-Besetzung durch c-Myc im Bereich der E-Boxen E1, E2, E3 und E3'. Die absoluten ChIP-Effizienzen sind im Fall der E-Boxen E1 und E2 (Fragment-Nr.2 und 4) mit 0,08% doppelt so hoch wie innerhalb der benachbarten Kontrollregionen bei 0,04%. Dieser Wert kann als c-Myc-Hintergrundsignal am *Zyklin D2*-Locus definiert werden. Die Besetzung der E-Boxen E3 und E3' (Fragment-Nr. 6, 7, 8) ist 6 bis 9 mal so stark wie der definierte Hintergrund und 3 bis 4,5 mal so stark wie die Besetzung der E-Boxen E1 und E2. Im Bereich der über 20 kb 5' vom Promotor gelegenen E-Box E0 resultiert ausschließlich Hintergrundsignal.



**Abbildung 6 *In-vivo*-Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors durch c-Myc. A:** Exponentiell wachsende HL-60-Zellen wurden in Fixierungslösung (mit 1% Formaldehyd) bei 4°C für 5 Minuten fixiert und für die ChIP-Analyse aufgearbeitet. Das erhaltene ChIP-Lysat wurde mit dem c-Myc-spezifischen Antikörper  $\alpha$ -c-Myc (N-262) oder als Negativkontrolle mit einem Antikörper gegen den Gal 4 Transkriptionsfaktor aus *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -Gal 4 (DBD) inkubiert. Nach Immunpräzipitation und Aufarbeitung der isolierten ChIP-DNA wurden jeweils gleiche Mengen für die dargestellten PCR-Reaktionen auf den einzelnen Fragmenten des *Zyklin D2*-Locus eingesetzt (M:  $\alpha$ -c-Myc (N-262); G:  $\alpha$ -Gal 4 (DBD)). Die PCR-Bedingungen (Zykluszahl und Input-Verdünnungsreihe) wurden dabei jeweils so aufeinander abgestimmt, dass für die Analyse der c-Myc-Signale jeweils optimale Messbereiche gewährleistet waren. **B:** Die Intensitäten der einzelnen DNA-Banden wurden quantifiziert. Dargestellt sind die daraus berechneten absoluten ChIP-Effizienzen. Fragmente, die Konsensus E-Boxen beinhalten, sind durch grüne Kreise hervorgehoben.

Um die Spezifität der erhaltenen Daten zusätzlich zu bestätigen, wurde der innerhalb der Analyse eingesetzte c-Myc Antikörper N-262 mit einem anderen c-Myc-Serum verglichen. Außerdem wurde ein zweiter Negativkontroll-Antikörper vergleichend ausgetestet. Diese Kontrollen wurden auf dem Fragment Nr.7 durchgeführt. Die Abbildung 7, Seite 43, zeigt, dass auch bei Einsatz des c-Myc Antikörpers IG13 ein eindeutig positives ChIP-Signal detektiert wird. Die durch die beiden Kontroll-Antikörper ermittelten Hintergrundwerte liegen im gleichen Intensitätsbereich. Damit kann eindeutig gezeigt werden, dass die in der ChIP-Analyse generierten Daten einer spezifischen Promotorbesetzung durch c-Myc entsprechen.



**Abbildung 7 Spezifitätskontrolle der c-Myc-ChIP.** Exponentiell wachsende HL-60-Zellen wurden nach Standard-Protokoll für die ChIP-Analyse aufgearbeitet. Die IP wurde mit den c-Myc-spezifischen Antikörpern oder den entsprechenden Negativkontroll-Antikörpern durchgeführt. Gleiche Mengen der erhaltenen ChIP-DNA sowie eine „vierfach-aufsteigende“ Verdünnungsreihe von Input-DNA wurden für eine PCR auf dem Fragment Nr. 7 (siehe Abbildung 6, Seite 42) eingesetzt. Um mögliche Kontaminationen in den DNA-Aufreinigungsreagenzien auszuschließen, wurde reine Eluierungslösung (siehe Abschnitt 5.3.5) parallel mit aufgearbeitet und in der PCR mitgetestet.



### 3.4 TPA-induzierter Differenzierungsprozeß in HL-60-Zellen: mRNA-Expression, Promotor-Besetzung und Acetylierungsstatus im Zeitverlauf

Die unter Punkt 3.3 beschriebenen Daten dokumentieren, dass der Transkriptionsfaktor c-Myc den humanen *Zyklin D2*-Promotor im Zustand aktiver Gentranskription *in-vivo* besetzt. Die stärkste DNA-Bindung konnte im Bereich der E-Boxen E3 und E3' ermittelt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es im Verlauf der HL-60-Zelldifferenzierung zu einer Herunterregulation des *Zyklin D2*-Gens kommt. Wenn davon ausgegangen wird, dass *Zyklin D2* positiv durch c-Myc und negativ durch Mad1 reguliert wird, stellt sich die Frage, ob sich das gegenläufige Protein-Expressionsmuster von c-Myc und Mad1 im Differenzierungsprozeß auch auf der Ebene der Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors widerspiegelt.

Da sich die hauptsächlichsten Veränderungen im Expressionsmuster von c-Myc und Mad1 innerhalb weniger Stunden nach Induktion der Differenzierung ergeben, wurde ein Zeitverlaufs-Experiment durchgeführt. Hierfür wurden HL-60-Zellen im Zustand exponentiellen Wachstums, sowie nach 3-, 6-, 12- und 24 h Wachstum in TPA-haltigem Medium für zwei verschiedene Experimente aufgearbeitet. In der Northern-Blot-Analyse wurde die Abnahme der *Zyklin D2* mRNA im Verlauf des Differenzierungsprozesses dokumentiert (siehe Abbildung 8A, Seite 47). Die 6,4 kb Banden wurden mit Hilfe der MacBAS, V2.2-Software quantifiziert:

Wird die Intensität der Bande in exponentiell wachsenden Zellen (0 h) gleich 100% gesetzt, so ergibt sich bereits nach drei Stunden TPA-Behandlung eine Abnahme des spezifischen *Zyklin D2*-Signals auf 75%. Der Wert sinkt weiter auf 39% nach 6 h TPA-Behandlung. Die stärkste Abnahme der spezifischen mRNA-Menge vollzieht sich zwischen 6- und 12 h TPA-Stimulation. Die Signalintensität sinkt auf 3,6% des Ausgangswertes ab und ändert sich anschließend praktisch nicht mehr (24 h-Wert: 4,3%).

Parallel zum Northern-Blot-Experiment sind zu den angegebenen Zeiten nach TPA-Zugabe unter Standard-Bedingungen Lysate für CHIP-Experimente aufgearbeitet worden. Die Abbildung 8B, Seite 47, dokumentiert die durchschnittliche DNA-Fragmentgröße von 500 bp nach Sonifizierung der einzelnen Lysate und Aufarbeitung der resultierenden genomischen DNA-Fragmente. Mit den 5 verschiedenen CHIP-Lysaten wurden jeweils 7 ChIPs parallel durchgeführt. Ein Rest der jeweils verbleibenden Lysate ist in flüssigen Stickstoff eingefroren, bei -80°C gelagert und nach einigen Wochen aufgetaut worden. Auf den Lysaten

0 h, 3 h, 6 h und 12 h wurde dann jeweils eine weitere ChIP unter Einsatz eines Antikörpers gegen das Protein TRRAP durchgeführt.

In Abbildung 8C, Seite 47, ist das Ergebnis einer ChIP mit  $\alpha$ -RNA-Polymerase-II Antikörper dargestellt. Da die RNA-Polymerase-II (RNA-Pol-II) über den Bereich der Transkriptionsstartpunkte zum Promotor rekrutiert wird, wurde zur Detektion das Fragment Nr. 11 amplifiziert (siehe Abbildung 8E, Seite 47). Die im gleichen PCR-Experiment generierten Produkte einer Input-DNA-Verdünnungsreihe (jeweils 2-fache Zunahme der Template-Menge) sind auf der linken Seite der Abbildung dargestellt. Im Zeitverlauf nach TPA-Stimulation wird eine starke Abnahme der RNA-Pol-II-Besetzung des Promotors bereits nach 3 h TPA-Stimulation deutlich. Dies bedeutet, dass die Abnahme der RNA-Pol-II-Besetzung der Abnahme der *Zyklin D2* mRNA-Menge um drei bis sechs Stunden vorausgeht. Es kann daher von einer mRNA-Halbwertszeit von ca. 3h ausgegangen werden.

In der Abbildung 8D, Seite 47, sind alle weiteren ChIP-Experimente dargestellt. Alle abgebildeten PCRs sind auf dem Fragment Nr. 7 generiert worden. Auch hier sind auf der linken Seite die erzeugten Input-DNA-Produkte (jeweils verdoppelte Template-Menge) aus dem gleichen PCR-Experiment abgebildet. Im ChIP-Experiment kann in der Analyse zwischen direkter Besetzung des Promotors durch Transkriptionsfaktoren (c-Myc, Mad1, Max), dem indirekt bindenden Kofaktor TRRAP, Ansätzen zur Identifikation des Acetylierungsstatus und Kontrollen unterschieden werden.

Um das herkömmliche Modell zur Regulation der Gentranskription durch die Myc/Max/Mad-Familie im spezifischen Fall des *Zyklin D2*-Gens *in-vivo* zu verifizieren, sind zuerst die Besetzungsmuster dieser Transkriptionsfaktoren von Interesse. Zum Zeitpunkt maximaler Transkriptionsaktivität (0h) ist eine eindeutige Besetzung der Region um die E-Boxen E3 und E3' durch c-Myc und Max nachweisbar. Die c-Myc-Bindung (gemessen als absolute ChIP-Effizienz) geht nach drei Stunden TPA-Stimulation um den Faktor 2 zurück und sinkt zum 6 h-Zeitpunkt auf das allgemeine Hintergrundniveau ab. Dies bedeutet, im Zustand geringer Genexpression ist keine Besetzung durch c-Myc nachweisbar. Im Gegensatz dazu steigt die Besetzung durch Mad1 zum 3 h-Zeitpunkt an und bleibt über Rest des Zeitverlaufs nahezu konstant. Die Promotorbesetzung durch den Heterodimerisierungspartner Max verringert sich nur geringfügig im Verlauf des Differenzierungsprozesses.

Da eine Reihe von veröffentlichten Daten darauf hindeutet, dass sowohl der c-Myc-Aktivierungseffekt, als auch die Mad1-Repression ihre Ausprägung über eine Veränderung des Histon-Acetylierungsstatus finden, wurden Antikörper gegen die acetylierten Core-Histone H3 und H4 eingesetzt. Im untersuchten Promotorbereich der E-Boxen E3 und E3'

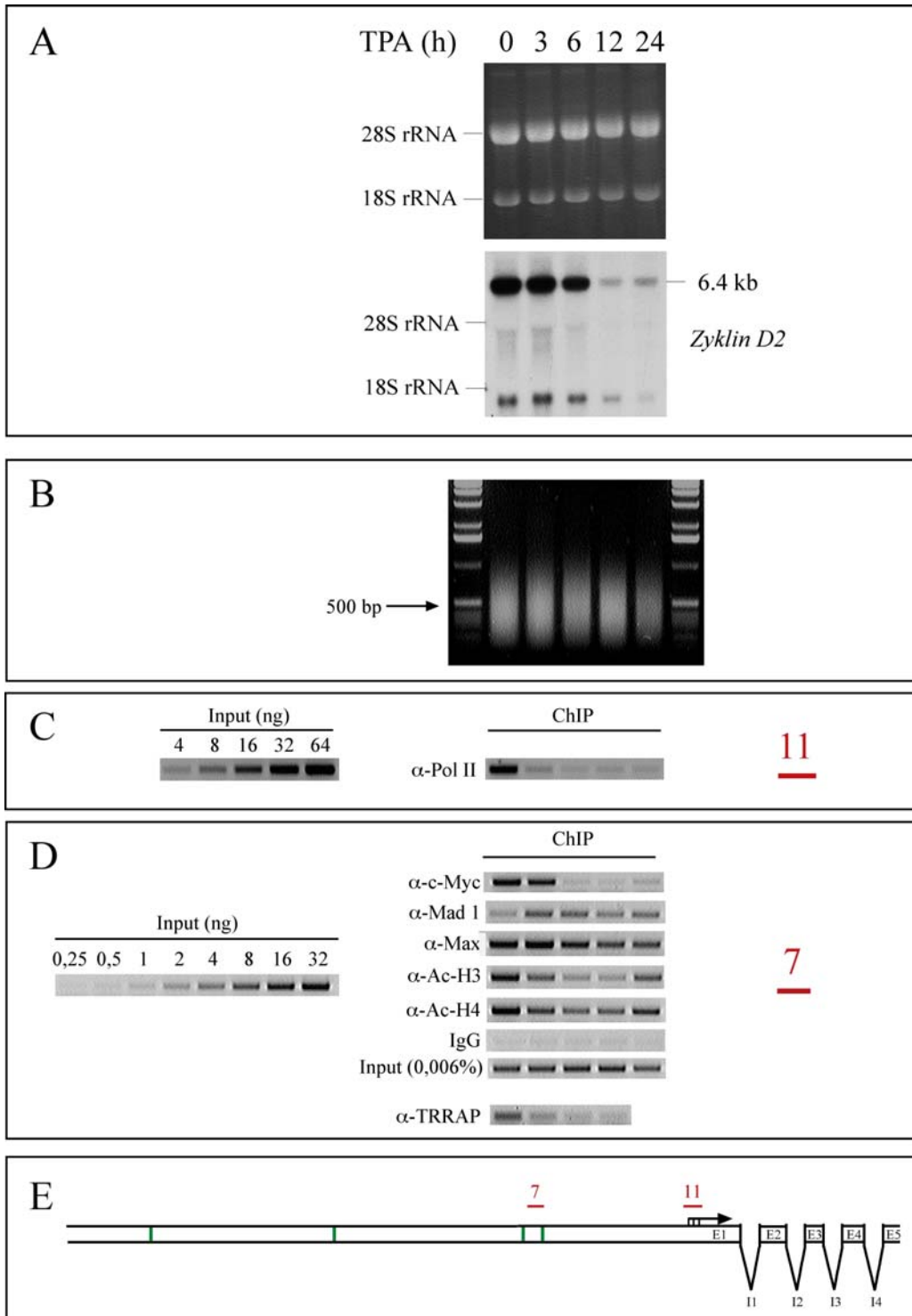
korreliert die Abnahme der Genaktivität mit einer Verminderung des Histon-Acetylierungsgrades sowohl für H3 als auch für H4. Die stufenweise Abnahme der Histon-Acetylierung vom 0 h- zum 3 h- und vom 3 h- zum 6 h-Zeitpunkt korreliert exakt mit der detektierten Veränderung des Besetzungsmusters von Myc-Max- zu Mad-Max Heterodimeren.

Die parallel durchgeführte Negativ-Kontroll-ChIP (IgG) resultiert nach PCR-Analyse zu allen Zeitpunkten in Hintergrundsignalen. Als zusätzliche Kontrolle wurde von der aufgereinigten Input-DNA aller fünf ChIP-Lysate der gleiche Anteil (jeweils 0,006%) als Template in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Intensitätsunterschiede der resultierenden Produkte sind im Vergleich zu den ChIP-DNA-Proben minimal.

Ein Interaktionspartner, der möglicherweise zwischen Promotor-Besetzung durch c-Myc und der Rekrutierung von Histon-Acetyl-Transferase-Aktivität vermittelt, ist das Protein TRRAP (siehe Abschnitt 2.2.2). Um die Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors durch diesen Kofaktor zu analysieren, wurden auf den gleichen (aber einmal eingefrorenen) Lysaten des Zeitverlaufsexperiments spezifische TRRAP-ChIPs durchgeführt. Das Besetzungsmuster im zeitlichen Verlauf des Experiments korreliert direkt mit den Acetylierungsmustern der c-Myc-Bindung sowie mit der RNA-Pol-II-Besetzung.

Zusammengenommen entsprechen die generierten Daten zur Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors durch Faktoren des Myc/Max/Mad-Netzwerkes dem postulierten Modell eines Wechsels von Myc-Max- zu Mad-Max-Dimeren im Verlauf der Herunterregulation der Genexpression. Die Veränderung des Acetylierungsstatus am Promotor und das zeitliche Bindungsmuster des Proteins TRRAP sind kompatibel mit dem postulierten Modell, wonach c-Myc und Mad1 die Regulation von Genen über eine Veränderung der Histon-Acetylierung steuern.

## ERGEBNISSE



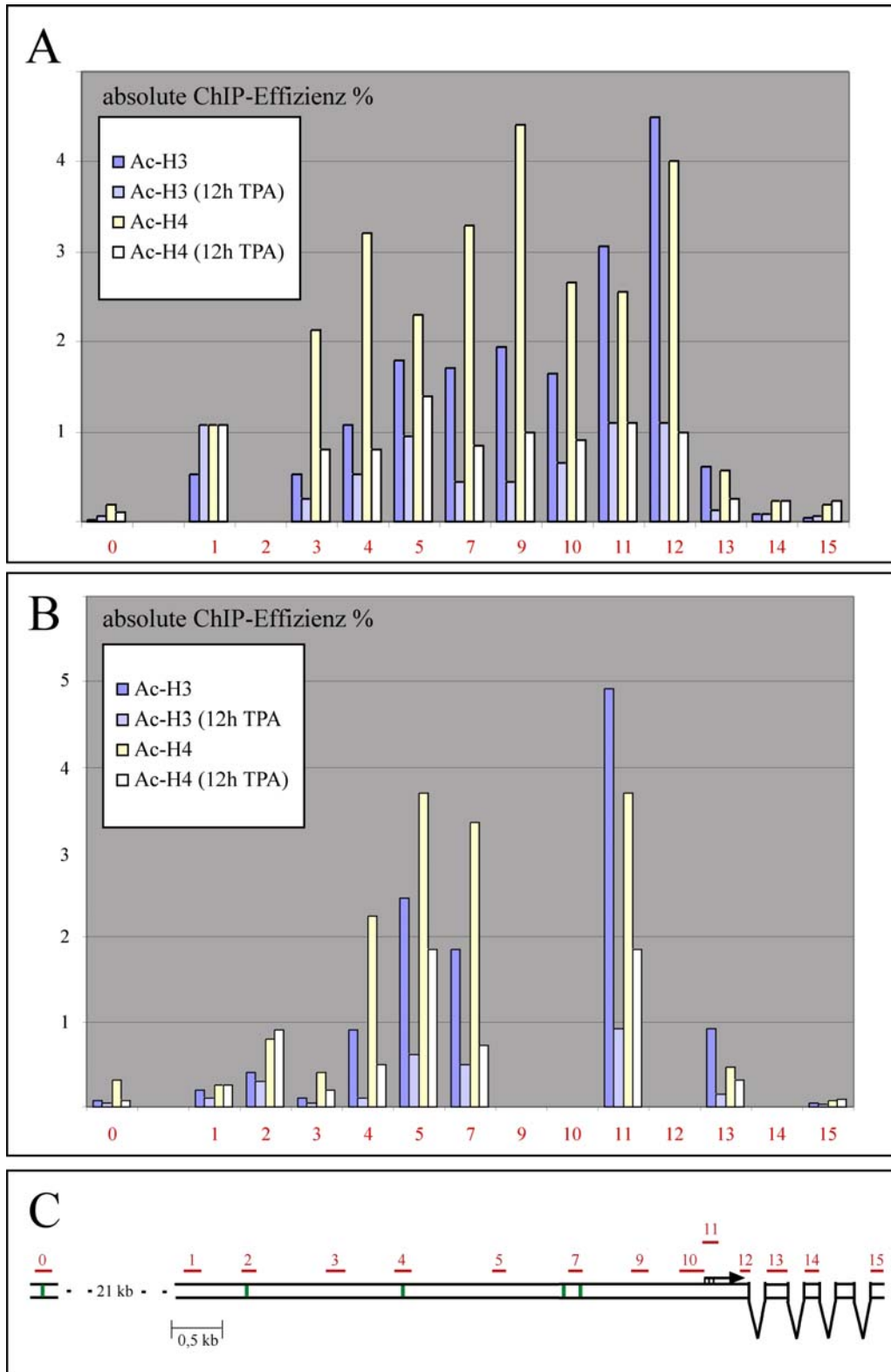
**Abbildung 8** TPA-induzierter Differenzierungsprozess in HL-60-Zellen im Zeitverlaufsexperiment. HL-60-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml TPA stimuliert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde RNA isoliert. Parallel wurde unter Standard-Bedingungen eine ChIP-Analyse durchgeführt. **A:** Je 20 µg RNA wurden für die dargestellte Northern-Analyse eingesetzt. Die geblottete Membran wurde mit einem Fragment der humanen *Zyklin D2* cDNA hybridisiert (unterer Teil). **B:** Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Fragmentierung der DNA und zur Bestimmung der durchschnittlichen Fragmentgröße wurden jeweils 650 ng der aus den ChIP-Lysaten aufgereinigten Input-DNA im Agarosegel analysiert. **C:** Für die Untersuchung der RNA-Pol-II Besetzung wurde in der ChIP-Analyse der monoklonale Antikörper 8WG16 eingesetzt. Die gewonnene ChIP-DNA wurde in der dargestellten PCR auf dem Fragment Nr.11 analysiert. Eine „zweifach-aufsteigende“ Verdünnungsreihe von Input-DNA (4ng-64ng) wurde parallel mit amplifiziert. **D:** Aus den gleichen ChIP-Lysaten wie in **B** und **C** wurde in der ChIP-Analyse die Besetzung durch die dargestellten Faktoren und die Acetylierung an den Histonen H3 und H4 untersucht. Die analytische PCR wurde auf dem Fragment Nr. 7 durchgeführt. Eine „zweifach-aufsteigende“ Verdünnungsreihe von Input-DNA (0,25ng-32ng) des 0h-Zeitpunktes wurde parallel mit amplifiziert. Als zusätzliche Kontrolle wurde jeweils der gleiche Anteil der Gesamt-DNA der eingesetzten Lysate der unterschiedlichen Zeitpunkte (0,006%) in der PCR mit analysiert (Input). **E:** Dargestellt sind der *Zyklin D2*-Locus und die in der ChIP analysierten Bereiche.

### 3.5 Acetylierungsniveau am *Zyklin D2*-Locus (HL-60-Zellen)

Für die Region im Bereich der E-Boxen E3 und E3' konnte parallel zur Abnahme des *Zyklin D2*-Expressionsniveaus eine Verringerung des Histon-Acetylierungsgrades gezeigt werden. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um lokale- oder promotorweite Veränderungen handelt, wurde eine umfangreiche Analyse des Acetylierungsstatus am *Zyklin D2*-Locus durchgeführt. Hierfür wurden unbehandelte- und zwölf Stunden mit TPA stimulierte HL-60-Zellen für ein Chromatin-IP-Experiment aufgearbeitet. Auf jedem Lysat wurden jeweils ChIPs mit Antikörpern gegen die acetylierten Histone H3 und H4 durchgeführt. Die resultierende ChIP-DNA wurde mittels PCR analysiert. In der Abbildung 9A, Seite 49, sind die ermittelten absoluten ChIP-Effizienzen im Balkendiagramm dargestellt:

Die bereits im Bereich des Fragmentes Nr.7 dokumentierte Verringerung der Histon-Acetylierung unter TPA-Einfluß erstreckt sich über weite Bereiche des *Zyklin D2*-Promotors. Sowohl für Histon H3 als auch für H4 zeigt sich im gesamten Promotor eine Hyperacetylierung im Zustand aktiver Genexpression. Dieses Acetylierungsniveau verringert sich um das zwei- bis vierfache nach TPA-Behandlung. Der 3'-Bereich des Strukturgens zeigt eine um ein Vielfaches niedrigere Acetylierung von H3 und H4. Während in exponentiell wachsenden Zellen in der 3'-Region des Exons 1 (Fragment Nr. 12) Werte von 4,5% (H3) und 4% (H4) gemessen wurden, sinkt die Acetylierung im Exon 2 (Fragment Nr. 13) ca. um das 8-fache und noch weiter in Exon 3 und 5 (Fragmente Nr. 14, 15) ab. Innerhalb dieser Regionen ist keine Korrelation von Genaktivität und Acetylierungsgrad feststellbar.

Eine große Differenz im Acetylierungsniveau ergibt sich beim Vergleich der Regionen um die Fragmente 12 und 15. Zum Zeitpunkt aktiver Gentranskription unterscheidet sich der ermittelte Acetylierungsgrad für H3 um den Faktor 100. Dieser Befund ist besonders deshalb unerwartet, da es sich bei beiden Regionen um transkribierte Bereiche handelt. In Richtung 5'-Bereich des Promotors sinkt das Acetylierungsniveau im Vergleich zur Region um die Transkriptionsstartpunkte ab, erreicht aber nicht die gleichen geringen Werte wie innerhalb des 3'-Bereiches des Strukturgens (Vergleiche Fragment 1 mit den Fragmenten 14 und 15). Im Bereich der Region um die E-Box E0 entspricht die gemessene Acetylierung dem Niveau der Fragmente 14 und 15.



**Abbildung 9** Acetylierungsniveau am *Zyklin D2*-Locus (HL-60-Zellen). **A:** HL-60-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml TPA stimuliert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde unter Standard-Bedingungen eine ChIP-Analyse mit Antikörpern gegen acetyliertes Histon H3 und -H4 durchgeführt. Die jeweils angegebenen Bereiche des *Zyklin D2*-Locus wurden durch analytische PCR-Reaktionen untersucht. Die erhaltenen Produktintensitäten wurden quantifiziert und anhand adäquater Input-Verdünnungsstufen wurden die absoluten ChIP-Effizienzen ermittelt. Bereiche, an denen keine Balken eingetragen sind wurden nicht untersucht. **B:** In einem zweiten unabhängigen Experiment wurde die ChIP-Analyse wiederholt, um die grundlegenden Beobachtungen aus A zu bestätigen. Bereiche, an denen keine Balken eingetragen sind, wurden nicht untersucht. **C:** Dargestellt sind der *Zyklin D2*-Locus und die in der ChIP analysierten Bereiche.

Wird der *Zyklin D2*-Promotorbereich über ein erhöhtes lokales Acetylierungsniveau definiert, so handelt es sich innerhalb der gesamten analysierten 5 kb stromaufwärts der Transkriptionsstartpunkte (Fragmente 1-11) um potentielle Promotorregion.

Ein zusätzlicher Befund bei der promotorweiten Analyse der Acetylierung am *Zyklin D2*-Locus betrifft die H3-Acetylierung in exponentiell wachsenden Zellen (*Zyklin D2*-Gen aktiv). Werden die absoluten ChIP-Effizienzen für die Ac-H3-ChIPs auf den Fragmenten 1 bis 12 verglichen, so ergibt sich ein deutlicher Anstieg der H3-Acetylierung in Richtung der Transkriptionsstartpunkte. Im Bereich des Exons 1 übersteigen die ermittelten Werte die Ac-H4-Effizienzen, die ansonsten fast überall deutlich über den Ac-H3-Werten liegen.

In der Abbildung 6, Seite 42, wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor c-Myc *in-vivo* präferenziell die E-Boxen E3 und / oder E3' (Fragment Nr. 7) besetzt. Auch das Protein TRRAP wurde innerhalb dieser Region nachgewiesen. Werden über diese Region Histon-Acetyltransferasen rekrutiert, so könnten diese über ihre katalytische Aktivität entweder lokal oder promotorweit zu einer erhöhten Acetylierung der Core-Histone beitragen. Wird das Acetylierungsniveau im Bereich des Fragmentes Nr.7 mit den umgebenden Regionen (5, 9, 10) verglichen, so ist in diesem Zusammenhang kein aussagekräftiger Unterschied im Acetylierungsniveau detektierbar, d.h. es ist keine derart eng umgrenzte lokale Hyperacetylierung erkennbar.

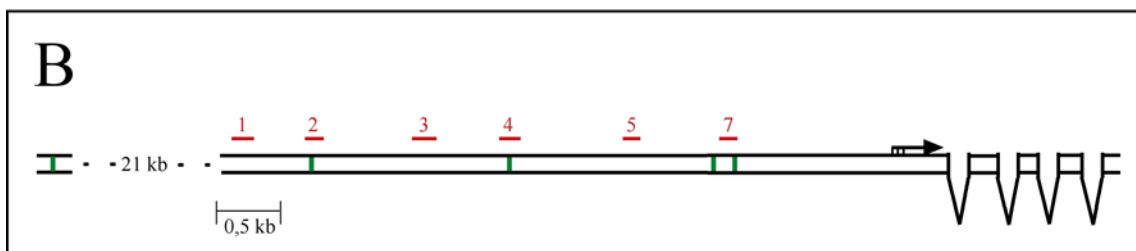
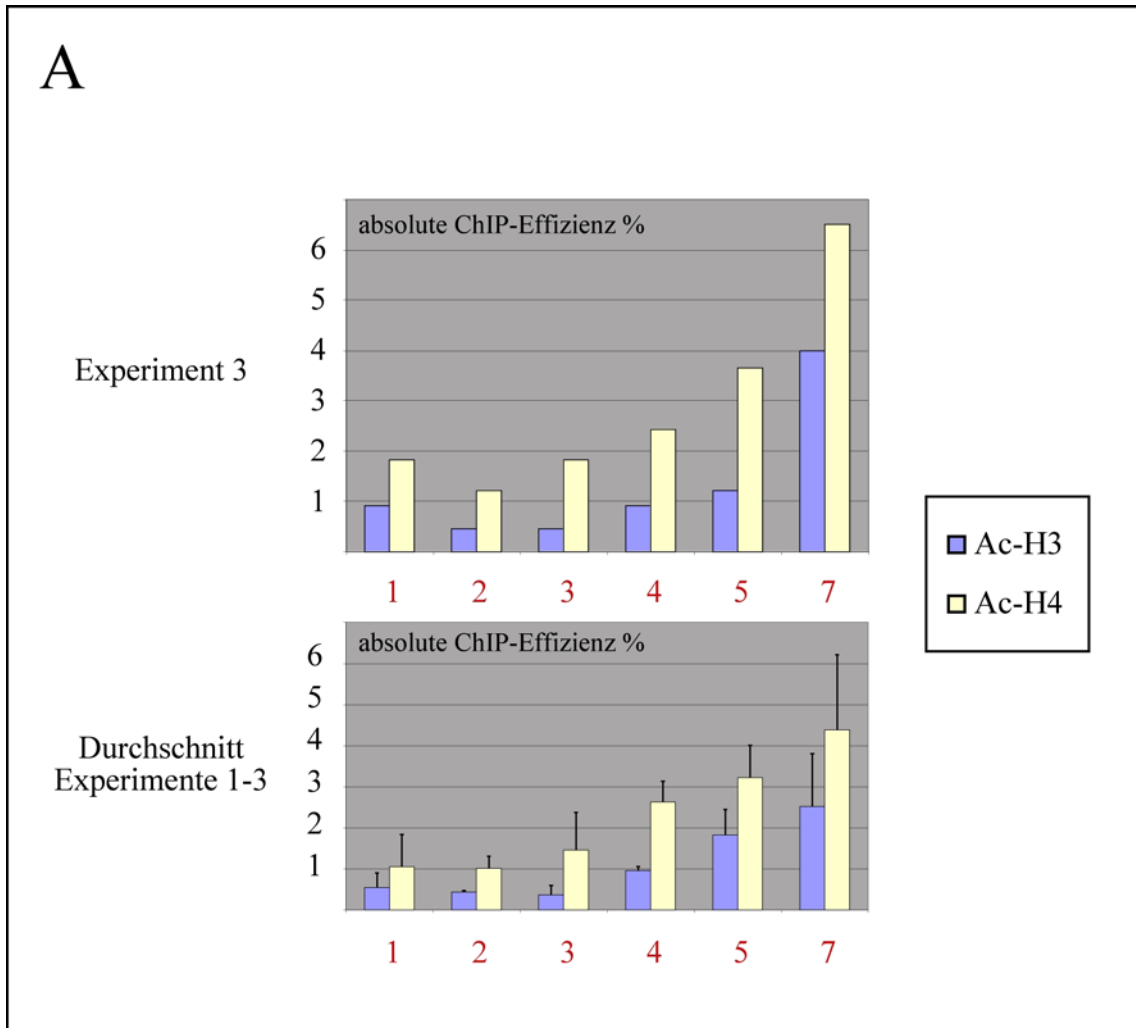
Da es sich bei der Chromatin-IP um eine sehr komplexe Methode handelt und bei einer Vielzahl von Arbeitsschritten versuchsbedingte Fehler resultieren können, wurde ein unabhängiges zweites ChIP-Experiment durchgeführt, um die Ergebnisse des zuvor beschriebenen Kartierungsexperiments zu verifizieren. In diesem Experiment wurden die PCR-Analysen auf einer limitierten Menge von Fragmenten durchgeführt, die so ausgewählt wurden, dass die Kernaussagen des ersten Experiments überprüft werden konnten. Die Abbildung 9B, Seite 49, zeigt die ermittelten absoluten ChIP-Effizienzen. Die folgenden bereits erwähnten Befunde zum Acetylierungsstatus am *Zyklin D2*-Promotor können durch die Ergebnisse des zweiten Experiments bestätigt werden:

- 1) Die TPA-Stimulation führt zu einer deutlichen Verringerung der Acetylierung von H3 und H4, die über weite Bereiche des Promotors nachweisbar ist (Fragmente Nr. 4, 5, 7, 11).
- 2) Das Acetylierungsniveau für H3 und H4 verringert sich um ein Vielfaches an der Grenze von Exon 1 zu Exon 2, bzw. innerhalb des ersten Introns (Fragmente Nr. 11 und 13).
- 3) Die Bereiche niedrigster Acetylierung befinden sich in der 3'-Region des Strukturgens (Fragment 15) und im Bereich der E-Box E0 (Fragment Nr. 0).

4) Die generelle Acetylierungsintensität für H3 und H4 innerhalb des Promotors steigt in 5'-3'-Richtung zu den Transkriptionsstartpunkten (Fragmente Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11). Im Exon 1 ist die H3-Acetylierung maximal, nur in dieser Region übersteigen die Werte für H3 die ermittelten H4-Effizienzen.

Obwohl hinsichtlich dieser allgemeinen Befunde das erste Kartierungsexperiment qualitativ bestätigt werden konnte, weist der Vergleich der ermittelten Acetylierungsintensitäten im 5'-Bereich des Promotors auf einigen Fragmenten hohe Differenzen auf (Fragmente Nr. 1,3). Um eine genauere Aussage zum Acetylierungsniveau innerhalb dieses Promotorbereichs machen zu können, wurden Daten aus einem dritten unabhängigen ChIP-Experiment einbezogen. In der Abbildung 10A, Seite 52, sind die entsprechenden ChIP-Effizienzen dieses Experiments für exponentiell wachsende HL-60-Zellen dargestellt. Die PCR-Analysen beschränken sich auf die Fragmente Nr. 1 bis 7. Ebenfalls dargestellt sind die Durchschnittswerte der drei unabhängigen ChIP-Analysen für diese Region, sowie die berechneten Standard-Abweichungen (siehe Abbildung 10A, unten). Das Experiment 3 bestätigt erneut die bereits beschriebene Zunahme der Acetylierungsintensität in 5'-3'-Richtung. Der Anstieg der Acetylierung erfolgt tendenziell stetig.

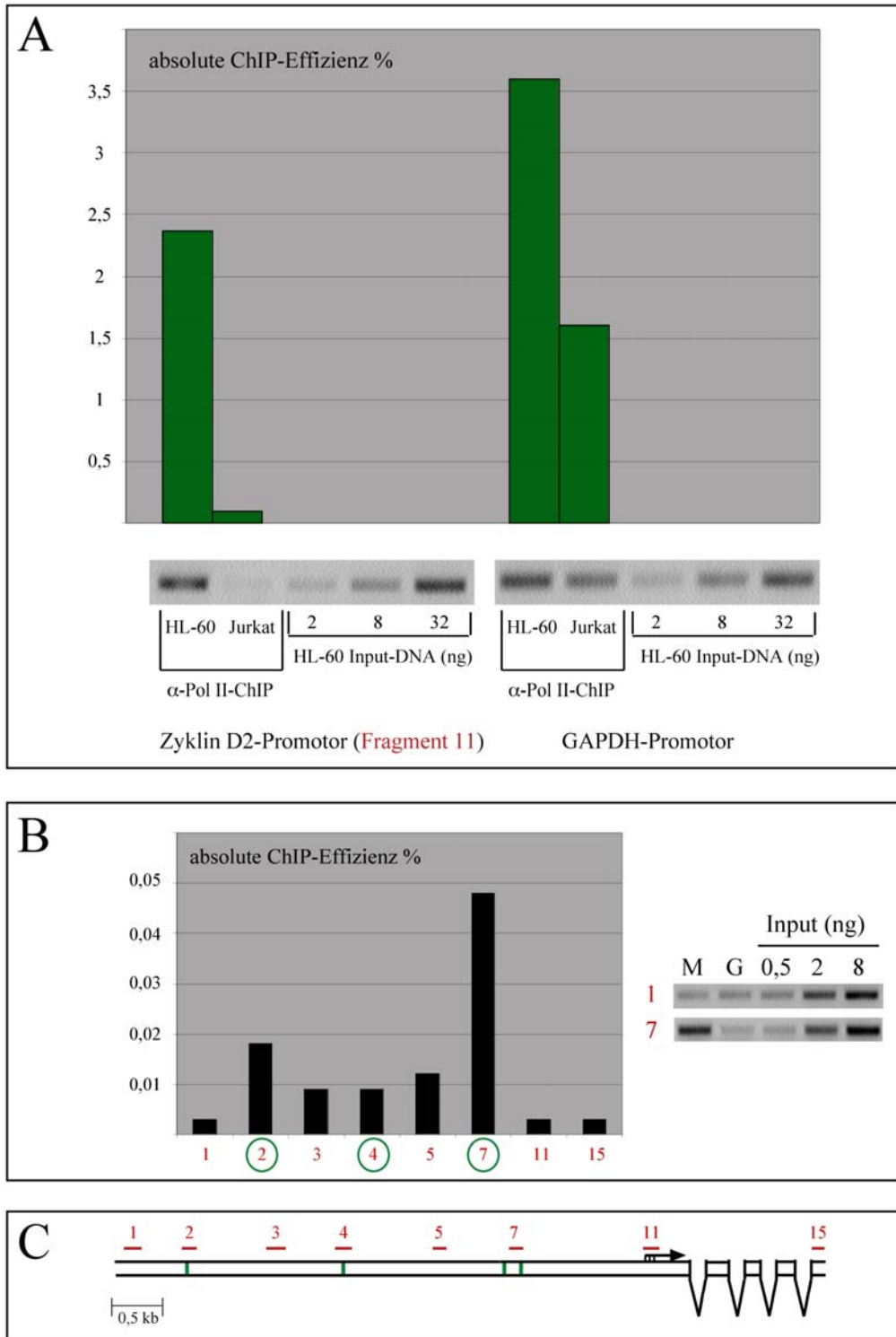




**Abbildung 10** Acetylierungsniveau im 5'-Bereich des *Zyclin D2*-Promotors (HL-60-Zellen). **A:** Exponentiell wachsende HL-60-Zellen wurden nach Standard-Protokoll für die ChIP-Analyse aufgearbeitet. In einem unabhängigen dritten Experiment wurde die Acetylierung an H3 und H4 ermittelt und ist als absolute ChIP-Effizienz dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sind die Mittelwerte aus den drei Experimenten sowie die resultierenden Standard-Abweichungen dargestellt. Für das Fragment Nr.2 fließen nur je 2 Werte in die Berechnung ein. **B:** Dargestellt sind der *Zyclin D2*-Locus und die in der ChIP analysierten Bereiche.

### 3.6 Interne ChIP-Normalisierung mit Daten zur RNA-Polymerase II-Besetzung des GAPDH-Promotors

Sollen mit dem ChIP-Verfahren Zustände in verschiedenen Zellen verglichen werden, so sollten für eine adäquate Interpretation der erhaltenen Daten zusätzlich interne Kontrollen berücksichtigt werden. Ein Vergleich der ermittelten absoluten ChIP-Effizienzen ist nur bedingt aussagekräftig, da es keine Möglichkeit gibt zu überprüfen, ob die Formaldehyd-Fixierung in den unterschiedlichen Zelltypen gleich effizient abläuft. Soll die Besetzung eines Promotors durch einen Transkriptionsfaktor analysiert werden, so bietet sich ein vergleichendes lokales Kartierungsexperiment an. Hierbei kann neben den absoluten ChIP-Effizienzen immer auch die Anreicherung der Zielregion im Vergleich zu benachbarten Fragmenten dargestellt werden. Eine zweite Möglichkeit Daten aus zwei verschiedenen Zelltypen zu vergleichen stellt eine interne Normalisierung der absoluten ChIP-Effizienzen dar. Hierfür wurde in dieser Arbeit mit *GAPDH* ein Haushaltsgen für die Analyse ausgewählt. Vergleichbare Mengen *GAPDH* mRNA in Jurkat und HL-60-Zellen (siehe Abbildung 4B, Seite 37) implizieren eine vergleichbare *GAPDH*-Genaktivität. Wird vorausgesetzt, dass aus diesem Grund die Besetzung durch die RNA-Polymerase-II gleich ist, so kann jedes ChIP-Experiment intern mit Daten aus einer RNA-Pol-II-ChIP normalisiert werden. Das Balkendiagramm (siehe Abbildung 11A, Seite 54) zeigt die absoluten ChIP-Effizienzen nach RNA-Pol-II-Chromatin-IPs im Vergleich von HL-60- und Jurkat-Zellen. In den PCR-Analysen wurden das Fragment Nr.11 des *Zyklin D2*-Promotors, sowie für die Normalisierungskontrolle ein Fragment im Bereich des *GAPDH*-Transkriptionsstartpunktes amplifiziert. Die absoluten ChIP-Effizienzen entsprechen im Fall des *Zyklin D2*-Promotors 2,4% in HL-60- und 0,1% in Jurkat-Zellen. Für die Normalisierungskontrolle wurde auf den gleichen ChIP-DNA-Ansätzen die entsprechende Analyse auf dem *GAPDH*-Fragment durchgeführt. Aus diesem Experiment resultiert eine leicht erhöhte absolute ChIP-Effizienz im Ansatz mit HL-60-Zellysat. Der ermittelte Quozient der Effizienzen in HL-60 und Jurkat-Zellen beträgt 2,25. Dieser Wert kann also als Normalisierungsfaktor beim Vergleich von ChIP-Daten aus HL-60- und Jurkat-Zellen herangezogen werden. Nach Normalisierung mit diesem Wert resultiert ein 11-facher Unterschied in der RNA-Pol-II-Besetzung am *Zyklin D2*-Promotor, welcher dem ermittelten Unterschied im mRNA-Expressionsniveau (siehe Abbildung 4B, Seite 37) zugrunde liegt.



**Abbildung 11** Interzelluläre ChIP-Normalisierung und Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors in Jurkat-Zellen durch c-Myc. **A:** Unter identischen Bedingungen wurden in HL-60- und Jurkat-Zellen ChIP-Analysen zur Besetzung von *Zyklin D2*- und *GAPDH*-Promotor durch die RNA-Pol-II durchgeführt. Die resultierenden Produkte wurden quantifiziert und anhand von HL-60-Input-Verdünnungsreihen wurden absolute ChIP-Effizienzen berechnet. Zuvor ist ausgetestet worden, dass die resultierenden Unterschiede beim Vergleich identischer Input-DNA-Mengen aus HL-60 und Jurkat-Zellen vernachlässigbar klein sind. Aus dem berechneten Unterschied der RNA-Pol-II-Besetzung in HL-60 und Jurkat Zellen wurde ein inter-zellulärer Normalisierungsfaktor von 2,25 berechnet. **B:** Im Rahmen einer Standard ChIP-Analyse wurde in Jurkat-Zellen die Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors durch den Transkriptionsfaktor c-Myc analysiert. Dargestellt sind die berechneten absoluten ChIP-Effizienzen im Balkendiagramm. Als Beispiele für zwei der analysierten Regionen wurden die zugrundeliegenden PCR-Produkte abgebildet. M:  $\alpha$ -c-Myc-ChIP; G:  $\alpha$ -Gal 4 (DBD)-ChIP. **C:** Dargestellt sind der *Zyklin D2*-Locus und die in der ChIP analysierten Bereiche.

### 3.7 In-vivo-Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors durch c-Myc (Jurkat-Zellen)

Eine wesentliche Voraussetzung für die spezifische Regulation eines Gens ist die Präsenz der essentiellen spezifischen Transkriptionsfaktoren. Für den Faktor c-Myc konnte eine spezifische Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors im Zustand aktiver Gentranskription in HL-60-Zellen nachgewiesen werden. Die Besetzung des Promotors impliziert nicht notwendigerweise, dass diese Interaktion für die vollständige Induktion des Gens ausreicht. Sehr viel wahrscheinlicher ist, dass ein spezifischer qualitativer Teilaspekt des Gesamtprozesses reguliert wird. Dieser könnte im Fall des Faktors c-Myc die Gewährleistung bzw. Aufrechterhaltung eines hohen Acetylierungsniveaus sein. In Jurkat-Zellen ist die Voraussetzung gegeben, dass c-Myc-Protein vorhanden, aber keine *Zyklin D2*-mRNA-Expression nachweisbar ist (siehe Abbildung 4, Seite 37). Damit stellen diese Zellen ein geeignetes Modell dar, um Daten zur Genaktivität, zum Acetylierungsniveau und zur spezifischen Besetzung durch c-Myc zu erhalten und diese mit den entsprechenden Ergebnissen aus HL-60-Zellen zu vergleichen.

Um zu überprüfen, ob der Faktor c-Myc in Jurkat-Zellen den Promotor des *Zyklin D2*-Gens besetzt, wurde in exponentiell wachsenden Jurkat-Zellen eine ChIP-Analyse durchgeführt. Die Abbildung 11B auf Seite 54 zeigt die absoluten ChIP-Effizienzen für den Faktor c-Myc. Als Beispiel in die Abbildung eingefügt sind die PCR-Analysen auf den Fragmenten Nr. 1 und 7. Eine eindeutige Besetzung im Bereich der E-Boxen E3 und E3' (Fragment Nr. 7) ist nachweisbar. Die absolute ChIP-Effizienz beträgt in dieser Region 0,048% und liegt damit um den Faktor 16 höher als die niedrigsten ermittelten Werte die mit 0,003% auf den Fragmenten Nr. 1, 11 und 15 detektiert werden konnten. Deutlich über diesen Hintergrundwerten liegen die Effizienzen bei den Fragmenten Nr. 2, 3, 4 und 5. Im Fall der Jurkat-Zellen kann keine eindeutige Aussage zur Besetzung der E-Boxen E1 und E2 gemacht werden. Während auf Fragment 2 insgesamt die zweithöchste Effizienz ermittelt wurde, ist der entsprechende Wert für Fragment 4 nur etwa halb so hoch und liegt, im Gegensatz zum Experiment mit HL-60-Zellen, im gleichen Bereich wie die unmittelbar benachbarten Regionen (Fragmente Nr. 3 und 5). Auffällig ist, dass die ermittelte absolute ChIP-Effizienz auf dem Fragment 7 mit ca. 0,05% um den Faktor 7,4 geringer ist, als die entsprechenden Werte aus den Experimenten in HL-60-Zellen (siehe Abbildung 6B, Seite 42). Mit der RNA-Pol-II / *GAPDH*-Kontrolle normalisiert resultieren Unterschiede im Bereich des Faktors 3. Aus diesem Wert und dem spezifischen lokalen Besetzungsprofil in Jurkat-Zellen geht hervor,

dass sich der eindeutige Unterschied der *Zyklin D2*-Genaktivität in Jurkat und HL-60-Zellen nicht unmittelbar aus der Besetzung des Promotors durch c-Myc ableiten lässt.

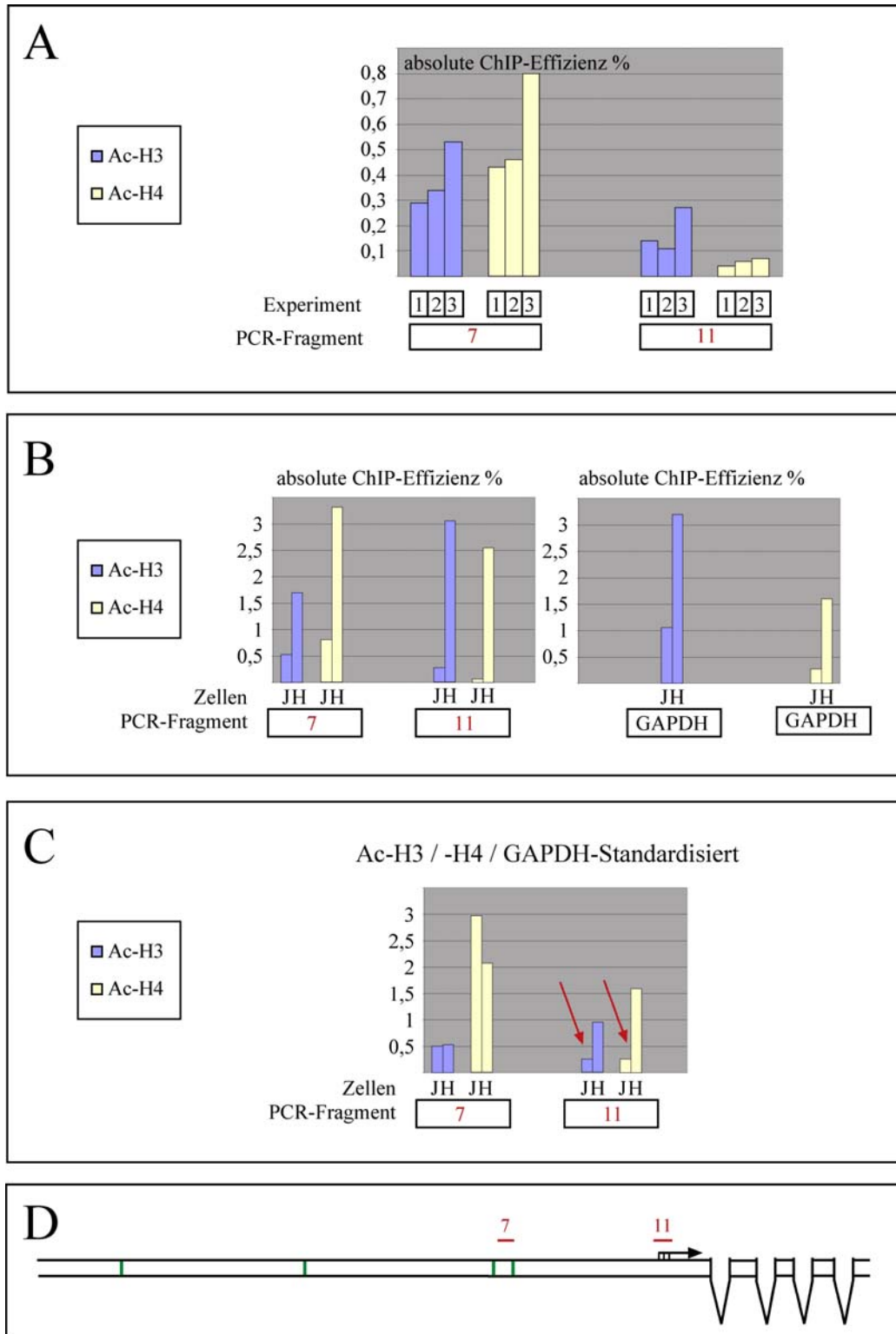
Die eindeutig nachweisbare spezifische Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors durch c-Myc reicht nicht aus, um in Jurkat-Zellen die Expression des Gens zu induzieren.

### 3.8 Acetylierungsniveau am *Zyklin D2*-Locus (Jurkat-Zellen)

Eine mögliche Funktion des c-Myc-Proteins im Rahmen eines Aktivierungsprozesses kann die Aufrechterhaltung eines bestimmtem Acetylierungsniveaus im Promotorbereich sein. Da für den Faktor c-Myc eine Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors in Jurkat-Zellen gezeigt werden konnte, diese Interaktion aber nicht zur Induktion der Genexpression führt, stellt sich die Frage nach dem spezifischen Acetylierungsstatus in Jurkat-Zellen.

In drei unabhängigen ChIP-Experimenten wurde die Acetylierung der Histone H3 und H4 im Bereich der *Zyklin D2*-Promotorfragmente Nr. 7 und 11 analysiert (siehe Abbildung 12A, Seite 58). Beim Vergleich der absoluten ChIP-Effizienzen wird ein aussagekräftiger qualitativer Unterschied zur Acetylierung in HL-60-Zellen deutlich: Im Bereich der E-Boxen E3 und E3' (Fragment Nr. 7) ist im Vergleich mit der Startpunkt-Region eine erhöhte Acetylierung erkennbar. Für H3 liegt die gemessene Acetylierung bei Fragment 7 im Durchschnitt 2,3 mal so hoch wie bei Fragment 11. Für H4 ist der Effekt noch deutlicher ausgeprägt. Durchschnittlich resultiert eine 10-fach höhere Acetylierung im Bereich des Fragmentes Nr. 7. Wie bereits gezeigt wurde, ist die H3-Acetylierung in exponentiell wachsenden HL-60-Zellen innerhalb der Startpunktregion erhöht (siehe Abbildung 9, Seite 49). Der aus zwei Experimenten ermittelte durchschnittliche Anstieg für H3 entspricht dort einem Faktor von 2,2. Die H4-Acetylierung bleibt konstant (Faktor 0,9). In der Abbildung 12B, Seite 58, ist ein direkter Vergleich der Acetylierungsintensitäten in Jurkat- (Experiment 3) und HL-60-Zellen (Experiment 2, siehe auch Abbildung 9B, Seite 49) dargestellt. In beiden analysierten Regionen konnte eine erhöhte H3- und H4-Acetylierung in HL-60-Zellen ermittelt werden. Wie im Fall der vergleichenden Analyse zur c-Myc-Besetzung stellt sich die Frage, ob das tatsächliche Acetylierungsniveau in HL-60-Zellen erhöht ist, oder ob die verschiedenen ChIP-Effizienzen einen Zell-spezifischen Unterschied in der allgemeinen Crosslinking-Effizienz widerspiegeln.

Um im speziellen Fall des Acetylierungsniveaus zu einer genaueren vergleichenden Aussage zu kommen, wurde eine weitere interne Normalisierung durchgeführt. Hierbei wurde direkt aus den jeweiligen DNA-Ansätzen nach Ac-H3- und Ac-H4-ChIP durch PCR-Analyse das Acetylierungsniveau für H3 und H4 im Bereich des *GAPDH*-Transkriptionsstartpunktes ermittelt. Die Abbildung 12B, Seite 58, rechtes Diagramm zeigt die resultierenden absoluten ChIP-Effizienzen. Durch diese Werte wurden die erhaltenen Daten zur Acetylierung am *Zyklin D2*-Promotor dividiert (Normalisierung). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 12C, Seite 58, dargestellt:



**Abbildung 12** Acetylierungsniveau am *Zyclin D2*-Promotor im Vergleich HL-60- versus Jurkat-Zellen. **A:** In drei unabhängigen Standard-ChIP-Experimenten wurde das Acetylierungsniveau für H3 und H4 am *Zyclin D2*-Locus in Jurkat-Zellen untersucht. Dargestellt sind die jeweils resultierenden absoluten ChIP-Effizienzen im Bereich der Fragmente 7 und 11. **B:** Dargestellt ist ein Vergleich der Histon-Acetylierung in HL-60 versus Jurkat-Zellen. Die zugrundeliegenden Experimente sind das Experiment Nr. 3 aus Jurkat-Zellen und das Experiment Nr.2 aus HL-60-Zellen (siehe Abbildung 9B, Seite 49). Auf den jeweiligen ChIP-DNA-Proben wurden PCR-Analysen zur Bestimmung der Acetylierung am GAPDH-Transkriptionsstartpunkt durchgeführt. Die resultierenden absoluten ChIP-Effizienzen sind im rechten Diagramm dargestellt. **C:** Die in **B** abgebildeten Werte zur Histon Acetylierung am *Zyclin D2*-Locus im Vergleich HL-60 versus Jurkat Zellen wurden mit den Daten zur Acetylierung am GAPDH-Promotor inter-zellulär normalisiert und als Balkendiagramm dargestellt. Die roten Pfeile deuten auf die unterschiedliche Acetylierungsintensität in Jurkat und HL-60-Zellen im Bereich der Startpunktregion hin. **D:** Dargestellt sind der *Zyclin D2*-Locus und die in der ChIP analysierten Bereiche.

Nach Normalisierung relativieren sich die ermittelten Unterschiede im Acetylierungsniveau im Vergleich von Jurkat- *versus* HL-60-Zellen im Bereich des Fragmentes Nr. 7. Deutlich anders verhält es sich innerhalb der Startpunktregion (Fragment Nr. 11). In diesem Bereich bleibt auch nach Normalisierung mit den *GAPDH*-Acetylierungsdaten ein 4- bzw. 6-facher Unterschied im H3- bzw. H4-Acetylierungsniveau erhalten.

Zusammenfassend ergibt sich im Vergleich der beiden Zellkultursysteme folgendes Bild zum Acetylierungsstatus:

Obwohl Jurkat-Zellen keine oder vergleichbar geringe *Zyklin D2*-Genaktivität aufweisen, bleibt das ermittelte Acetylierungsniveau im Bereich der E-Boxen E3 und E3' konstant, wenn intern mit Daten zur Acetylierung am *GAPDH*-Locus normalisiert wird. Ein deutlicher Unterschied zeigt sich im Bereich der Transkriptionsstartpunkte. Sowohl für H3 als auch für H4 ergibt sich in Jurkat-Zellen ein deutlich vermindertes Acetylierungsniveau in dieser Region.

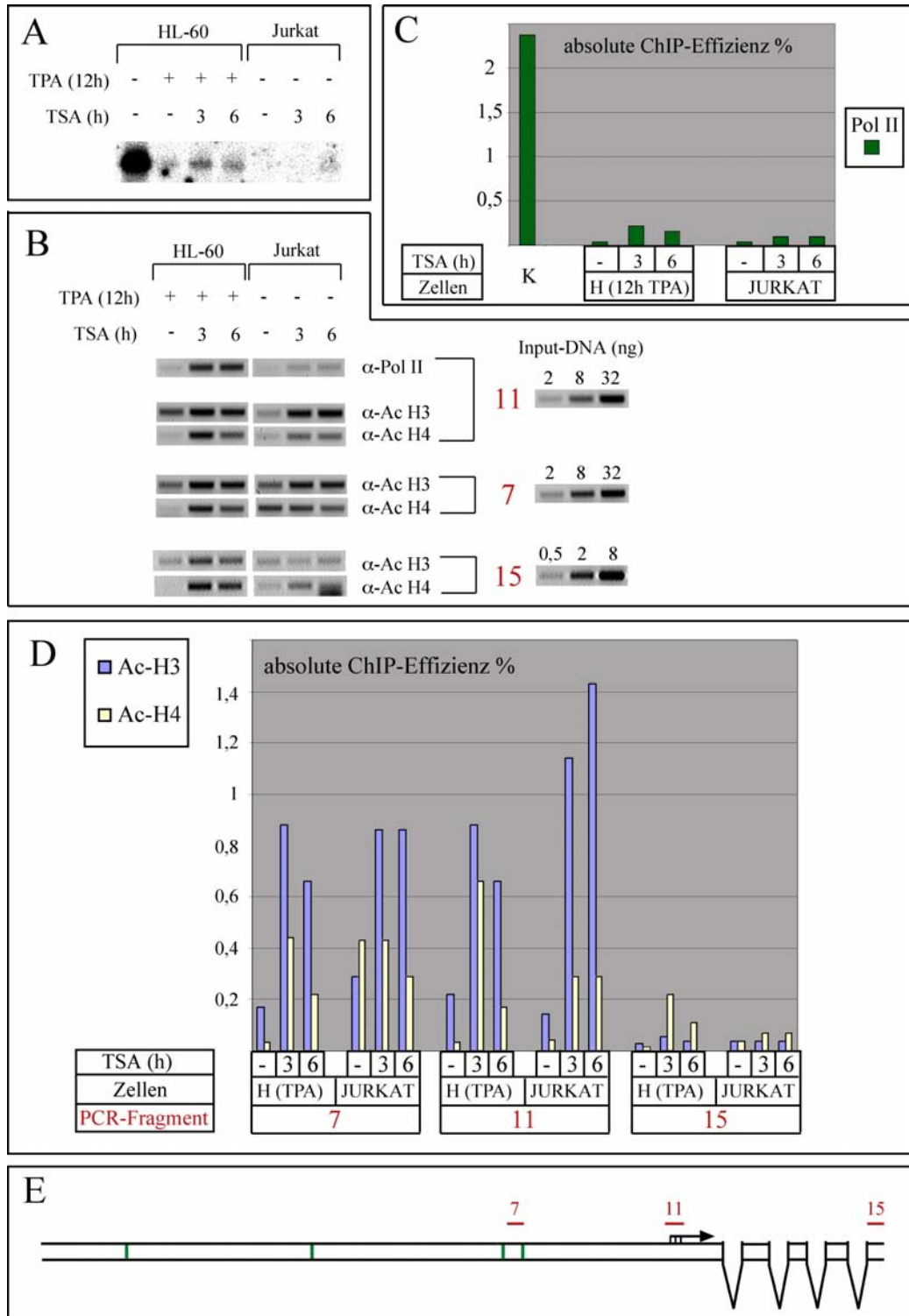


### 3.9 Versuche zur Induzierbarkeit des *Zyklin D2*-Promotors durch Trichostatin A: Einflüsse auf Acetylierungsniveau und Genaktivität

Die zentrale Fragestellung im Rahmen der vorliegenden Arbeit betrifft den Einfluss von Acetylierung sowie der Promotorbesetzung durch c-Myc bzw. Mad1 auf die Regulation des humanen *Zyklin D2*-Gens. Um zusätzliche Informationen zum spezifischen Anteil dieser Parameter an der vollständigen Induktion des Gens zu erhalten, wurde ein Experiment mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) durchgeführt. Hierbei sollte primär die Frage beantwortet werden, ob das inaktive Gen durch die Inhibierung der endogenen Deacetylasen reinduziert werden kann und auf welche Weise eine mögliche Reinduktion mit dem Acetylierungsstatus am Promotor korreliert. Für das Experiment wurden HL-60-Zellen für 12 h mit TPA stimuliert, um das *Zyklin D2*-Gen herunter zu regulieren. Anschließend wurden diese Zellen sowie parallel Jurkat-Zellen für 3 h und 6 h in Medium mit 1  $\mu$ M TSA inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils parallel Proben für eine Northern-Blot-Analyse, sowie für die Durchführung von Chromatin-IP-Experimenten abgenommen. Für die Northern-Blot-Analyse wurde zum Vergleich zusätzlich RNA aus exponentiell wachsenden HL-60-Zellen mit auf das Gel aufgetragen. Die Abbildung 13A, Seite 61, zeigt die *Zyklin D2* mRNA (6,4 kb-Transkript) vor und nach Stimulation mit TSA:

Wie bereits in der Abbildung 8A, Seite 47, gezeigt, ist nach 12 h TPA-Stimulation eine deutliche Abnahme der *Zyklin D2* mRNA-Menge in HL-60-Zellen erkennbar. In exponentiell wachsenden Jurkat-Zellen ist keine *Zyklin D2*-Expression nachweisbar. Nach drei Stunden TSA-Behandlung steigt die *Zyklin D2* mRNA-Menge in HL-60-Zellen minimal an. Es handelt sich hierbei um einen transienten Anstieg, da zum 6 h-Zeitpunkt die spezifische mRNA-Menge bereits wieder abnimmt. In Jurkat-Zellen ist nach 3 h TSA-Behandlung keine Reinduktion des Gens nachweisbar. Zum 6 h-Zeitpunkt ist ein schwaches spezifisches Signal detektierbar. Sowohl in Jurkat- als auch in vorstimulierten HL-60-Zellen führt die Inhibierung endogener Deacetylasen zu einer minimalen Reinduktion des *Zyklin D2*-Gens.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 13** Reinduktion des inaktiven *Zyklin D2*-Gens durch TSA. HL-60-Zellen wurden für 12h mit 50 ng/ml TPA vorbehandelt. Diese Zellen und unbehandelte Jurkat-Zellen wurden für 3- und 6h mit 1  $\mu$ M Trichostatin A (TSA) behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde parallel RNA isoliert und eine Standard-ChIP-Analyse durchgeführt. **A:** In der Northern-Analyse wurde durch den Einsatz eines humanen *Zyklin D2*-cDNA-Fragmentes die jeweils spezifische *Zyklin D2* mRNA-Menge aus 20  $\mu$ g aufgetragener Gesamt-RNA detektiert. Als Referenz wurde RNA aus unbehandelten HL-60-Zellen mit untersucht. **B:** Dargestellt sind die analytischen PCR-Reaktionen der ChIP-Experimente mit Angabe der jeweils untersuchten Bereiche (rote Zahlen). **C:** Die aus der ChIP-Untersuchung (**B**) resultierenden absoluten ChIP-Effizienzen für die RNA-Pol-II-Besetzung des Fragmentes Nr. 11 sind im Balkendiagramm dargestellt. Als Referenz ist der aus einem vorangegangenen Experiment hervorgehende Wert (siehe Abbildung 11A, Seite 54) für die RNA-Pol-II-Besetzung in unbehandelten HL-60-Zellen als Kontrolle mit dargestellt (K). **D:** Die aus der ChIP-Analyse (in **B**) hervorgehenden absoluten ChIP-Effizienzen für die Histon-Acetylierung sind im Balkendiagramm dargestellt. **E:** Dargestellt sind der *Zyklin D2*-Locus und die in der ChIP analysierten Bereiche.

Im parallel durchgeführten ChIP-Experiment ist die Besetzung der Startpunktregion durch die RNA-Polymerase-II und das Acetylierungsniveau in drei Bereichen des *Zyklin D2*-Locus dokumentiert. In der Abbildung 13B, Seite 61, sind die einzelnen PCR-Analysen dargestellt. Die Abbildung 13C, Seite 61 zeigt die absoluten ChIP-Effizienzen zur RNA-Pol-II-Besetzung im Balkendiagramm. Sowohl in TPA-stimulierten HL-60- als auch in Jurkat-Zellen ist ein Anstieg der Polymerase-Besetzung des Promotors nach TSA-Behandlung nachweisbar. Da in diesem Experiment auf Chromatin-IP-Ebene keine vergleichende Kontrolle zur Polymerase-Besetzung in exponentiell wachsenden HL-60-Zellen durchgeführt wurde, ist im Balkendiagramm als Bezugspunkt die absolute ChIP-Effizienz aus einem vorangegangenen Experiment (siehe Abbildung 11A, Seite 54) dargestellt (K). Obwohl diese Daten aus einem unabhängigen ChIP-Experiment stammen, wird deutlich, dass auch bezogen auf die RNA-Polymerase-II-Besetzung eine vergleichbar geringe Reinduktion des *Zyklin D2*-Gens vorliegt. In beiden Zelltypen bewirkt die TSA-Behandlung eine nur schwache Zunahme der Promotor-Besetzung. Diese Zunahme vollzieht sich innerhalb der ersten drei Stunden nach TSA-Zugabe. Nach 6 h ist das gleiche Besetzungsniveau durch die Polymerase wie zum 3 h-Zeitpunkt erkennbar. Die vergleichbar schwache Reinduktion auf Ebene der RNA-Pol-II-Besetzung korreliert mit dem ebenfalls geringen Anstieg der absoluten mRNA-Mengen unter TSA-Einfluß.

Parallel zum Nachweis der Polymerase-Besetzung wurde im ChIP-Experiment das Acetylierungsniveau der Histone H3 und H4 analysiert. In Abbildung 13B, Seite 61, sind die analytischen PCR-Reaktionen und in Abbildung 13D die daraus ermittelten absoluten ChIP-Effizienzen im Balkendiagramm dargestellt. Im Fall des Histons H3 ergibt sich nach TSA-Behandlung ein deutlicher Anstieg der Acetylierung am *Zyklin D2*-Promotor sowohl in HL-60- als auch in Jurkat-Zellen. Das Ausmaß dieses Anstiegs ist in HL-60-Zellen im Bereich der Fragmente 7 und 11 vergleichbar stark ausgeprägt. Im Gegensatz dazu ist in Jurkat Zellen nach TSA-Behandlung ein erhöhter Anstieg der H3-Acetylierung im Bereich der Transkriptionsstartpunkte feststellbar. Während sich die gemessene Acetylierung in der Region des Fragmentes 7 um einen Faktor von 3 erhöht, resultiert eine 8,1-fache Erhöhung der Acetylierungsintensität im Bereich der Startpunktregion. Im Bereich des Fragmentes 15 verändert sich das Acetylierungsniveau für H3 in beiden Zelltypen nur geringfügig.

Wird die Acetylierung des Histons H4 in beiden Zellen und innerhalb der drei analysierten Regionen betrachtet, so ergibt sich in allen Fällen ein eindeutig nachweisbarer Anstieg im Acetylierungsgrad. Die einzige Ausnahme stellt vor diesem Hintergrund das analysierte Fragment Nr.7 in Jurkat-Zellen dar. Wie bereits in der Abbildung 12, Seite 58, dokumentiert,

ist die relative Acetylierungsintensität in Jurkat-Zellen im Bereich dieser Region erhöht (im Vergleich zu der Region 11). In diesem Bereich führt die TSA-Behandlung zu keiner zusätzlichen Erhöhung der Histon H4-Acetylierung. Interessanterweise nimmt in allen analysierten Fällen das Acetylierungsniveau in HL-60-Zellen nach 6 h TSA-Stimulation wieder ab. Diese Abnahme korreliert mit der bereits beschriebenen Verringerung der mRNA-Menge zum 6 h-Zeitpunkt. Eine entsprechende Abnahme ist auch auf der Ebene der RNA-Polymerase-II-Besetzung nachweisbar.

Zusammenfassend wurde gezeigt: Eine Reinduzierbarkeit des *Zyklin D2*-Gens durch TSA-Behandlung ist möglich. Das Ausmaß dieses Prozesse ist im Vergleich zum Aktivitätsniveau in exponentiell wachsenden HL-60-Zellen jedoch sehr gering. Während die transkriptionelle Reinduktion des *Zyklin D2*-Gens (bezogen auf den Zustand in exponentiell wachsenden HL-60-Zellen) aufgrund der Northern-Analyse und der Daten zur RNA-Pol II-Besetzung mit einem Ausmaß von unter 10% abgeschätzt werden kann, erreicht die durch TSA reinduzierte Acetylierung Werte von bis zu 50% (vergleiche Abbildung 9, Seite 49). Durch die Inhibierung endogener Deacetylasen wird das Acetylierungsniveau am *Zyklin D2*-Locus promotorweit erhöht. Die einzige Ausnahme bildet in diesem Zusammenhang die Region der E-Boxen E3 und E3' in Jurkat-Zellen. In diesem Bereich kommt es zu keiner zusätzlichen Erhöhung der H4-Acetylierung durch TSA-Behandlung.

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Regulatorisch wirksame Potentiale bei der Zyklin D2-Geninduktion**

*Einführung (Regulatorisch wirksame Potentiale bei der Zyklin D2-Geninduktion):*

*Durch eine Reihe von Veröffentlichungen der letzten Jahre ist die Rolle des Zyklin D2-Gens als wichtiges c-Myc-Zielgen herausgearbeitet worden. In diesen Arbeiten wurde aufgezeigt, welcher Anteil dem Protein c-Myc bei der durch Mitogene induzierten Signalvermittlung zukommt. Die Rolle von c-Myc als Induktor des Zyklin D2-Gens wurde in Beziehung zu parallel mitaktivierten Signalwegen gesetzt (Dey et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Menge oder der Aktivität von c-Myc unmittelbare Auswirkungen auf das Expressionsniveau des Zyklin D2-Gens haben.*

*Unter bestimmten Umständen kann eine Aktivierung von c-Myc das inaktive endogene Zyklin D2-Gen induzieren, was ein in der Einleitung (siehe Abschnitt 2.3) bereits beschriebenes „Voranschreiten“ im Zellzyklus zur Folge hat (Bouchard et al. 1999; Perez-Roger et al. 1999). Der murine Zyklin D2-Promotor enthält „Konsensus“-E-Boxen, von denen eine in transienten Transfektionsexperimenten responsiv für Myc/Max/Mad-Effekte ist. Da die gemessenen Effekte gering sind, kann bezogen auf diese Transfektionsexperimente kein starkes quantitativ regulatorisches Potential der Myc/Max/Mad-Faktoren postuliert werden. Es wurde bereits mehrfach darauf hingewiesen, dass transiente Transfektionsexperimente wesentliche Aspekte der Transkriptionsregulation unberücksichtigt lassen (siehe Abschnitt 2.4.1). Vor diesem Hintergrund bleibt unklar, ob Faktoren des Myc/Max/Mad-Netzwerkes in vivo den endogenen Zyklin D2-Promotor besetzen. Obwohl die oben angesprochenen funktionellen Zusammenhänge zwischen c-Myc-Aktivierung, Zyklin D2-Induktion und Zellzyklus-Stimulation eindeutig herausgearbeitet wurden, besteht hinsichtlich der mechanistischen Funktion der Myc/Max/Mad-Faktoren weiter Unklarheit. Die Induktion des Zyklin D2 Gens könnte in diesem Zusammenhang durchaus auch indirekt erfolgen.*

*Durch den Nachweis physikalischer und funktioneller Interaktionen des Myc/Max/Mad-Netzwerkes mit HAT- bzw. HDAC-Komplexen, wurde in den abgeleiteten Modellen zunehmend ein direkter qualitativer Beitrag dieser Faktoren an der transkriptionellen Steuerung vorausgesetzt (Laherty et al. 1997; McMahon et al. 1998; McMahon et al. 2000; Amati et al. 2001). Im prototypischen Modell besteht dieser Beitrag bei Myc in der*

*Rekrutierung von HAT-Aktivität und bei Mad von entsprechender HDAC-Aktivität. Zunehmend deutlicher wird jedoch, dass sich die Interaktionen innerhalb des Myc/Max/Mad-Netzwerkes und das funktionelle Potential einzelner Mitglieder nicht mehr zufriedenstellend mit einem derart vereinfachten Modell beschreiben lassen (siehe Abschnitt 2.2.2). Für den Faktor c-Myc wurde bereits auf seine alternative Funktion als E-Box unabhängiger Repressor verwiesen (siehe Abschnitt 2.2.2). An diesem Beispiel wird deutlich, dass die Funktion einzelner Faktoren Kontext-spezifisch variieren kann. Daher ergibt sich die Notwendigkeit sehr viel genauer zu untersuchen, welche Funktion ein einzelner Faktor in einer speziellen Situation erfüllt. Dies ist auch gerade dann notwendig, wenn bestimmt werden soll, ob es sich bei einem Protein im speziellen Fall überhaupt um einen Transkriptionsfaktor im herkömmlichen Sinne handelt. Es gilt also am Beispiel der Zyklin D2-Induktion zu klären, ob Myc/Max/Mad-Faktoren direkt an der Transkriptionsregulation beteiligt sind und die Faktoren direkt die DNA besetzen oder ob die beobachteten Effekte indirekt vermittelt werden.*

*Für die Faktoren des Myc/Max/Mad-Netzwerkes ergeben sich im Fall der Zyklin D2-Geninduktion hauptsächlich die vier folgenden Fragen:*

- 1) Ist der endogene Zyklin D2-Promotor mit Faktoren des Myc/Max/Mad-Netzwerkes besetzt?*
- 2) Wie stellt sich das Besetzungsmuster am Promotor zeitlich aufgelöst dar?*
- 3) Welches qualitativ wirksame Potential weisen Faktoren des Myc/Max/Mad-Netzwerkes auf?*
- 4) Welche Signale sind zusätzlich zur Besetzung von Myc/Max/Mad-Faktoren für die volle Zyklin D2-Induktion erforderlich?*

*Darüberhinaus konnten bei der detaillierten Untersuchung des Acetylierungsstatus am Zyklin D2-Promotor zusätzliche Beobachtungen gemacht werden:*

- 5) Wie stellt sich die Acetylierungsintensität für H3 und H4 promotorweit dar?*

#### 4.1.1 Die Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors durch Faktoren des Myc/Max/Mad-Netzwerkes

In exponentiell wachsenden, unbehandelten HL-60-Zellen ist der *Zyklin D2*-Promotor mit dem Transkriptionsfaktor c-Myc besetzt. Dies konnte durch eine umfangreiche ChIP-Analyse am humanen Promotor gezeigt werden (siehe Abbildung 6, Seite 42). Im Bereich der E-Boxen E3 und E3' (Fragment 7) wurde die Besetzung durch c-Myc eindeutig nachgewiesen. Die E-Box E3 ist im murinen Promotor konserviert. In der bereits zitierten Veröffentlichung wurde diese E-Box als Myc/Max/Mad-responsiv in der transienten Transfektion dargestellt (Bouchard et al. 1999). Die Daten sind daher kompatibel. Da die beiden E-Boxen E3 und E3' weniger als 200 bp voneinander entfernt lokalisiert sind und bei der ChIP-Analyse das lokale Auflösungsvermögen methodisch bedingt begrenzt ist (siehe auch Abschnitt 5.3), konnte bei der Untersuchung nicht zwischen einer Besetzung von E3 oder E3' diskriminiert werden. Aus diesem Grund kann aus den vergleichbaren Werten für die Fragmente 6 und 8 nicht geschlossen werden, dass beide E-Boxen gleichmäßig stark mit c-Myc besetzt sind. Vielmehr müssen die in diesen Regionen ermittelten Daten als zusätzliche Spezifitätskontrolle für die Besetzung innerhalb dieser gesamten Region angesehen werden, die beide E-Boxen beinhaltet.

In diesem Bereich (Fragment 7) wurde die insgesamt höchste absolute ChIP-Effizienz mit 0,37% ermittelt. Die Spezifität dieser Daten wird deutlich, wenn das entsprechende c-Myc-Signal innerhalb dieses Bereiches mit dem Signal des Negativkontroll-Antikörpers verglichen wird.

Eine absolute ChIP-Effizienz von 0,37% bedeutet, dass 0,37% der im Ausgangslysat vorhandenen Promotorfragmente nach der c-Myc-ChIP insgesamt aus dem Gesamtansatz isoliert worden sind (siehe auch Abschnitt 5.3.2). Dieser Zahlenwert scheint klein zu sein, liegt aber eindeutig innerhalb der Größenordnung der von anderen Gruppen in der ChIP erzielten Ergebnisse (Kuras and Struhl 1999; Takahashi et al. 2000; Wells et al. 2000; Frank et al. 2001). Im Rahmen des experimentellen Ablaufs der ChIP-Analyse gibt es eine Reihe von Parametern mit der sich diese im allgemeinen eher geringen Ausbeuten hinreichend erklären lassen. Hierzu gehört der physiologische Zustand der nicht-synchronisierten Zellen und Zusammenhänge von optimaler Fixierungseffizienz und Nachweisbarkeit um nur zwei Stichworte zu nennen. Da es sich bei dieser Erscheinung jedoch um allgemein beobachtete, methodisch bedingte Phänomene handelt, die kaum etwas an der Qualität und

Spezifizierbarkeit von ChIP-Daten generell ändern, wird an dieser Stelle nicht mehr weiter auf diesen Sachverhalt eingegangen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Besetzungsmuster des c-Myc-Faktors über den gesamten *Zyklin D2*-Locus analysiert. Nach meinem Kenntnisstand handelt es sich hierbei um die umfangreichste Analyse zur Besetzung eines gesamten Genlocus durch einen Transkriptionsfaktor mit der ChIP-Technik. Bei diesem lokalen „Mapping“-Experiment ergab sich eine schwache Besetzung der E-Boxen E1 und E2, aber keine Besetzung der 20kb entfernt gelegenen E-Box E0 (siehe Abbildung 6, Seite 42). Die quantitativ ermittelten Werte für die Besetzung von E1 und E2 liegen nur etwa doppelt so hoch wie innerhalb des am Promotor ermittelten Hintergrundbereiches (Regionen ohne Konsensus-E-Boxen). Obwohl der resultierende Unterschied, ein Faktor von 2, innerhalb einer ChIP-Analyse an der Grenze der Interpretierbarkeit liegt, sprechen an dieser Stelle zwei Punkte dafür, dass die E-Boxen E1 und E2 in geringem Ausmaß mit c-Myc besetzt sind. Erstens liegen alle ermittelten Hintergrundwerte konsistent mindestens um die Hälfte niedriger und zweitens wurde durch Frau Dr. Karen Dohmann ein unabhängiges Kartierungsexperiment durchgeführt, welches die Besetzung der E-Boxen E1 und E2 bestätigte (Dr. Karen Dohmann persönliche Mitteilung). Insgesamt ergibt sich bei der Analyse des *Zyklin D2*-Promotors eine schwache Besetzung von E1 und E2 und eine starke Besetzung von E3 und/oder E3'.\*

Die Tatsache, dass keine Besetzung der E-Box E0 nachgewiesen werden konnte, unterstützt die Annahme, dass es sich bei diesem Bereich nicht um Promotorregion handelt und dass die entsprechende E-Box keine funktionelle Relevanz für die *Zyklin D2* Regulation durch c-Myc hat.

Neben der Besetzung durch c-Myc kann in unbehandelten Zellen auch eindeutig Besetzung durch Max gezeigt werden. Mad1 ist in diesem Zustand nicht physikalisch am *Zyklin D2*-Promotor assoziiert (siehe Abbildung 8, Seite 47). Diese Daten entsprechen den veröffentlichten Protein-Expressionsprofilen der Faktoren in HL-60-Zellen und sind mit den herkömmlichen Modellen zur Funktion des Myc/Max/Mad-Netzwerkes bei der Genregulation kompatibel.

\*In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, dass sich innerhalb einiger der analysierten Kontrollregionen E-Boxen befinden, die keine Konsensus-Sequenz aufweisen. Per Definition sind E-Boxen alle DNA-Bereiche, die ein CANNTG-Motiv aufweisen.



Im Rahmen dieser Arbeit wurde kein Versuch unternommen, weitere E-Box bindende Faktoren mit Hilfe der ChIP-Technik am *Zyklin D2*-Promotor nachzuweisen. Um ein noch vollständigeres Bild der Prozesse an der DNA zu bekommen, böte sich dies bei zukünftigen Versuchen an. Hierbei wären vor allem weitere Myc/Max/Mad-Mitglieder von Interesse. Auch USF-1 und USF-2, Transkriptionsfaktoren, die auf Promotorebene mit Myc/Max/Mad-Komponenten zu kompetitieren scheinen, wären hierfür geeignete Kandidaten (Boyd et al. 1998).

### 4.1.2 Die zeitliche Auflösung des Besetzungsmusters am *Zyklin D2*-Promotor

Wie bereits ausführlich erläutert, ist es vor allem die zeitliche Auflösung eines Genregulationsprozesses, die notwendig ist, um den qualitativen Anteil einzelner regulatorisch wirksamer Komponenten aufzuzeigen (siehe Abschnitt 2.1). Innerhalb dieser Arbeit wurde als Modell-System für die Analyse das System der myeloid/monozytären Zelldifferenzierung von HL-60-Zellen ausgewählt. In diesem Modell korreliert im unbehandelten Zustand der c-Myc-Proteingehalt mit aktiver *Zyklin D2*-Transkription und zellulärem Wachstumsverhalten (siehe Abbildung 4, Seite 37). Die Stimulation der Zellen durch den Phorbolester TPA leitet einen zellulären Differenzierungsprozess ein, der von einer Zellzyklus-Arretierung, einer Abnahme des c-Myc-Proteingehaltes und einer Induktion der Mad1-Expression begleitet ist (siehe Abbildung 4A, Seite 37) (Sommer et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass parallel hierzu die *Zyklin D2*-Gentranskription herunterreguliert wird (siehe Abbildung 8A, Seite 47).

Parallel zu einer Northern-Blot-Analyse wurde im Zeitverlauf des Differenzierungsprozesses die ChIP-Untersuchung zur Besetzung des *Zyklin D2*-Promotors durchgeführt. Durch die Analyse der Besetzung durch die RNA-Polymerase II konnte das „Abschalten“ der Transkription zeitlich noch genauer eingegrenzt werden, als es in der Northern-Analyse möglich ist (da hier mRNA-Gehalt und nicht Genaktivität dargestellt wird). Bereits nach 3h TPA-Behandlung nimmt das Ausmaß der Genaktivität drastisch ab (siehe Abbildung 8C, Seite 47). Im gleichen Zeitrahmen wird der Promotor durch den Faktor Mad1 besetzt, der dann für die gesamte Dauer des weiteren Differenzierungsprozesses am *Zyklin D2*-Promotor assoziiert bleibt (siehe Abbildung 8D, Seite 47) und auch nach 48h TPA-Behandlung in der ChIP-Analyse eindeutig nachweisbar ist (Bouchard et al. 2001). Während der Faktor c-Myc etwas zeitverzögert vom Promotor dissoziiert, bleibt der den beiden Faktoren gemeinsame Heterodimerisierungspartner Max nahezu konstant am Promotor. Lediglich eine geringe

Abnahme der Max Signale lässt sich im Verlauf der Differenzierung feststellen, nachdem der Austausch von c-Myc zu Mad1 vollzogen ist.

Das aufgezeigte Besetzungsmuster ist vollständig kompatibel mit den konventionellen Modellen zur Genregulation durch Myc/Max/Mad-Faktoren (siehe Abschnitt 2.2.2). Das bereits beschriebene Modell eines molekularen Austausches von Myc/Max zu Mad/Max-Komplexen im Verlaufe der Genrepression konnte damit auf der Ebene der Promotorbesetzung in lebenden Zellen für das *Zyklin D2*-Gen bestätigt werden.

An dieser Stelle wird eine Limitation in der allgemeinen Aussagekraft von ChIP-Ergebnissen deutlich, auf die schon innerhalb der Einleitung hingewiesen wurde. Der unmittelbare Nachweis der Besetzung eines Promotors weist für sich allein genommen nur einen geringen Grad an funktioneller Relevanz auf. Anders ausgedrückt: Die Tatsache der Promotor-Besetzung stellt eine wichtige Information dar, sagt aber wenig über die spezielle Bedeutung für die Genregulation aus. Daher stellt sich die ChIP-Methode gerade dann als besonders vorteilhaftes Messinstrument dar, wenn schon eine Reihe von zusätzlichen Daten, wie auch in diesem Fall, existiert. Aufgrund der zahlreichen Hinweise der funktionellen Interaktion von Myc/Max/Mad-Faktoren mit Chromatin-modifizierenden Komplexen (siehe Abschnitt 2.2.2) bot sich eine detaillierte Analyse des Chromatinzustandes für das weiterführende Verständnis des Regulationsprozesses an.

### 4.1.3 Das qualitativ wirksame Potential der Myc/Max/Mad-Faktoren

Die Veränderungen des Acetylierungsniveaus am *Zyklin D2*-Promotor in HL-60-Zellen entsprechen dem typischen Bild der Transkriptionsmodelle der 19(90)-er Jahre. Im Zustand aktiver Gentranskription ist ein verstärktes Ausmaß von Histon-Acetylierung, sowohl für H3 als auch für H4 nachweisbar. Im Verlauf der *Zyklin D2*-Genrepression ist eine deutliche Deacetylierung für H3 und H4 gezeigt worden (siehe Abbildung 8, Seite 47). Die zeitliche Kinetik dieser Abnahme korreliert sehr gut mit dem nachgewiesenen molekularen Austausch von Myc/Max zu Mad/Max Heterodimeren. Also kann auch an dieser Stelle das Modell zur Regulation durch Myc bzw. Mad1 an der Situation lebender Zellen bestätigt werden.

Wiederum stellt sich die Frage, ob die parallel beobachtbaren Veränderungen funktionell gekoppelt sind. Drückt sich das regulatorische Potential von Myc in der Verstärkung und das Potential von Mad1 in der Verringerung der lokalen Histon-Acetylierung aus?

Im Rahmen der ChIP-Analyse konnte gezeigt werden, dass das TRRAP-Protein das gleiche zeitliche Besetzungsmuster wie c-Myc aufweist. Vor dem Hintergrund, dass TRRAP als

Kofaktor von c-Myc beschrieben ist und dieses Protein als integraler Bestandteil vieler HAT-Komplexe identifiziert wurde, verfestigt sich erneut das Bild eines kausalen Zusammenhangs von Faktorbesetzung und eingeleiteten Acetylierungsprozessen. Mittlerweile konnte auch eine Kolo-kalisation von Mad1 und HDAC-1 auf dem *Zyklin D2*-Promotor in der ChIP-Analyse gezeigt werden (K. Dohmann persönliche Mitteilung) (Bouchard et al. 2001).

Die regulatorische Funktion von c-Myc bei der Induktion von Acetylierungsprozessen wurde in zwei neueren Arbeiten ebenfalls aufgezeigt. In der ersten Publikation (Bouchard et al. 2001), die auch Daten aus dieser Dissertation enthält, gelang es den Mitarbeitern um Martin Eilers sehr direkt, diese spezifische c-Myc-Funktion aufzuzeigen: In diesen Experimenten wurde ein exogenes c-Myc-Östrogenrezeptor Fusionskonstrukt durch die Zugabe des Hormonderivates 4-Hydroxy-Tamoxifen aktiviert. Diese Aktivierung führt zur Induktion der *Zyklin D2*-Expression. Gleichzeitig kann das exogene Konstrukt mittels ChIP-Analyse am *Zyklin D2*-Promotor detektiert werden und das lokale Acetylierungsniveau für H3 und H4 nimmt zu. Auch der Faktor TRRAP ist nach der Myc-Aktivierung am Promotor nachweisbar. Wird nun das Myc-Konstrukt gegen eine mutierte Version mit deletierter Myc-Box-II (siehe Abschnitt 2.2.2) ausgetauscht, so lässt sich das Konstrukt am *Zyklin D2*-Promotor detektieren, es finden aber keine weiterführenden Aktivierungsprozesse statt: TRRAP wird nicht rekrutiert, die Acetylierung steigt nicht an und die Expression des endogenen *Zyklin D2*-Gens kann nicht mehr induziert werden.

In einer zweiten Veröffentlichung (Frank et al. 2001) wurden an einer größeren Anzahl von c-Myc Zielgenen sehr ähnliche Beobachtungen gemacht: In einer Fibroblasten-Zelllinie kann durch Serum-Stimulation „gehungerter“ Zellen c-Myc-Besetzung, TRRAP-Rekrutierung, H4-Acetylierung und Transkriptionsinitiation an allen analysierten Zielgenen detektiert werden. Durch eine Reihe adäquater Kontroll-Experimente kann auch hier der kausale Zusammenhang eindeutig festgestellt werden: Der Faktor c-Myc besitzt das Potential über die Besetzung von Zielpromotoren eine Erhöhung des lokalen Acetylierungsniveaus zu induzieren. Die Frage, ob c-Myc darüber hinaus simultan auch die Transkription zu induzieren vermag, scheint zwischen Zielgenen und Zelltyp-abhängig zu variieren. Während in der Untersuchung von Frank et al. für alle untersuchten Gene durch die Aktivierung von c-Myc verstärkte Acetylierung induziert werden konnte, wurde nur bei einem kleinen Teil dieser Gene gleichzeitig Transkription initiiert, wenn keine Kostimulation durch Serum erfolgte. Es kann also davon ausgegangen werden, dass in vielen Fällen zusätzliche Signale erforderlich sind, um bei einem durch c-Myc voraktivierten Promotor Transkription zu induzieren.

Innerhalb des Systems, das im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurde, stellt sich die genaue Bestimmung des regulatorischen Potentials der ausgetesteten Faktoren etwas schwieriger dar: Es handelt sich bei den analysierten HL-60-Zellen um nicht synchronisierte Zellen. Unter den Standard-Wachstumsbedingungen in FCS-haltigem Zellkulturmedium wirken permanent Wachstums-stimulierende Signale auf die Zelle ein. Vor diesem Hintergrund ist es wahrscheinlich, dass neben einer dauerhaft induzierten c-Myc-Aktivierung mehrere zusätzliche Signalwege permanent „angeschaltet“ sind und einen Beitrag zur konstitutiven *Zyklin D2*-Genexpression der Zellen beitragen.

Um zusätzliche Daten darüber zu sammeln, welcher Anteil der *Zyklin D2*-Expression und der Promotor-Acetylierung direkt über die vorhandenen E-Boxen vermittelt wird und welcher Anteil über andere Signalwege und distinkte DNA-Elemente abläuft, wurden verschiedene humane *Zyklin D2*-Promotor-Reporter Plasmide kloniert. Hierbei wurden neben einem Wildtyp-Konstrukt auch mutierte Versionen generiert, in denen die E-Boxen E3 und E3' durch adäquate Basenaustausche mutiert wurden. Alle Versuche, diese Plasmide mit verschiedenen Transfektionssystemen (Effectene, Superfect; QIAGEN) in HL-60 oder U-937-Zellen einzubringen schlugen fehl, so dass auf diese Weise keine Daten erzeugt werden konnten. Um dennoch Daten zu generieren, mit denen das Potential des Faktors c-Myc genauer eingegrenzt werden konnte, wurde auf die lymphoblastoide T-Zelllinie Jurkat zurückgegriffen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zelle c-Myc-Protein exprimiert, dass jedoch unter Standard-Bedingungen in der Northern-Analyse keine *Zyklin D2*-Expression nachweisbar ist (siehe Abbildung 4, Seite 37). Bei der Analyse am *Zyklin D2*-Promotor in diesen Zellen konnte c-Myc-Besetzung im Bereich der E-Boxen E3 und E3' eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11, Seite 54). Wird die Besetzungsstärke in HL-60 und Jurkat-Zellen innerhalb dieser Region verglichen, so ist eine um den Faktor 7,4 verstärkte Besetzung in HL-60-Zellen messbar. Werden diese Daten mit Ergebnissen zur RNA-Pol-II Besetzung des GAPDH-Promotors normalisiert, resultiert ein Faktor von 3,3, um den die ermittelte Besetzungsstärke am Promotor in HL-60-Zellen erhöht ist. Für die Interpretation der Besetzungsstärke kann ein dritter Wert mit herangezogen werden. Dieser ergibt sich, wenn jeweils das Signal geringster Intensität aus beiden Zellen (Fragment Nr. 15) gleich 1 gesetzt wird und die Besetzungsstärke im Bereich des Fragmentes 7 relativ dazu angegeben wird. In diesem Fall ergibt sich mit 18,5 für HL-60- und 16,5 in Jurkat-Zellen praktisch kein Unterschied mehr. Somit konnte gezeigt werden, dass das rein quantitative Maß der c-Myc-Besetzung nicht ausreicht, um die drastischen Unterschiede in der *Zyklin D2*-Genaktivität zu erklären. Vielmehr implizieren diese Ergebnisse, eine Funktion von c-Myc in der

Aufrechterhaltung eines generell aktivierbaren Zustandes am *Zyklin D2*-Promotor. Wie bereits oben beschrieben, weisen mehrere Daten darauf hin, dass eine derartige Funktion ihre Ausprägung in der Induktion oder Aufrechterhaltung eines erhöhten Acetylierungsniveaus findet. Eine vergleichende Analyse der Acetylierungsintensität in HL-60 und Jurkat-Zellen ergab folgendes Resultat: Nach adäquater Normalisierung der Daten konnten im Bereich des Transkriptionsstartpunktes sowohl für H3 als auch für H4 deutlich erhöhte Werte in HL-60-Zellen ermittelt werden. Diese Ergebnisse korrelieren also eng mit der transkriptionellen Aktivität an den Loci. Der analysierte Bereich beinhaltet die RNA-Pol-II-Bindungsstelle. Somit ist die Notwendigkeit einer guten Zugänglichkeit der DNA innerhalb dieses Bereiches für aktive Gentranskription gegeben und eine erhöhte Acetylierung erscheint plausibel. Innerhalb des zweiten analysierten Bereiches (Fragment 7, Bereich maximaler c-Myc-Besetzung) unterscheidet sich die normalisierte Acetylierungsintensität im Vergleich zwischen HL-60- und Jurkat-Zellen kaum. Diese Beobachtung gilt sowohl für H3 als auch für H4. Auch dieser Befund unterstützt die These, dass eine wichtige regulatorisch wirksame Funktion von c-Myc darin besteht, die Aufrechterhaltung eines erhöhten Acetylierungsniveaus innerhalb eines definierten Abschnittes im Promotor zu gewährleisten. Möglicherweise dient dies dazu, innerhalb bestimmter Zelllinien einen potentiell aktivierbaren Zustand am *Zyklin D2*-Promotor aufrecht zu erhalten.

#### 4.1.4 Zusätzliche Signale für die volle *Zyklin D2*-Induktion

Bereits in der Einleitung wurde ausführlich darauf eingegangen, dass sich die Transkriptionsaktivierung als „Zwei-Stufen-Prozess“ beschreiben lässt (siehe Abschnitt 2.1.6). Folgerichtig gibt es drei hauptsächliche Aktivierungszustände an Promotoren. Zustand 1: konstitutive reprimierte Loci, Zustand 2: potentiell aktivierbare Loci und Zustand 3: aktive Loci. Gerade am Beispiel der hematopoetischen Zelldifferenzierung konnte die physiologische Ausprägung dieses Prinzips eindrucksvoll aufgezeigt werden. Für eine Vielzahl von Genen die in späten Differenzierungsstadien hoch spezifisch für bestimmte Blutzellen sind, gilt, dass deren Promotoren innerhalb multipotenter Vorläuferzellen ein geringes basales Aktivitätsniveau aufweisen (Cheng et al. 1996; Hu et al. 1997). Deren Aktivität entspricht dem oben beschriebenen Zustand 2, weil das Gen nur minimal aktiv ist. Im Verlaufe der Entwicklung einzelner Linien werden die betreffenden Gene jetzt systematisch in einen anderen Aktivierungszustand gebracht. Gene für Linien-spezifische Transkriptionsfaktoren oder Oberflächenrezeptoren werden hochreguliert (Zustand 3), weil

die entsprechende Genfunktion genau jetzt in genau dieser Linie benötigt wird. Nicht benötigte Gene werden effektiv und oft irreversibel reprimiert. Es bilden sich hier genomweit Heterochromatinbereiche aus, die in ihrer Gesamtheit große Strukturveränderungen in den entsprechenden Zellkernen hervorrufen. Diese Regionen werden als konstitutiv inaktive Kompartimente etabliert (Francastel et al. 2000).

Da gerade eines der wesentlichen Charakteristika multipotenter Stammzellen die Befähigung ist, noch in unterschiedliche „Richtungen“ differenzieren zu können, wird deutlich, wie wichtig es für die Aufrechterhaltung dieses Potentials ist, Gene in dem Beschriebenen voraktivierten permissiven Zustand zu halten.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, welche Möglichkeiten dem „zellulären Gen-Regulationssystem“ zur Verfügung stehen, dieses Potential mechanistisch aufrecht zu erhalten (siehe Abschnitt 2.1.6). Prinzipiell müssen Schlüsselregionen in den betreffenden Promotoren zugänglich für spezifisch eintreffende Signale gehalten werden, welche dann über genau diese Bereiche die vollständige Genaktivierung induzieren.

Für das innerhalb dieser Dissertation untersuchte System scheint *Zyklin D2* in Jurkat-Zellen potentiell aktivierbar zu sein. Möglicherweise wird das Gen auf sehr geringem Niveau exprimiert. Die durchgeführte Northern-Blot-Analyse ist mit einiger Sicherheit nicht sensitiv genug, um derart geringe mRNA-Mengen detektieren zu können. Es ist also möglich, dass auch im Rahmen dieses Systems der potentiell aktivierbare Promotorzustand von geringer basaler Genaktivität begleitet wird, die unter Umständen sogar funktionelle Bedeutung hat.

Im Rahmen der vergleichenden CHIP-Analyse relativiert sich die ermittelte erhöhte Besetzung durch c-Myc in HL-60- gegenüber Jurkat-Zellen, wenn die Daten entsprechend normalisiert werden. Zusätzlich muss der höhere c-Myc-Proteingehalt in HL-60-Zellen (siehe Abbildung 4, Seite 37) und das nahezu identische, promotorweite Besetzungsmuster bei der Interpretation berücksichtigt werden. Zusammengefasst gibt es keine Hinweise dafür, dass sich die qualitativ regulatorisch wirksame Funktion von c-Myc beim Vergleich von HL-60 zu Jurkat-Zellen unterscheidet. Für die verschiedenen Genaktivitäten stellt nicht primär das Ausmaß an c-Myc Besetzung, sondern der ermittelte Unterschied in der Acetylierung am Transkriptionsstartpunkt (Fragment 11) einen qualitativen Unterscheidungsmarker dar. Gerade innerhalb der Region stärkster c-Myc-Bindung ist die relative Acetylierung in beiden Zuständen vergleichbar stark ausgeprägt.

Damit verstärken sich die Hinweise, dass dem Faktor c-Myc innerhalb dieses untersuchten Systems eine Aufgabe bei der Aufrechterhaltung eines erhöhten Acetylierungsniveaus

zukommt, welche nicht unmittelbar mit dem Aktivitätsniveau korreliert. Diese Funktion ist notwendig, aber nicht ausreichend für eine effektive *Zyklin D2*-Induktion. Ebenfalls kompatibel mit dieser Funktion sind Daten, die eine verstärkte Besetzung der E-Box-Regionen des Promotors durch das Protein TRRAP in Jurkat-Zellen zeigen (Dr. Karen Dohmann, persönliche Mitteilung).

Vor diesem Hintergrund kann die c-Myc-Funktion in zwei Teilbereiche aufgegliedert werden: Die Gewährleistung signalinduzierter Aktivierbarkeit und die Verhinderung aktiver und möglicherweise irreversibler Genrepression. Für die zweite Teilfunktion wäre zu postulieren, dass die durch c-Myc und TRRAP vermittelte Aufrechterhaltung erhöhter Acetylierung dominant gegenüber der Aktivität endogener Deacetylasen ist.

Um in diesem Zusammenhang den Einfluss endogener Deacetylasen auf den *Zyklin D2*-Promotor zu ermitteln, wurde als Inhibitor endogener Deacetylasen Trichostatin A (TSA) eingesetzt. Bei diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit TSA nur zu einer minimalen Reinduktion der Gen-Expression führt, während eine deutliche Erhöhung der Acetylierung am Promotor in Jurkat- und TPA-behandelten HL-60-Zellen gezeigt werden konnte. Der auffälligste Befund hierbei ist: Von diesem Prozess ist die H4-Acetylierung im Bereich von E3 und E3' in Jurkat-Zellen ausgeschlossen. Dieser Befund bestätigt noch einmal den Zusammenhang von Promotorbesetzung durch c-Myc und dauerhafter Aufrechterhaltung eines vergleichbar stark acetylierten Bereiches um die E-Boxen E3 und E3'. Da im Fall der H3-Acetylierung eine deutliche Steigerung nach TSA-Behandlung erkennbar ist, nicht jedoch für H4, erhärtet sich der Eindruck, dass das beschriebene Potential von c-Myc, lokal erhöhte Acetylierung aufrecht erhalten zu können, über eine H4-HAT vermittelt wird. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre TIP60. Diese Histon-Acetyltransferase bildet einen Komplex mit den Myc-interagierenden Proteinen TIP 48 und TIP 49, sowie mit TRRAP aus und acetyliert *in vitro* präferenziell das Histon H4 (Ikura et al. 2000; Amati et al., 2001).

Die relevante HAT-Aktivität muss weitgehend dominant über das Potential endogener HDACs sein, in dieser Region H4 zu deacetylieren. Andererseits implizieren die generierten Daten, dass endogenen Deacetylasen durch die konstitutive Deacetylierung von H3 und H4 im Bereich des Transkriptionsstartpunktes eine Rolle bei der Repression am *Zyklin D2*-Promotor zukommt. Zusätzliche Signale, die zu einer vollen *Zyklin D2*-Induktion führen sollen, müssen also eine Inaktivierung dieser Deacetylasen bewirken. Wie durch die Versuche

mit TSA gezeigt werden konnte, reicht aber auch dies nicht aus, um zu einer vollen Induktion der *Zyklin D2*-Genaktivität zu gelangen.

In der Einleitung wurde bereits eingehend geschildert, wie vielschichtig Aktivierungs- bzw. Repressionsprozesse an eukaryontischen Promotoren ablaufen. Mit großer Sicherheit gibt es zusätzlich zur Funktion des Myc/Max/Mad-Netzwerkes mit den beschriebenen Auswirkungen auf die Histon-Acetylierung eine Reihe weiterer Komponenten, die ebenfalls wichtige Teilschritte bei der Genregulation am *Zyklin D2*-Promotor steuern. Der humane Promotor weist eine hohe Anzahl an potentiellen Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren auf (Brooks et al. 1996). Für das Beispiel der Stimulation einer Makrophagen-Linie durch den Wachstumsfaktor CSF-1, konnte neben dem stimulatorischen Einfluss von c-Myc die Beteiligung zweier weiterer Signalwege, des Src- und des MEK/ERK-Signalweges aufgezeigt werden. Die kombinatorische Inhibierung aller drei Signale wirkte sich in dieser Untersuchung additiv auf die Inhibierung der *Zyklin D2*-Expression aus.

Im Rahmen der Einleitung wurde der Mechanismus für den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus beschrieben (siehe Abschnitt 2.3.1). Die bei diesem Prozess entscheidenden regulativ wirksamen Proteine sind die Zykline Zyklin E, Zyklin D1,-D2, und -D3. Während die Zyklin E-Expression in wachsenden Zellen einer weitgehend autonomen intrinsischen Steuerung im Rahmen des Zellzyklus unterliegt, stellen die D-Typ-Zykline die direkteren Verbindungsglieder zwischen externen mitogenen Stimuli und fortschreitendem Zellwachstumsverhalten dar. Ihre Expression ändert sich in den meisten Fällen mit der An- bzw. Abwesenheit externer mitogener Signale (Sherr 1993). Während die Funktion des Zyklin E essentiell für jegliche Art des Zellwachstums ist, stellt sich die Funktion der D-Typ-Zykline zum Teil Stimulus und Zelltyp-spezifisch dar. Das *Zyklin D2*-Gen wird in sehr verschiedenen physiologischen und/oder pathophysiologischen Situationen induziert. Beispielsweise konnte eine Geninduktion in glatten Muskelzellen durch Serumstimulation aufgezeigt werden (Brooks et al. 1996). Die Immortalisierung von B-Lymphocyten wird von einer *Zyklin D2*-Aktivierung begleitet (Sinclair et al. 1994). Die *Zyklin D2*-Expression korreliert mit dem progressiven Verlauf und der Prognose bei Magenkrebs (Takano et al. 1999). In einer bestimmten B-Zell Subpopulation, welche in charakteristischer Weise mit Phorbol ester zur Proliferation angeregt wird, wird parallel dazu transient das *Zyklin D2*-Gen aktiviert (Tanguay et al. 1999).



Aus diesen Beispielen geht hervor, dass die *Zyklin D2*-Expression mit Proliferationsprozessen assoziiert ist, das Genprodukt aber anscheinend in sehr spezifischen Situationen Zellwachstum vermittelt.

Aus den im Rahmen dieser Dissertation generierten Daten zum *Zyklin D2*-Expressionsniveau in HL-60 und Jurkat-Zellen dürfen keine engen Korrelationen mit der physiologischen Funktion von *Zyklin D2* in primären myeloiden oder lymphoiden Zellen abgeleitet werden. Wie alle Tumor-Zelllinien zeichnen sich die untersuchten Zellen gerade dadurch aus, dass sie durch individuelle Ereignisse immortalisiert worden sind. Gerade die Analyse von physiologischen Prozessen, die das Zellwachstumsverhalten steuern ist aus diesem Grund schon grundsätzlich problematisch. Die untersuchten Zellen sollten vielmehr als reine Modellsysteme angesehen werden, die es ermöglichen, den grundsätzlichen Einfluss des Myc/Max/Mad-Netzwerkes auf den *Zyklin D2*-Promotor herauszuarbeiten.

Die Diskrepanz zwischen der Beobachtung in Jurkat-Zellen, einer Promotorbesetzung ohne Induktion messbarer Genexpression und dem dargestellten Potential von c-Myc unter Umständen unabhängig von zusätzlichen Signalen auch Geninduktion auslösen zu können (Bouchard et al, 2001; Frank et al. 2001), stellt keinen größeren Widerspruch dar. Es ist beschrieben worden, dass der physiologische Kontext, in dem derartige Untersuchungen ablaufen, maßgeblich die gemessenen Resultate beeinflussen kann. Die bereits zitierten Untersuchungen (Frank et al. 2001) implizieren, dass das regulatorisch wirksame Potential von c-Myc in einigen Fällen scheinbar ausreicht um Zielgene zu aktivieren, für bestimmte andere Zielgene jedoch nicht. Hierbei darf aber nicht übersehen werden, dass möglicherweise für jeden Promotor individuell eine Reihe zusätzlicher Signale für die Geninduktion erforderlich ist.

Analog kann auch die Situation für einen einzigen Promotor betrachtet werden, wenn das regulatorisch wirksame Potential von c-Myc in unterschiedlichen Zellen verglichen werden soll. Deutlich ist in jedem Fall: für eine genauere Beschreibung des regulatorisch wirksamen Potentials müssen immer der physiologische Hintergrund und daraus resultierende weitere Signale für die Geninduktion berücksichtigt werden.

Für ein Gen wie *Zyklin D2* gilt, dass es vermutlich Zelltyp- und Kontext-spezifisch Proliferationsprozesse vermittelt.

Vergleicht man damit die Situation des Transkriptionsfaktors c-Myc, so wird klar, dass es sich bei c-Myc um einen Faktor handelt, dessen Funktion im Rahmen der Wachstumskontrolle als ubiquitär wirksam angesehen werden muss (siehe Abschnitt 2.3.2). Gerade genau dieser Unterschied aber ist kompatibel mit dem innerhalb dieser Dissertation herausgearbeiteten

Modell zur Funktion von c-Myc am *Zyklin D2*-Promotor. c-Myc, ein Faktor, der innerhalb wachsender Zellen permanent verfügbar ist, bleibt dauerhaft an E-Box-Regionen einiger potentiell zu aktivierender Zielgene assoziiert. Da, wie im Fall des *Zyklin D2*-Gens, nicht alle dieser Gene in allen Situationen bzw. Zellpopulationen oder zu jeder Zeit „angeschaltet“ zu werden brauchen oder dürfen, ist es physiologisch sinnvoll, das Gen in einem potentiell aktivierbaren Zustand zu halten. Gleichzeitig bleibt es dadurch sensitiv gegenüber zusätzlichen Signalen. Diese Signale können jetzt selektiv, bzw. im adäquaten Kontext, die volle Geninduktion auslösen, da die durch c-Myc initiierte lokale Hyperacetylierung den permanent permissiven Zustand aufrecht erhält.

Bei der Reflexion des oben skizzierten Modells muss eine zusätzliche, bislang nicht erwähnte Eigenschaft des Faktors c-Myc berücksichtigt werden: Das c-Myc-Protein hat eine vergleichbar geringe Halbwertszeit (Luscher and Eisenman 1988). Soll eine große Anzahl von Genen durch die Besetzung mit c-Myc dauerhaft aktivierbar gehalten werden, so muss entweder c-Myc-Protein in hoher Frequenz re-synthetisiert werden, oder ein spezieller Stabilisierungsmechanismus für Promotor-assoziiertes c-Myc-Protein muss angenommen werden. Wie bereits beschrieben wurde (siehe Abschnitt 2.1.6), bestimmt in vielen Fällen die Stärke des transaktivierenden Potentials von Aktivatoren gleichzeitig das Ausmaß der Degradation dieser Faktoren. Wenn ein Faktor wie c-Myc primär ein erhöhtes Acetylierungsniveau aufrecht erhält, ohne unmittelbar eine Rekrutierung der RNA-Pol-II herbeizuführen, so ist dieser Faktor möglicherweise keiner Degradation über den oben zitierten Mechanismus ausgesetzt (siehe auch Anhang, Abschnitt 6.6.7, Seite 126 unten).

Möglicherweise liefert die herkömmliche Bestimmung von Protein-Halbwertszeiten kein aussagekräftiges Bild für funktionell wichtige Subpopulationen der untersuchten Proteine. Im betreffenden Beispiel könnte sich die Halbwertszeit einer kleinen, akut DNA-bindenden Fraktion von c-Myc vom restlichen c-Myc-Protein unterscheiden.

### 4.1.5 Histon-Acetylierung am *Zyklin D2*-Promotor

Bei der Analyse der Acetylierungsintensität am *Zyklin D2*-Promotor wurde gezeigt, dass ein weiter Bereich des Promotors für H3 und H4 in HL-60-Zellen hyperacetyliert vorliegt (siehe Abbildung 9, Seite 49). Dieses erhöhte Acetylierungsniveau erstreckt sich aber nicht auf weiter „stromabwärts“ gelegene Bereiche des Strukturgens. Obwohl mittlerweile mit ELP3 eine HAT identifiziert wurde, die physikalisch mit aktiv transkribierender RNA-Pol-II assoziiert ist (Wittschieben et al. 2000), scheint für die Transkriptions-Elongation kein

vergleichbar starkes Acetylierungsniveau wie innerhalb der Promotorregion erforderlich zu sein. Möglicherweise gibt es einen bestimmten Histon-Code (siehe auch Abschnitt 2.1.6), welcher die zu transkribierenden Bereiche des Strukturgens markiert, in der Summe aber zu keinem starken Acetylierungssignal führt.

Einen auffälligen Befund stellt das Verhältnis der Acetylierungen von H3 und H4 zueinander dar. Während innerhalb aller analysierten Promotorregionen die H4-Signale höher als die entsprechenden Werte für H3 liegen, kehrt sich in der Region eng um den Transkriptionsstartpunkt dieses Verhältnis um. Die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Antikörper sind im Fall von  $\alpha$ -Ac-H3 gegen di-acetyliertes- und im Fall von  $\alpha$ -Ac-H4 gegen tetra-acetyliertes Histon generiert worden. Es handelt sich daher um Antikörper, die nicht spezifisch genug sind, um etwas wie einen speziellen Code detektieren zu können. Der intensive Unterschied von H3- zu H4-Acetylierung beim Vergleich des Transkriptionsstartes mit weiter „stromaufwärts“ gelegenen Promotorbereichen, weist jedoch auf einen entsprechend charakteristischen Code für jede der Regionen hin. Möglicherweise ist ein derartiger Code als zusätzliches Unterscheidungsmerkmal unterschiedlicher Bereiche eines Genpromotors funktionell erforderlich. Um dieser Frage nachzugehen, wäre notwendig, weitere Promotoren auszutesten, um zu erkennen, ob es sich hierbei um ein allgemeingültiges Phänomen handelt. Falls spezifische Codes universell bestimmte Promotorbereiche markieren, so wäre der Einsatz von Antikörpern, die einzelne Histon-Modifikationen spezifisch erkennen in der ChIP-Analyse aufschlussreich.

In der Mehrzahl aller Untersuchungen zur Histon-Acetylierung sind die auch in dieser Arbeit verwendeten Antikörper eingesetzt worden. Daher sind die erzielten Ergebnisse zu gewissem Grade miteinander vergleichbar. Es zeigt sich aber bei dem Versuch, aus der Gesamtheit dieser Daten allgemeingültige Schlüsse zu ziehen, dass die genauen Zusammenhänge von Histon-Modifikationen mit Genregulationsprozessen momentan noch weitgehend verborgen sind. Da bei dem Nachweis mit den beschriebenen Antikörpern die Summe der Acetylreste ausschlaggebend ist, andererseits vermutlich aber die kombinatorische Diversität verschiedener Modifikationen regulatorisch bedeutsam ist, erklärt sich, weshalb die Daten zur Acetylierung bislang kein einheitliches Bild ergeben: Während in einigen Untersuchungen verstärkte Acetylierung sowohl für H3 als auch für H4 parallel zu Gen-Aktivierungsprozessen ermittelt wurde (Chen et al. 1999b; Parekh and Maniatis 1999; Bouchard et al. 2001; Xu et al. 2001), zeigt sich in anderen Arbeiten ein abweichendes Bild. In diesen Beispielen korreliert das Aktivitätsniveau der analysierten Gene ausschließlich mit Veränderungen der H3-Acetylierung (O'Neill and Turner 1995; Schubeler et al. 2000). Die H4-Acetylierung stellt

sich in diesen Fällen eher als Maß der Voraktivierung eines Promotors bzw. eines potentiell aktivierbaren Zustandes dar. Es ist auch ein Beispiel aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben, bei dem es präferentiell Phosphorylierungsprozesse am Histon H3 sind, welche spezifische Genaktivierung begleiten. In neueren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass sich die Zusammenhänge von Acetylierung und Genaktivität an individuellen Promotoren auch reziprok darstellen können (Deckert and Struhl 2001; Sheldon et al. 2001).

Noch komplexer wird das Bild, wenn zusätzlich Daten zu globalen Acetylierungs- und Deacetylierungs-Prozessen in der Bäckerhefe mit herangezogen werden: In einer entsprechenden Publikation konnte durch den Einsatz Temperatur-sensitiver Hefe-Stämme aufgezeigt werden, dass mit den analysierten Aktivierungsprozessen assoziierte lokale Veränderungen im Acetylierungsniveau vor dem Hintergrund von permanent aktivierten globalen Acetylierungs- und Deacetylierungsprozessen stattfinden (Vogelauer et al. 2000).

Möglicherweise stellt sich also die gemessene Acetylierungsintensität am *Zyklin D2*-Promotor als Resultat von spezifischer lokaler Aufrechterhaltung der Acetylierung und global agierenden Aktivitäten dar. Hierfür spricht auch der bereits diskutierte Befund, dass die TSA-Behandlung in Jurkat-Zellen eine deutliche Erhöhung der Acetylierung am Startpunkt induziert. Es muss davon ausgegangen werden, dass endogene HDACs diesen Bereich konstitutiv deacetylieren. Die Tatsache, dass im Bereich stärkster c-Myc-Besetzung zumindest für H4 keine weitere Steigerung der Acetylierung durch TSA induziert werden kann, spricht dafür, dass die über c-Myc rekrutierte HAT in diesem Bereich konstitutiv Chromatin acetyliert.

*Zusammenfassung (Regulatorisch wirksame Potentiale bei der Zyklin D2-Geninduktion):*

*In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der ChIP-Technik Genregulation durch Proteine des Myc/Max/Mad-Netzwerkes untersucht. Diese Faktoren steuern elementare physiologische Prozesse durch die Beeinflussung der Gentranskription.*

*Es wurde gezeigt, dass die Faktoren c-Myc und Max einen bestimmten Bereich des aktivierten Zyklin D2-Promotors in proliferierenden HL-60 Zellen besetzen. Im Verlauf eines durch Phorbolster induzierten Differenzierungsprozesses wird das Zyklin D2-Gen effektiv herunterreguliert. Bei diesem Prozess vollzieht sich auf molekularer Ebene ein Austausch von Myc/Max zu Mad/Max Heterodimeren, der mit der ChIP-Technik nachgewiesen wurde. Dieser Vorgang wird von einer Abnahme des nukleosomalen Acetylierungsniveaus begleitet. Die Verringerung der Acetylierung korreliert dabei direkt mit dem Austausch der Promotor-assoziierten Transkriptionsfaktoren und mit der Dissoziation des Adaptorproteins TRRAP*

*vom Promotor. Dieses Protein konnte im Zustand aktiver Gentranskription ebenfalls am Zyklin D2-Promotor nachgewiesen werden. Es vermittelt die Rekrutierung von Histon-Acetyltransferase-Komplexen.*

*Durch eine vergleichende Analyse in Jurkat-Zellen wurde aufgezeigt, dass auch in diesen Zellen der Zyklin D2-Promotor mit dem Aktivator c-Myc besetzt ist. In diesen Zellen ist jedoch keine Genaktivität nachweisbar. Innerhalb der durch c-Myc besetzten Region konnte in Jurkat-Zellen ein relativ erhöhtes Acetylierungsniveau gemessen werden. Hier korrelieren Acetylierung und c-Myc-Besetzung.*

*Die transkriptionelle Startpunktregion wurde als Marker für Genaktivität identifiziert, da Acetylierungsintensität hier direkt mit Genaktivität korreliert.*

*Unter Einbeziehung der Daten aus aktuellen Publikationen wurde auf der Grundlage der dargestellten Ergebnisse ein Modell zur Beschreibung des regulatorischen Potentials von c-Myc und Mad1 postuliert. Danach besteht die Hauptfunktion des Faktors c-Myc in einer Aufrechterhaltung eines lokal erhöhten Acetylierungsniveaus innerhalb von Zielpromotoren. Durch die physikalische und funktionelle Interaktion mit TRRAP wird Histon-Acetyltransferase Aktivität zur besetzten E-Box rekrutiert und ist ursächlich für die lokale Hyperacetylierung verantwortlich. Diese Acetylierung markiert einen potentiell aktivierbaren Zustand des Gens, reicht aber für eine Induktion nicht aus. Für eine echte Aktivierung werden zusätzliche Signale benötigt.*

*Innerhalb der myeloisch-monozytären Zelldifferenzierung vollzieht sich ein molekularer Austausch von Myc/Max- zu Mad/Max-Komplexen am Promotor. Die parallel messbare Verringerung des Acetylierungsniveaus und die Dissoziation des Proteins TRRAP vom Promotor implizieren, dass die eingeleitete Genrepression mechanistisch über den damit verbundenen Austausch von HAT- zu HDAC-Komplexen vermittelt wird.*

## **5 MATERIAL UND METHODEN**

### **5.1 Material**

#### **5.1.1 Allgemeine Materialien und Reagenzien**

Chemikalien wurden von den Firmen Amersham, Buchler, Amgen, AppliChem, Baker, Boehringerwerke Marburg, Biomol, BioRad, Boehringer Mannheim, Dianova, Difco, du Pont, Eurogentech, Fluka, Gibco BRL, Genomed, Hartmann, ICN, Invitrogen, Merck, MWG, New England Biolabs, Promega, Riedel-de-Häen, Roth, Santa Cruz, Seromed, Serva, Sigma, Stratagene, USB und Wako verwendet. Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Amersham, Beckman, Biozym, Costar, Eppendorf, Falcon, Gilson, Greiner, Machery-Nagel, Nalgene, Pharmacia, Qiagen, Sarstedt, Schleicher+Schuell und Whatman.

#### **5.1.2 Standard-Lösungen und -Puffer**

PBS	140 mM NaCl 2,6 mM KCl 2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetat 1 mM EDTA, pH 8,0
DNA-Auftragspuffer	15% (w/v) Ficoll 400 10mM EDTA pH 8,0 Orange G (Menge je nach gewünschter Farbintensität)

#### **5.1.3 Nährmedien und Antibiotika für die Arbeit mit Bakterien**

Agarplatten	LB-Medium 1,5% (w/v) Bacto/Agar (Difco) 100 µg/ml Ampicillin
LB-Medium	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl pH 7,0
Ampizillin-Stammlösung	100 mg/ml in 70% Ethanol
Kanamycin-Stammlösung	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O

### 5.1.4 Bakterienstämme

XL10-gold Tet<sup>R</sup> Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1  
recA1 gyrA96 relA1 lacHte [F<sup>+</sup> proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]

### 5.1.5 Vektoren

Zyklin D2-Expressionsplasmid: pLTRΔ7bD2 (generiert und erhalten von der  
Arbeitsgruppe Möröy)

### 5.1.6 Antikörper

Antikörper:

Beschreibung (Herstellerangaben):

c-Myc (N-262), sc-764 (Santa Cruz Biotechnology)	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen Aminosäure 1-262 von humanem c-Myc. Reaktiv gegen c-Myc aus Maus, Ratte und Mensch.
c-Myc (IG13)	Polyclonales Kaninchenserum gegen bakteriell exprimiertes „full length“ c-Myc. Zur Verfügung gestellt durch Lars Gunnar Larsson
Max (C-17), sc-197 (Santa Cruz Biotechnology)	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen ein synthetisches Peptid (Aminosäure 135-151 von humanem p21 Max, entspricht Aminosäure 144-160 des humanen p22 Max). Reaktiv gegen Max aus Maus, Ratte und Mensch.
Mad1 (C19), sc-222 (Santa Cruz Biotechnology)	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen den C-Terminus vom humanen Mad1 Reaktiv gegen Mad 1 aus Maus, Ratte und Mensch.
TRRAP (T17), sc-5405 (Santa Cruz Biotechnology)	Affinitätsgereinigtes polyklonales Schaaferum gegen eine interne Region des humanen TRRAP. Reaktiv gegen humanes TRRAP.

MATERIAL UND METHODEN

Antikörper:

Beschreibung (Herstellerangaben):

Pol II (N-20), sc-899 (Santa Cruz Biotechnology)	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen den N-Terminus der großen RNA-Pol II-Untereinheit aus der Maus. Reaktiv gegen RNA-Pol II aus Maus, Ratte und Mensch.
Pol II (8WG16) Berkeley Antibody Company	Monoklonaler Antikörper gegen die C-Terminale Heptapeptid Wiederholungsdomäne der großen RNA-Pol II Untereinheit Reaktiv gegen RNA-Pol II aus diversen Spezies
GAL4 (DBD), sc-577 (Santa Cruz Biotechnology)	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen den N-Terminus des Transkriptionsfaktors GAL4 aus der Hefe.
c-Myb (H141), sc-7874 (Santa Cruz Biotechnology)	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen den C-Terminus (Aminosäuren 500-640) des Transkriptionsfaktors c-Myb der Maus. Reaktiv gegen c-Myb aus Maus, Ratte und Mensch
Anti-acetylated Histone H3, 06-599 (Upstate Biotechnology)	Polyklonales Kaninchenserum gegen ein an den Lysin K9 und K14 acetyliertes Peptid (Aminosäuren 1-20) des <i>Tetrahymena</i> Histons H3. Reaktiv gegen acetyliertes Histon H3 aus <i>Tetrahymena</i> und Mensch (und sehr wahrscheinlich diversen weiteren Spezies).
Anti-acetylated Histone H4, 06-866 (Upstate Biotechnology)	Polyklonales affinitätsgereinigtes Kaninchenserum gegen ein an den Lysin K5, K8, K12 und K16 acetyliertes Peptid (Aminosäuren 2-19) des <i>Tetrahymena</i> Histons H4. Reaktiv gegen acetyliertes Histon H4 aus <i>Tetrahymena</i> und Mensch (und sehr wahrscheinlich diversen weiteren Spezies).



5.1.7 PCR-Primer

PCR-Primer	Sequenz (5'-3')	Zyklus D2- -Fragment- Nr.	Fragment- -Größe (Bp)	Annealing- Temperatur (°C)
hCycD2prom 24	ACACCCTGTCACACACGGAGCACTC	0	163	60
hCycD2prom 25	AAATAACTGCCACGCCCCCTCACC			
hCycD2prom 20	GCTGATACTGAGATGGTGAATGG	1	163	60
hCycD2prom 21	ACCCCCGCCACTTGACTTTC			
hCycD2prom 22	GCTCTCCCAGCCCCCTTCC	2	140	60
hCycD2prom 23	TCCGCCCTTCTCCCCCTC			
hCycD2prom 18	CCCCGCCGCTTCCTCTTG	2'	153	55
hCycD2prom-19	CCCTTCTCCCCCTCCAGG			
hCycD2prom 16	AAGGCAGTGGCTCCCATTTC	3	184	60
hCycD2prom 17	GACTAAGCACACATACTCCCAAGC			
hCycD2prom 14	ACTCAGTTTCCAGTCCAAGCCTC	4	159	60
hCycD2prom 15	GTCCACTTCCCCTTCCGATTAC			
hCycD2prom 12	AACTTGGGTTTTTTCAGCGAGC	5	136	60
hCycD2prom 13	AATAGCAGCGGAATGAGTATCC			
CycD2-h1	GAGCTCGAGCCACGCCATGC	6	79	60
hCycD2prom 7	CAGGAGGAAGGGGAGAGACCAGCG			
hCycD2prom 1	CCCCTTCCTCCTGGAGTGAAATAC	7	135	60
hCycD2prom 2	CGTGCTCTAACGCATCCTTGAGTC			
hCycD2prom 10	TCAAGGATGCGTTAGAGCAC	8	93	60
hCycD2prom 11	CGCCTCACTCTGCCAGGC			
hCycD2prom 3	TTCCTAATACCCACCTCTCCCTCC	9	176	60
hCycD2prom 4	AAATAGCAACCTCGCATACCCAG			
hCycD2prom 5	CCGCGTTTGAAGTTGGGTGC	10	233	60
hCycD2prom 6	TAAAACCTGGTCTCGCTCTCCCCTG			
hCycD2-Ex1 for	GGGAGAGCGAGACCAGTTTTAAG	11	152	60
hCycD2-Ex1 rev	CCTTTGGCTAAATAGGGGGTTTTTC			
hCycD2cod 1	GCTACCTTCCGCAGTGCTC	12	94	60
hCycD2cod 2	CCTACCTCCAGCATCCAGG			
hCycD2-Ex2 for	GAACAGAAGTGCGAAGAAGAGGTC	13	199	60
hCycD2-Ex2 rev	CCTGAGGCTTGATGGAGTTGTC			
hCycD2-Ex3 for	TGGGGAAGTTGAAGTGAAC	14	136	60
hCycD2-Ex2 rev	GCACACAGAGCAATGAAGGTC			
hCycD2-3-UTR for	ATCAGACCCTATTCTCGGCTCAGG	15	126	60
hCycD2-3-UTR rev	CAGTCAGTAAGGCACTTTATTTCCCC			
hGAPDHstart-1	TTCTATAAATTGAGCCCGCAG	-	100	55
hGAPDHstart-2	TCCGCCCGTCTTCACCTGG			

### 5.1.8 Eukaryontische Zelllinien

HL-60 (ATCC CLL-240)	Zelllinie, aus einer kaukasischen Patientin mit promyelotischer Leukämie (Suspensions-Zelllinie).
Jurkat	Humane lymphoblastoide T-Zelllinie (Suspensions-Zelllinie).
U-937 (ATCC CRL-1593.2)	Humane monozytäre Lymphom-Zelllinie (Suspensions-Zelllinie).

### 5.1.9 Materialien für die eukaryotische Zellkultur

RPMI 1640 (Gibco)	mit Glutamax
Penicillin/Streptomycin (P/S) (Seromed)	10.000 U, 10.000 µg/ml
Trypsin/EDTA (Seromed)	0.5/0.02% (w/v), ohne Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> in PBS
FCS (Gibco)	fötales Kälberserum
Gewebekulturflaschen (Nunc)	25 ml, 50 ml, 250 ml
Einfriergefäße (Nalgene)	

### 5.1.10 Software

Image SXM V 1.61  
Adobe Photoshop V 5.0  
Aida V 2.1  
Macromedia Freehand 9.0  
MacBas V 2.2  
Microsoft Word 2000  
Microsoft Excel 2000

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Transformation von E.coli-Zellen

100 µl transformationskompetente Bakterienzellen wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut. 5 µl der zu transformierenden DNA wurden in 15 ml Falcongefäßen vorgelegt. Darauf wurden vorsichtig die Zellen pipettiert und für 20 min auf Eis belassen. Der Hitzeschock erfolgte in einem 42°C Wasserbad für 47 Sekunden. Danach wurden die Zellen wieder für 2 min auf Eis gestellt und dann in 900 µl LB aufgenommen. Die Zellen wuchsen, während sie 1 h bei 37°C schüttelten. Dann wurden sie 30 Sekunden bei 16.000xg (13.000 Upm einer Tischzentrifuge) zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt, bis auf etwa 100 µl. Die Zellen wurden in diesen 100 µl resuspendiert und dann auf einer Agarplatte mit Antibiotika ausgestrichen. Sie wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli-Zellen

#### Benötigte Puffer und Lösungen:

Lösung 1	50 mM Glukose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lösung 2	0,2 N NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung 3	3 M Kaliumacetat 5 M 100 % Essigsäure

1 ml Bakterienkultur wurde 2 Minuten bei 16.000xg (13.000 Upm in einer Tischzentrifuge) sedimentiert und in 200 µl Lösung 1 resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 lysiert und nach Zugabe von 200 µl Lösung 3 zur Neutralisation und zum Fällen der Proteine für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde das Lysat 5 Minuten bei 16.000xg (13.000 Upm in einer Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Überstand mit 1 Volumen Isopropanol für 15 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Dann wurde für 30 Minuten bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Die DNA wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 20 µl TE-Puffer oder Wasser aufgenommen. Alternativ wurde mit dem Spin-Prep-Kit (Qiagen) exakt nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

### 5.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte durch eine Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer. Die Messung der Extinktion von Nukleinsäurelösungen gegen die entsprechenden Pufferlösungen entspricht, bei Verwendung einer Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm, dabei folgenden Konzentrationen:

1 OD<sub>260</sub> dsDNA = 50 µg/ml

1 OD<sub>260</sub> RNA = 40 µg/ml

Die Messungen wurden mit verdünnten Nukleinsäuren durchgeführt. Der Grad der Verunreinigung durch Proteine konnte mit dieser Methode ebenfalls festgestellt werden. Das Verhältnis  $OD_{260} / OD_{280}$  liegt bei Proben mit lediglich geringer Proteinverunreinigung zwischen 1,8 und 2,0.

#### 5.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Je nach Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 1,5 bis 3%ige Gele in TAE-Puffer angesetzt, der auch als Laufpuffer verwendet wurde. Zu 100 ml eines flüssigen Gels wurden 5  $\mu$ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Auftragspuffer versehen. Zur Abschätzung der Länge der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde ein Längenstandard (1 kb-Leiter, Gibco) mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in der Regel bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm bei RT durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht, mit einem Videodokumentationssystem festgehalten und mit Hilfe der SXM-Image-Software digitalisiert.

#### 5.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem JETSorb Kit (Genomed) nach den Angaben des Herstellers.

#### 5.2.6 Kulturbedingungen für die eukaryontische Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank in Zelldichten zwischen  $4 \times 10^5$  - und  $10^6$  Zellen pro Milliliter Medium gehalten. Die Zellen wurden in folgenden Medien gehalten:

HL-60	RPMI 1640, 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) P/S
Jurkat	RPMI 1640, 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) P/S
U-937	RPMI 1640, 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) P/S

#### 5.2.7 Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen

Zum Einfrieren wurden  $1-5 \times 10^7$  Zellen bei 300xg (1.200 Upm in einer *Table Top* Zentrifuge) für 5 min pelletiert und für 15 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden in 1 ml FCS mit 10% DMSO aufgenommen, in ein Einfriergefäß überführt, mit Zellstoff umwickelt, in einer Styroporkiste bei -80°C über Nacht eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert, mit 30 ml Zellkulturmedium gewaschen und in die entsprechenden Gefäße mit frischem Medium überführt.

### 5.2.8 Herstellung von Frackelton-Extrakten für Proteinanalysen

Benötigte Puffer und Lösungen:

F (Frackelton)- Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,07 50 mM NaCl 30 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 50 mM NaF 5 µM ZnCl <sub>2</sub> 1% Triton X 100 100 µM Vanadat 5 U/ml α <sub>2</sub> -Macroglobulin 2,5 µg/ml Pepstatin 2,5 U/ml Leupeptin 0,15 mM Benzamidin 2,8 µg/ml Aprotinin 1 mM PMSF
------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Die gesamte Durchführung erfolgte bei 4°C.

Die Zellen wurden bei 300xg (1200 Upm in einer *Table Top* Zentrifuge) 5 Minuten sedimentiert und mit PBS gewaschen. Das Sediment wurde in 150 µl F-Puffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 45 Sekunden intensivem Vortexen wurde das Lysat erneut 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zellreste wurden bei 16.000xg (13.000 Upm einer Tischzentrifuge) und 4°C für 20 Minuten abzentrifugiert und der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

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

Benötigte Puffer und Lösungen:

Laufpuffer für die SDS-Gelelektrophorese	50 mM Tris-HCl, pH 8,7 384 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Probenpuffer für SDS-Gelelektrophorese (4x)	250 mM Tris-HCl pH 6,8 40% (v/v) Glycerin 80% (w/v) SDS 0,04% (w/v) BPB 20% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)

Die denaturierende Auftrennung von Proteinen erfolgte mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970). Die Proteinlysate wurden auf 1xSDS-Probenpuffer eingestellt. Kurz vor dem Auftragen auf das SDS-Gel ließ man die Proben für 3-7 Minuten bei 95°C kochen.

Der Längenstandard bestand aus folgenden Peptiden mit den entsprechenden Grössen:

Lysozym (13,995 kDa), β-Laktoglobulin (20,390 kDa), Carbanhydrase (28,585 kDa), Ovalbumin (42,725 kDa), BSA (66,705 kDa), Phosphorylase B (98,500 kDa), Myosin H-Kette (193,910 kDa).

### 5.2.10 Nachweis von Proteinen im Immunoblot

Benötigte Puffer und Lösungen:

Blockierungspuffer	0,05% (v/v) Tween-20 5% (w/v) Magermilchpulver (AppliChem) in
ECL-Waschpuffer	0,05% (v/v) Tween-20 in PBS
Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Immunglobuline (Amersham)	sekundärer Antikörper gegen Kaninchen-

Frackeltonextrakte wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, in einer *semidry*-Blotapparatur auf Nitrocellulose (Schleicher und Schuell; Porengröße 0,2 µM) transferiert und diese anschließend mindestens 30 min im Blockierungspuffer abgesättigt. Die Membran wurde über Nacht oder mindestens für eine Stunde mit dem ersten Antikörper (verdünnt in Blockierungspuffer) inkubiert. Dann wurde sie mit ECL-Waschpuffer mit viermaligem Wechsel gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte für etwa 2 Stunden. Danach wurde erneut intensiv mit dem ECL-Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurde die Membran 1 Minute mit Lösung 1 und 2 des ECL-Kits (Amersham) im Verhältnis 1:1 vermischt und daraufhin für Zeiten von wenigen Sekunden bis einigen Minuten mit Autoradiographiefilmen belegt, welche anschliessend entwickelt wurden.

### 5.2.11 RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zelllinien erfolgte mit dem RNeasy Kit der Firma QIAGEN exakt nach Angaben des Herstellers.

### 5.2.12 Northern-Blot-Analyse

Benötigte Puffer und Lösungen:

Church-Puffer	250 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, pH 7,2 7% (w/v) SDS 1 mM EDTA
Waschpuffer	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, pH 7,2 1% (w/v) SDS
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat x 2H <sub>2</sub> O mit konz. HCl auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren
50xMOPS-Puffer	1 M MOPS [ <i>3-(N-morpholino) propane-sulfonic acid</i> ] 2,5 M Na-Azetat 0,05 M EDTA auf pH 7,0 einstellen, lichtgeschützt lagern

RNA-Laufpuffer	1xMOPS-Puffer 6% (v/v) Formaldehyd
DEPC-H <sub>2</sub> O	200 µl DEPC ( <i>Diethylpyrocarbonat</i> )/1 l H <sub>2</sub> O, autoklavieren

### Auftrennung der RNA

Für die Northern-Blot-Analyse wurden 20 µg Gesamt-RNA unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 0,9%igen Agarosegel. Für die Herstellung von 100 ml Gellösung wurden 0,9 g Agarose, 2 ml 50x MOPS-Puffer und 81,2 ml H<sub>2</sub>O in der Mikrowelle erhitzt. Nach einem leichten Abkühlen (handwarm) wurden der Lösung 16,8 ml Formaldehyd hinzugefügt.

Die aufzutrennenden RNA-Ansätze wurden folgendermaßen vorbereitet:

20 µg RNA in 13 µl DEPC-H<sub>2</sub>O  
20 µl 100% Formamid  
7 µl 37% Formaldehyd  
0,9 µl 50 x MOPS  
1 µl 1% Bromphenolblau  
1 µl Ethidiumbromid, 10 µg/µl

Die Proben wurden vor dem Auftragen für 5 min bei 70°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V über einen Zeitraum von 2-4 Std. Nach der Elektrophorese wurde das Gel kurz in destilliertem Wasser, und dann für 15 min in 10xSSC geschwenkt.

### Kapillartransfer der RNA („Blotting“):

Anschließend wurde die RNA auf eine *GeneScreen Hybridization Transfer Membrane* (NEN™, Life Science Products) übertragen („geblottet“), die hierfür zuvor kurz in 10xSSC eingelegt wurde:

Auf einer ebenen Grundfläche (Glasplatte) wurden zuerst einige mit 10xSSC getränkte Whatmanpapier-Stücke (in Gelgröße) luftblasenfrei aufgelegt. Das Agarosegel wurde, mit den Taschen nach unten, vorsichtig und ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt. Dann folgten die getränkte Membran, zwei getränkte-, dann zwei trockene Lagen Whatmanpapier und diverse trockene Zellstofflagen. Oben wurde eine Glasplatte und darauf ein Gewicht von ca. 500 g gelegt. Die entstehende Kapillarkraft erzeugte einen Transfer der RNA in Richtung trockener Zellstofflagen und somit vom Gel auf die Membran. Der Transfer erfolgte über Nacht bei RT. Die Membran wurde nach dem Transfer kurz in 2xSSC geschwenkt. Die feuchte Membran wurde anschließend durch Cross-Linking mit UV-Licht (Auto-Crosslink-Modus, Stratelinker 2400, Stratagene) exponiert, wobei die RNA an die Membran fixiert wurde. Anschließend wurde die Membran 15 bis 30 min bei 80°C „gebacken“.

### Radioaktive Markierung und Aufreinigung von DNA-Sonden:

Bei dem Verfahren des „*Random Primed Labeling*“ wird das zu markierende DNA-Fragment denaturiert und mit Hexameren mit statistisch verteilter Sequenz hybridisiert. Von diesen aus wird der Doppelstrang durch die Klenow-Polymerase in Gegenwart von markierten Nukleotidtriphosphaten wieder aufgefüllt und man erhält einen markierten DNA-Strang.

Die Markierung der Nukleinsäuren nach diesem Verfahren wurde mit Hilfe des „*Prime-It II Random Primer Labeling Kits*“ von der Firma Stratagene nach Angaben des Herstellers unter Einsatz von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP von der Firma Amersham-Pharmacia durchgeführt.

Die Aufreinigung der Sonde (Abtrennung nicht-eingebauter Nukleotide) erfolgte mit NucTrap Push Columns von der Firma Stratagene nach Angaben des Herstellers. Zur Einschätzung der eingebauten Aktivität der Sonde wurde in 1  $\mu$ l die  $\gamma$ -Strahlung in Cpm gemessen. Die Messung wurde in einem Szintillationszählgerät der Firma Beckman (Typ: LS 6000SE) durchgeführt.

### Hybridisierung und Waschen:

Vor der Hybridisierung wurde die markierte Sonde denaturiert: Die entsprechende Menge an Sonde ( $2 \times 10^6$  Cpm von der Sonde pro 1 ml Hybridisierungsansatz) wurde auf 100  $\mu$ l mit bidest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt, mit 30  $\mu$ l 2 M NaOH versetzt, 10 min bei RT inkubiert und direkt zum Hybridisierungsansatz gegeben.

Für die Hybridisierung wurde die Membran mit wenigen ml Church-Puffer (je nach Größe der Membran) bei 65°C inkubiert. Die entsprechende Menge der denaturierten Sonde wurden dann direkt zu diesem Hybridisierungsansatz pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 65°C. Nach der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung vorsichtig dekantiert und fachgemäß entsorgt und die Membran kurz in wenig Waschlösung bei RT geschwenkt. Es folgte ein Waschvorgang mit Waschlösung, bei dem die Membran für 20 min bei 65°C geschwenkt wurde. Anschliessend wurde die Membran nochmals kurz mit Waschlösung abgespült, auf Whatmanpapier abtropfen gelassen und (noch leicht feucht) in Entsorgungsbeutel eingeschweißt.

Die Detektion erfolgte entweder durch Exposition von Röntgenfilmen oder mittels PhosphorImager-System (Imager: Fuji BAS 1000; Screens: Fuji Imaging Plates Type BAS-III).



## 5.3 Chromatin-Immunpräzipitation

### 5.3.1 Beschreibung der Methode

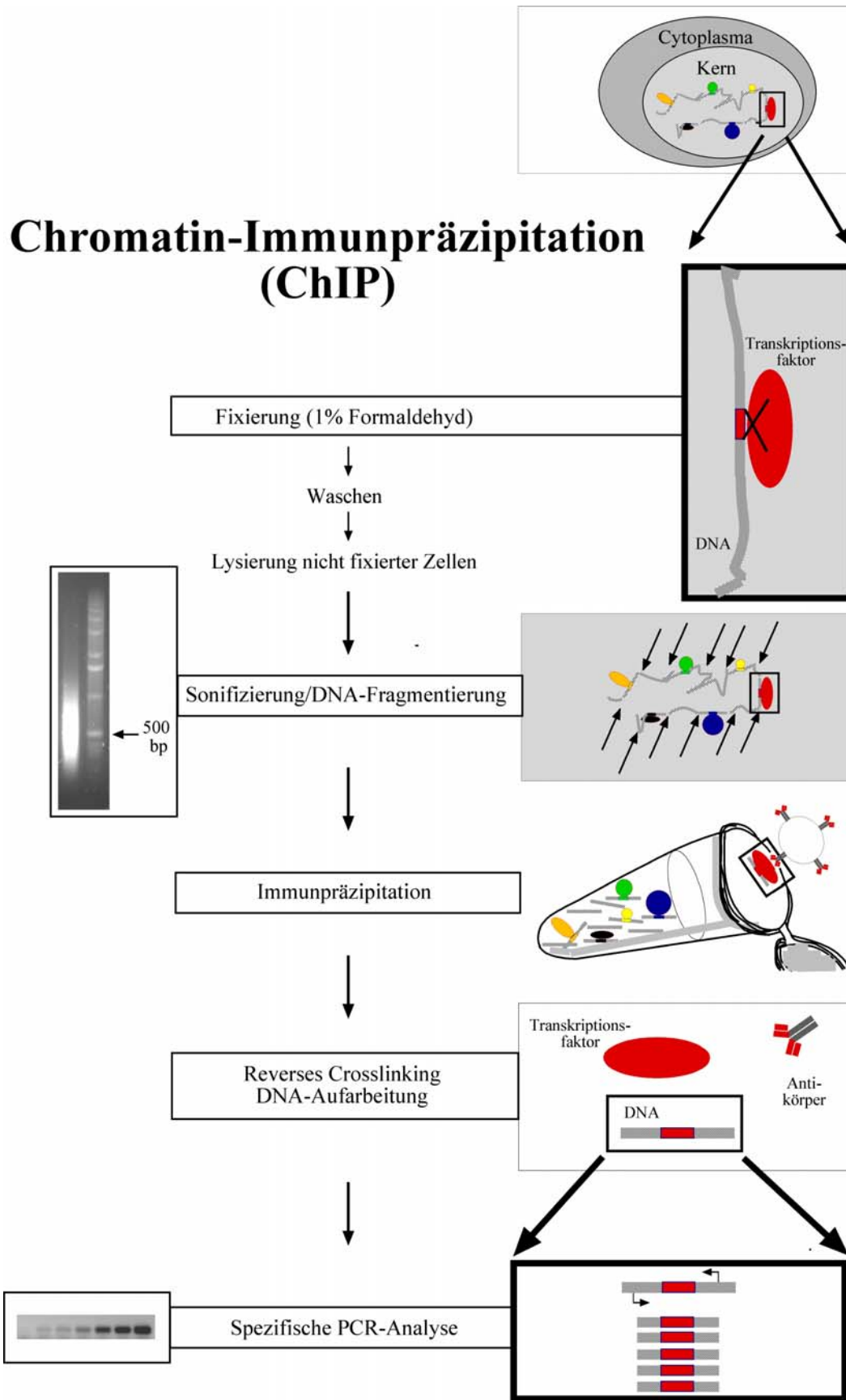
Der experimentelle Ablauf der ChIP-Methode in dieser Arbeit basiert auf Teilen des Protokolls der Arbeitsgruppe um Renato Paro (Strutt and Paro 1999). Dieses Protokoll wurde an einigen Stellen modifiziert. An mehreren Stellen wurden die experimentellen Bedingungen für die speziellen Anforderungen innerhalb dieser Arbeit optimiert.

Formaldehyd wird in einer finalen Konzentration von 1% zu Zellkultursuspensionen gegeben. Das Formaldehyd diffundiert unter anderem in die Zellkerne und führt zu einer kovalenten Vernetzung von Proteinen mit DNA, sowie von Proteinen untereinander. Hierbei reagiert eine primäre Aminogruppe (z.B. in den Seitenketten der Aminosäuren Lysin, Histidin oder Arginin bzw. den Nukleobasen Adenin oder Cytosin) mit dem Formaldehyd. Dies führt zu der Bildung einer Schiffischen Base. Dieses intermediäre Produkt reagiert unter Wasserabspaltung mit einer zweiten Aminogruppe in einem Protein oder in der DNA. Daher werden sowohl DNA- mit Protein-Molekülen, als auch Proteinmoleküle untereinander zu einem gewissen Anteil kovalent verbunden (Orlando et al. 1997). Die fixierten Zellen werden gewaschen, nicht-fixierte Zellen werden lysiert und das Material wird sonifiziert. Durch die Sonifizierung werden die Zellen aufgeschlossen und das fixierte Chromatin wird so fragmentiert, dass eine definierte durchschnittliche DNA-Fragmentgröße resultiert. Zelltrümmer werden abzentrifugiert und das verbleibende lösliche Chromatin (ChIP-Lysat) kann für die anschließende Immunpräzipitation eingesetzt werden. Hierfür werden die relevanten Epitope im Lysat (Epitope in Proteinen oder in Chromatinkomponenten) mit Hilfe spezifischer Antikörper oder –seren in der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP im engeren Sinne) erkannt und gebunden. Als Negativkontroll-ChIP wird parallel eine Immunpräzipitation mit unspezifischem Antikörper durchgeführt. Im Anschluss an die ChIP werden die Immunkomplexe mit Protein-G-Sepharose-Beads geerntet. Nach mehreren stringenten Waschschritten werden die Komplexe von den Beads eluiert und einem reversen Crosslinking bzw. einer DNA-Aufarbeitung unterzogen. Das Eluat wird nacheinander mit RNase A und Proteinase K verdaut. Es folgt eine Inkubation für mindestens 6 h bei 65°C. Durch diesen Schritt wird das Gleichgewicht der Fixierungsreaktion in Richtung Rückreaktion verschoben, so dass noch an die DNA gebundene Protein- oder Peptidfragmente effizient freigesetzt werden (Orlando et al. 1997). Aus diesem Ansatz wird durch Standard-Verfahren (Phenol-Extraktion und Ethanol-Fällung) die DNA aufgereinigt und in TE-Puffer aufgenommen. Die auf diese Weise gewonnene DNA wird im Rahmen dieser Arbeit als ChIP-DNA bezeichnet und wird für die abschließende PCR-Analyse eingesetzt.

Parallel zu jedem ChIP-Experiment wird aus einem Teil des ChIP-Lysates DNA aufgearbeitet (Input-DNA). Mit diesem Material kann die durchschnittliche DNA-Fragmentgröße bestimmt werden. Zusätzlich dienen unterschiedliche Verdünnungsstufen aus diesem Ansatz als Normalisierungsstandard in der PCR-Analyse.

Im analytischen PCR-Experiment wird ein definierter Anteil der zu untersuchenden ChIP-DNA (ChIP-DNA-Anteil) unter geeigneten Amplifikationsbedingungen als Template eingesetzt. Parallel werden Proben einer Verdünnungsreihe der Input-DNA in der gleichen Reaktion amplifiziert. Die jeweiligen Produkte werden einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen und durch Ethidium-Bromid-Färbung unter UV-Exposition detektiert. Die Signalintensitäten der resultierenden DNA-Banden können mit entsprechender Verarbeitungs-Software quantifiziert werden. Notwendige Kriterien bezüglich der Qualität der erhaltenen PCR-Produkte sind eine eindeutige und reproduzierbare Zunahme der quantifizierten Signalintensität der Produkte bei verdoppelter Input-DNA-Masse als Template. Um diesen Zusammenhang gewährleisten zu können ist es notwendig, die jeweiligen Amplifikationsbedingungen (besonders die PCR-Zykluszahl) optimal auf die eingesetzten

Template-Mengen abzustimmen. Zusätzlich sollten keine unspezifischen Nebenprodukte bei der Amplifikation entstehen. Beide Kriterien können anhand der Input-DNA-Verdünnungsreihe überprüft werden. Die Größe der Amplifikationsprodukte liegt optimalerweise zwischen 100 bp und 200 bp.

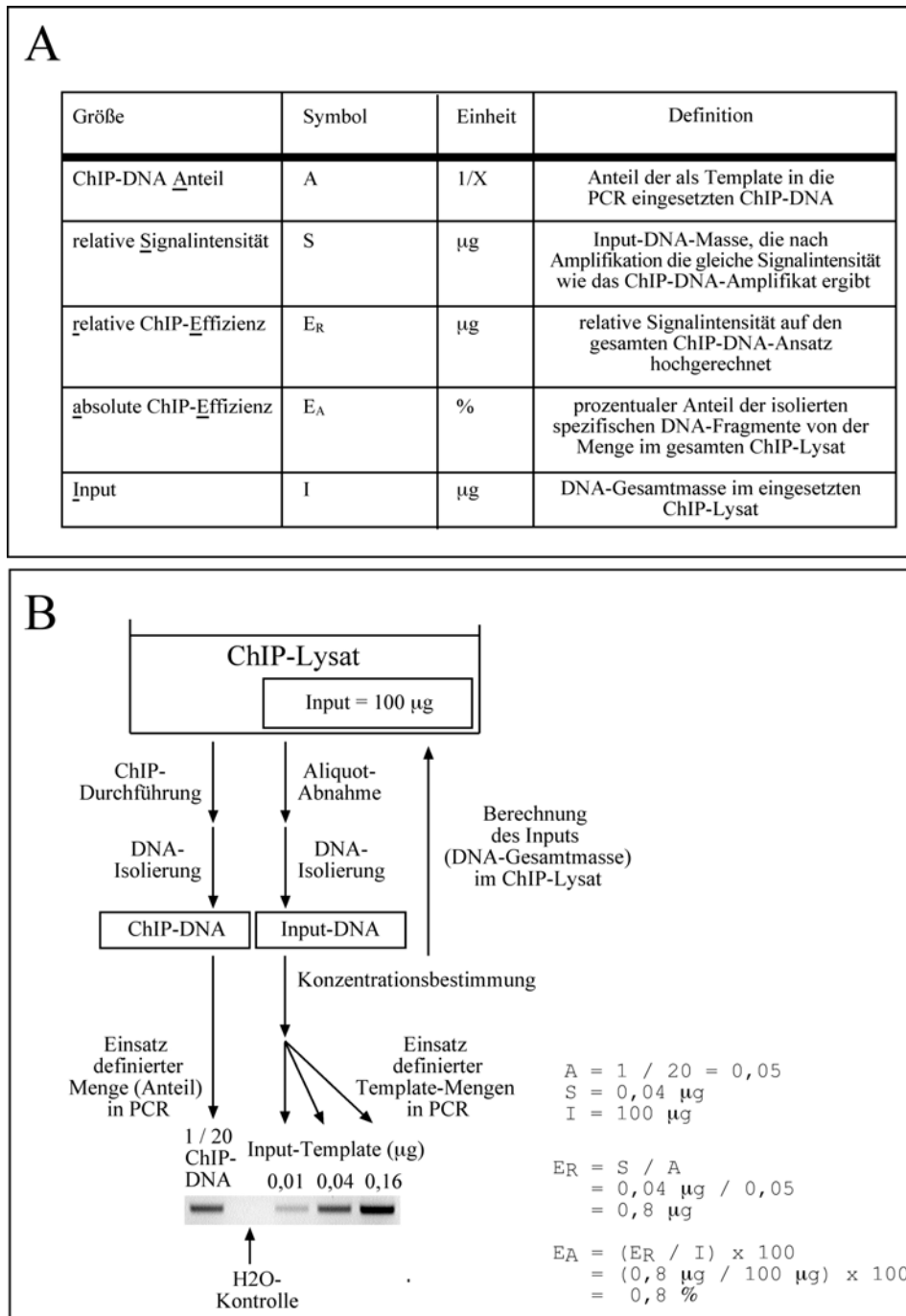


**Abbildung 14 Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP):** Der methodische Ablauf der ChIP-Analyse ist schematisch dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Abläufe wird im Text gegeben.

5.3.2 Einführung von Messgrößen

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wird eine Reihe von Begriffen eingeführt. Für das Verständnis der Dokumentation einzelner Ergebnisse ist die Definition verschiedener Größen erforderlich.

In der Abbildung 15, Seite 95, sind die eingeführten Begriffe sowie die zugehörigen Symbole, Einheiten und Definitionen tabellarisch zusammengefasst. Diese Größen werden im folgenden Abschnitt anhand eines Beispiel-Experiments erläutert.



**Abbildung 15** Eingeführte Messgrößen und Berechnung der absoluten ChIP-Effizienz. **A:** Die innerhalb der vorliegenden Arbeit eingeführten Messgrößen und Definitionen sind tabellarisch zusammengefasst. **B:** Dargestellt ist eine Beispielberechnung zur Bestimmung der absoluten ChIP-Effizienz, die im Text ausführlich erklärt ist.




Die elementare Messgröße bei der ChIP ist die erhaltene Menge eines spezifischen DNA-Fragmentes nach spezifischer Chromatin-IP (enthalten in der jeweiligen ChIP-DNA). Gemessen wird diese Menge indirekt im Rahmen einer vergleichenden PCR-Analyse. Durch den Vergleich der Mengen von ChIP-DNA-Amplifikat und den Produkten der Input-DNA-Verdünnungsreihe kann ermittelt werden, welchem Äquivalent der Input-DNA-Verdünnungsreihe der eingesetzte Teil der zu untersuchenden ChIP-DNA entspricht. Im Beispiel-Experiment (siehe Abbildung 15B, Seite 95) werden 1/20 der ChIP-DNA in die PCR-Reaktion eingesetzt. Dieser eingesetzte Teil (1 / 20 bzw. 0,05) der insgesamt isolierten ChIP-DNA wird als ChIP-DNA-Anteil -A- bezeichnet. Nach Amplifikation entspricht die resultierende Produktintensität im Beispiel einer Input-DNA Template-Masse von 0,04 µg. Diese 0,04 µg werden als relative Signalintensität -S- (bei gegebenem Anteil) definiert. Die relative ChIP-Effizienz -E<sub>R</sub>- berechnet sich aus der relativen Signalintensität -S-, geteilt durch den eingesetzten ChIP-DNA-Anteil -A-. Sie ist also ein Maß, dass sich unabhängig von dem konkret eingesetzten Anteil der ChIP-DNA auf die Gesamtheit der angereicherten DNA-Fragmente bezieht. Im abgebildeten Beispiel beträgt  $E_R = S / A = 0,04 \mu\text{g} / 0,05 = 0,8 \mu\text{g}$ . Um zusätzlich bestimmen zu können, wie viel Prozent der gesamten im ChIP-Lysat vorhandenen spezifischen DNA-Fragmente nach Durchführung der ChIP isoliert worden sind, wird die relative ChIP-Effizienz durch die DNA-Gesamtmasse im eingesetzten ChIP-Lysat (definiert als Input -I-) geteilt und mit 100 multipliziert um prozentual dargestellt werden zu können. Der resultierende Wert wird als absolute ChIP-Effizienz -E<sub>A</sub>- definiert. Bei einem Input von 100 µg resultiert in der Beispielrechnung:  $E_A = (E_R / I) \times 100 = (0,8 \mu\text{g} / 100 \mu\text{g}) \times 100 = 0,8\%$ . E<sub>A</sub> stellt eine Größe dar, mit der sowohl verschiedene Antikörper innerhalb des gleichen ChIP-Experiments als auch zwei unabhängige ChIP-Experimente direkt verglichen werden können.

### 5.3.3 Notwendige Kontrollen

Bei der Chromatin-Immunpräzipitation handelt es sich um eine sehr komplexe Methode. An mehreren Stellen im Versuchsablauf besteht die Gefahr durch inadäquate Versuchsbedingungen nicht interpretierbare oder fragwürdige Daten zu produzieren. Um zu aussagekräftigen Ergebnissen zu gelangen und der Gefahr vorzubeugen, falsche Schlussfolgerungen zu ziehen, ist es dringend erforderlich eine Reihe von Standards bei der Durchführung der Experimente festzulegen. Diese beinhalten vor allem bestimmte Kontrollen, die standardmäßig durchgeführt werden sollten.

Grundsätzlich gilt unter den in dieser Arbeit beschriebenen Bedingungen, dass in jedem Fall und aus allen ChIP-DNA-Ansätzen spezifische Amplifikationsprodukte entstehen, wenn die Zyklenzahl in der PCR hoch genug gewählt wird. Dies bedeutet, dass die Detektion eines spezifischen PCR-Amplifikats nach spezifischer ChIP allein noch keinerlei Aussagekraft besitzt. Vor diesem Hintergrund stellen angemessene Antikörperkontrollen und die jeweils parallel amplifizierte Input-DNA das adäquate Bezugssystem dar. Über einen weiten Input-DNA-Bereich ist es möglich, die eingesetzten Verdünnungsstufen mit der jeweiligen Zyklenzahl so abzustimmen, dass für eine große Spannweite von DNA-Fragmentmengen jeweils optimale Messbedingungen erzeugt werden (siehe Abbildung 16, Seite 97).

Innerhalb der vorliegenden Arbeit kamen Input-DNA-Verdünnungsstufen von 256 ng bis 125 pg zum Einsatz. Im konkreten Experiment wurden die PCR-Zyklenzahlen auf den jeweils adäquaten Messbereich abgestimmt.

Input-DNA Verdünnungsreihe ( 2-fach) als PCR-Template (ng)	PCR-Zyklenzahl
<p>16    32    64    128    256</p> 	30
<p>0,25   0,5   1    2    4    8    16    32</p> 	33
<p>0,25   0,5   1    2    4</p> 	37

**Abbildung 16** Der dynamische Messbereich bei der PCR-Quantifizierung der ChIP: Durch eine optimale Abstimmung der PCR-Zyklenzahl mit der Menge der eingesetzten Input-DNA-Verdünnungsstufen ist es möglich, über einen weiten Dynamikbereich (dargestellt ist der Bereich von 0,25 ng bis 256 ng) spezifische DNA-Mengen bestimmen zu können.

Innerhalb von ChIP-Experimenten können drei grundsätzliche Arten von Kontrollen definiert werden:

IgG-Negativkontrolle:

In jedem ChIP-Experiment sollte die mit einem bestimmten Antikörper erzielte Ausbeute an DNA-Fragmenten direkt mit der entsprechenden Ausbeute nach Einsatz einer Negativ-Kontroll-ChIP verglichen werden. Für die Negativkontrolle wird ein im Sinne des Experiments unspezifischer Antikörper eingesetzt (IgG-Negativkontrolle). Bei diesem Vergleich müssen gleiche ChIP-Lysat- und gleiche Antikörpermengen eingesetzt werden. Wenn gleiche Anteile der resultierenden ChIP-DNAs in die PCR-Reaktion eingesetzt werden, kann direkt die Intensität der resultierenden Amplifikationsprodukte verglichen werden. Nur wenn das Signal nach spezifischer ChIP reproduzierbar deutlich über dem Signal nach Kontroll-ChIP liegt, kann von einer spezifischen Anreicherung ausgegangen werden. Die absolute ChIP-Effizienz nach IgG-ChIP kann als unspezifischer Hintergrund interpretiert werden. Dieser Hintergrund resultiert aus unspezifischer Bindung von DNA-Fragmenten an Protein-G-Sepharose-Beads und / oder den eingesetzten Antikörper. Im Rahmen dieser Arbeit lag die absolute ChIP-Effizienz nach Einsatz von Negativkontroll-Antikörpern (bzw. der unspezifische Hintergrund) je nach speziellen experimentellen Bedingungen bei 0,002% bis 0,01%.

Lokal differenzielle Anreicherungskontrolle:

Wie bereits beschrieben, entstehen durch Formaldehyd-Behandlung nicht nur Protein-DNA-, sondern auch Protein-Protein-Komplexe. Aus diesem Grund liegen nach der Fixierung vermutlich auch große Proteinkomplexe vor, die über DNA-bindende Faktoren mit der DNA komplexiert sein können (Orlando 2000). Viele Transkriptionsfaktoren interagieren sowohl mit der DNA, als auch direkt oder über sogenannte Adapter-Proteine mit dem RNA-

Polymerase-II-Komplex (Lemon and Tjian 2000). Im Fall von Enhancer-Elementen können in diesem Sinne viele kb DNA-Sequenz überbrückt werden. Diese Überbrückung scheint in einigen Fällen durch das Formaldehyd fixiert zu werden, so dass auf diese Weise entfernt liegende DNA-Bereiche indirekt miteinander vernetzt werden. Es ist möglich die durchschnittliche DNA-Fragmentgröße nach Sonifizierung zu überprüfen: Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass diese DNA-Fragmente einheitlicher Größe im Lysat zu einem bestimmten Grad noch über Proteinbrücken verbunden sind. Diese Zusammenhänge könnten dafür verantwortlich sein, dass in einigen Fällen auch deutlich von der jeweiligen Zielregion entfernt erhöhte Werte ermittelt werden und dass einige Faktoren im Vergleich zur Antikörper-Negativkontrolle generell zu leicht erhöhten Anreicherungen führen (Boyd et al. 1998) (und eigene Beobachtungen).

Um zu einer Aussage über die spezifische Besetzung eines DNA-Elementes durch einen Faktor zu gelangen, sollten neben einer PCR über die postulierte Bindungsregion aus dem gleichen ChIP-DNA-Ansatz in Bereichen von mindestens 500 bp 5' und 3' vom ersten DNA-Abschnitt entfernt Kontroll-PCRs durchgeführt werden. Auf diese Weise kann eine differentielle lokale Anreicherung nachgewiesen werden bzw. die Lokalisation des responsiven DNA-Bindungselementes kann innerhalb der methodisch bedingten Grenzen *in-vivo* verifiziert werden.

### PCR- / ChIP-Replikat-Kontrolle:

Die analytische PCR-Reaktion ist extrem anfällig gegenüber inhibierenden Einflüssen. Eine Verminderung der Amplifikationsrate in einem der zu vergleichenden PCR-Ansätze wirkt sich in jedem Zyklus erneut aus und kann eine drastische Verfälschung der Daten bewirken. Andererseits können kleinste Verunreinigungen durch humane genomische DNA zu falsch positiven Ergebnissen führen. Aus diesem Grund ist es in bestimmten Fällen sinnvoll, PCR-Duplikate anzusetzen. Dies ist auch dann empfehlenswert, wenn sich die beobachteten oder zu erwartenden Intensitäts-Unterschiede lediglich um den Faktor 2 unterscheiden.

Werden mittels ChIP Kartierungsexperimente durchgeführt und sollen daher benachbarte DNA-Regionen aufgrund unterschiedlicher spezifischer Anreicherungen (bzw. verschiedener absoluter ChIP-Effizienzen) verglichen werden, so sollten die entsprechenden Kartierungen auf mindestens 2 unabhängigen ChIPs zu gleichen qualitativen Ergebnissen führen

### 5.3.4 Kriterien zur Interpretation erhaltener Daten

Der experimentelle Ablauf der ChIP-Methode umfasst eine große Anzahl von Teilschritten. Von der Anzucht und Stimulation der Zellen bis hin zu den resultierenden Daten in Form der absoluten ChIP-Effizienzen gibt es eine Vielzahl von Arbeitsschritten, bei denen es zwischen zwei Experimenten oder zwei zu vergleichenden ChIP-Ansätzen desselben Experiments zu Fehlern kommen kann. Werden die Arbeitsschritte exakt standardisiert und wird bei der Durchführung auf ein großes Maß von Genauigkeit geachtet, so lassen sich die entsprechenden Fehler auf einen Faktor von 2 oder geringer reduzieren. Bei der Interpretation der erhaltenen Daten muss immer die entsprechende Ungenauigkeit innerhalb dieser Größenordnung (Faktor 2) zugrundegelegt werden. Unter Berücksichtigung dieses Sachverhaltes lassen sich für die Interpretation der verschiedenen ChIP-Experimente die zwei folgenden Kriterien definieren:

Ein spezifisches ChIP-Signal liegt vor:

Wenn die absolute ChIP-Effizienz nach spezifischer ChIP reproduzierbar mehr als zweifach über dem entsprechenden Wert der Negativ-Kontroll-ChIP liegt.

Die Besetzung einer spezifischen DNA-Region oder eine spezifische lokale Anreicherung liegt vor:

Wenn die absolute ChIP-Effizienz für den analysierten Bereich reproduzierbar mehr als zweifach über dem entsprechenden Wert im Bereich einer 0,5 kb entfernten Region liegt. Liegen die ermittelten Unterschiede im Bereich des Faktors 2, so wird mindestens ein unabhängiges ChIP-Experiment zusätzlich mit herangezogen.

### 5.3.5 ChIP-Protokoll

#### Benötigte Puffer und Lösungen:

Fixierungslösung:	0,1 M NaCl 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 50 mM Tris-HCl, pH 8 11% Formaldehyd (frisch dazu aus 37% Stock-Lösung)
Waschlösung A:	0,25% Triton X-100 10 mM Tris-HCl, pH 8 10 mM EDTA 0,5 mM EGTA 0.5% Aprotinin 0.5 mM PMSF
Waschlösung B:	200 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 0.5% Aprotinin 0.5 mM PMSF
TE-Puffer	10 mM Tris, pH 7.5 1 mM EDTA
Eluierungspuffer:	TE-Puffer mit 1% SDS
High Salt-Puffer	2 M NaCl 10 mM Tris, pH 7.5 1% NP-40 0.5% DOC 1 mM EDTA



ChIP-RIPA-Puffer:	10 mM Tris, pH 7.5
	150 mM NaCl
	1% NP-40
	1% DOC
	0.1% SDS
	1 mM EDTA
	0.5% Aprotinin

### Fixierung:

Die einzusetzenden Suspensionszellen (HL-60, Jurkat) werden bis zu einer Dichte von max.  $6 \times 10^5$  Zellen / ml angezogen. Die Zellen werden bei 4°C für 8 min bei 300 x g am Gefäßboden (50 ml Falcon-Gefäße, Beckman, Typ: CL-GPKR, 1200 rpm) oder bei 700 x g (230 ml Spitztubes, Beckman, Typ: J-6B, Rotor JA-14, 1800 rpm) zentrifugiert. Anschließend werden die Zellpellets mit 10 ml Glaspipetten in kleinen Volumina eiskaltem RPMI-Medium vorsichtig resuspendiert und auf eine Dichte von  $10^6$  Zellen / ml Medium eingestellt. Die Zellsuspension wird im Becherglas auf Eis gerührt (Magnetrührer und Rührfisch). 1 / 10 Volumen der Fixierungslösung wird tropfenweise zugeführt. Nach 45 min wird die Fixierung durch Zugabe von festem Glycin (0,125 M) abgestoppt. Die Suspension wird weiter gerührt, bis sich das gesamte Glycin gelöst hat. Anschließend wird wie oben zentrifugiert, mit kaltem PBS gewaschen (ca. 100 ml /  $10^8$  Zellen) und erneut zentrifugiert. Die Zellpellets werden in Waschlösung A resuspendiert (5 ml /  $10^8$  Zellen) 15 min bei RT auf der Wippe inkubiert und bei 3000 x g am Gefäßboden (15 ml Falcon-Gefäße, Beckman, Typ: CL-GPKR, 3800 rpm) für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wird identisch mit Waschlösung B gewaschen und abzentrifugiert. Die resultierenden Pellets werden in ChIP-RIPA-Puffer resuspendiert ( $5 \times 10^7$  Zelläquivalente / ml). Die Proben werden viermal für eine Minute mit jeweils einminütiger Pause in 5 ml-Aliquots auf Eis sonifiziert. Die Standard-Parameter sind: Amplitude: 50%, Puls: 0,5, Sonotrode: S7, Ultraschallprozessor: UP200H, Dr. Hielscher. Die Eintauchtiefe der Sonde sollte ca. 1,5 cm betragen. Das sonifizierte Lysat wird in 2 ml Eppendorf-Tubes überführt und bei 4°C für 20 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird sehr vorsichtig abgenommen und für die folgenden ChIPs eingesetzt. Für die Aufreinigung der Input-DNA werden 10 µl Lysat abgenommen und direkt einem reversen Crosslinking bzw. der DNA-Aufarbeitung unterzogen.

### Chromatin-IP:

Für die ChIPs wird jeweils 1 ml Lysat ( $5 \times 10^7$  Zelläquivalente) mit 2 µg Antikörpern für mindestens 3 h bei 4°C auf der Wippe inkubiert. In der Zwischenzeit werden Protein-G-Sepharose-Beads zweimal mit ChIP-RIPA-Puffer gewaschen und jeweils kurz in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit anzentrifugiert. In einem Volumen von 200 µl ChIP-RIPA-Puffer werden pro ChIP 15 µl Beads zu den einzelnen Ansätzen gegeben. Die Ansätze werden danach für eine weitere Stunde bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Zum Ernten der Immunkomplexe wird erneut kurz anzentrifugiert. Das Lysat wird abgenommen und verworfen. Die Beads werden in je 1,5 ml der folgenden Puffer für je 10 min bei 4°C gewaschen: 1. ChIP-RIPA, 2. ChIP-RIPA, 3. High-Salt, 4. ChIP-RIPA. Es folgt ein kurzer Waschschriff in 1,5 ml TE bei RT. Nach Abzentrifugation der Beads wird das TE vollständig abgesaugt. 55 µl Eluierungspuffer werden auf die Beads gegeben und die Ansätze werden im Eppendorf-Schüttler bei RT und 1200 rpm für 15 min inkubiert. Danach wird wieder anzentrifugiert und 50 µl der jeweiligen Eluate werden in neue Gefäße überführt.

Reverses Crosslinking:

Sowohl die ChIP-Eluate als auch die Input-DNA-Proben werden mit TE-Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Hierbei wird RNase A bis zu einer finalen Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Die Ansätze werden bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Input-DNA-Proben werden auf 0,25% SDS nachjustiert und allen Ansätzen werden 5 µl aus einem Proteinase K-Stock (20 µg/µl) zugefügt, so dass eine finale Konzentration von 500 µg / ml resultiert. Die Proben werden für mindestens 6 h bei 37°C verdaut. Es folgt eine Inkubation für mindestens 6 h im Wasserbad bei 65°C. Nach Abkühlen der Ansätze wird eine Phenol / Isoamylalkohol / Chloroform (PIC)-Extraktion durchgeführt. Hierfür werden je 200 µ einer PIC-Mischung mit den Volumenanteilen 25+1+24 zu den Proben gegeben. Es wird für 20 Sekunden gevortext und anschließend für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Von der oberen Phase werden 180 µl abgenommen und mit dem gleichem Volumen Isoamylalkohol/Chloroform (1+24) wie beschrieben erneut extrahiert. 150 µl der oberen Phase werden anschließend abgenommen und einer Ethanol-Fällung unterzogen. Hierfür werden jeweils 15 µl 3M NaAc, pH 5,2, 20 µg Glycogen (als Fällungshilfe) und 450 µl Ethanol (100%) addiert (Fällung in 2 ml-Eppendorf-Gefäßen!). Die Fällung wird für 2 h bei -20°C und anschließend 45 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C durchgeführt. Nach der Fällung werden die Ansätze für 25 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände werden sehr vorsichtig abgenommen, die Gefäße werden auf Eis gestellt und zum Waschen der Präzipitate wird vorsichtig 800 µl kalter Ethanol (70%) in die Eppendorfgefäße gegeben. Die Proben werden 10 min auf Eis stehengelassen und anschließend für 5 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach vorsichtiger Abnahme des Ethanols werden die Pellets an der Luft getrocknet und anschließend in 50-250 µl TE-Puffer aufgenommen. Zum vollständigen Lösen der DNA werden die Proben für 15 min im Eppendorf-Schüttler bei 37°C und 1200 rpm geschüttelt. Die Konzentration der Input-DNA-Ansätze wird photometrisch bestimmt (aus diesem Wert kann auf die DNA-Gesamtmasse im jeweiligen ChIP-Lysat hochgerechnet werden, Input). Für die Bestimmung der durchschnittlichen DNA-Fragmentgröße werden 600-1000 ng der aufgereinigten Input-DNA in einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die aufgereinigte DNA wird generell bei -20°C gelagert.

PCR-Analyse:

PCR-Ansatz:

3 µl 10 x Hotstar PCR-Puffer (QIAGEN)  
3 µl dNTP-Mix (4 x 2 mM), final 4 x 0,2 mM  
3 µl Primer-Gemisch (Forward und Reverse-  
Primer, beide je 10 µM), final je 1 µM  
18 µl PCR-Wasser  
0,5 µl Hotstar-Taq-Polymerase (QIAGEN)  
(5U / µl), final 2,5 U / Ansatz  
2,5 µl DNA-Template

---

30 µl

Standard-PCR-Protokoll:

Vordenaturierung (+Aktivierung des Enzyms)	95°C, 15 min	
Denturierung:	94°C, 20 sec	30-39 Zyklen
Annealing:	60°C, 20 sec	
Elongation:	72°C, 20 sec	
Finale Elongation:	72°C, 7 min	

Für die Standard-PCR wurden 1/20 der einzelnen ChIP-DNA-Ansätze, d.h. in der Regel 2,5 µl, eingesetzt (im Fall der RNA-Pol-II-ChIPs, sowie bei einigen α-Ac-Histon-ChIPs wurde teilweise nur 1/100 der ChIP-DNA eingesetzt). Für die meisten der verwendeten Primerpaare ergab die Kombination von den Input-DNA-Verdünnungsstufen 32ng, 8ng und 2ng mit der Zyklenzahl 34 einen aussagekräftigen Messbereich. Ergab sich aufgrund der ChIP-DNA-Signalintensitäten die Notwendigkeit, andere Input-DNA-Verdünnungsstufen einzusetzen, so wurde pro Halbierung (bzw. Verdopplung) der Input-DNA-Mengen die PCR-Zyklenzahl um eine Zahl erhöht (bzw. verringert). Dies bedeutete beispielsweise beim Einsatz der Verdünnungsstufen 8ng, 2ng und 0,5ng eine Zyklenzahl von 36.

Quantifizierung:

Für die Quantifizierung wurden die mit Hilfe der Image SXM-Software erstellten digitalisierten Gelbilder im TIFF-Format in das Aida-Programm importiert. In diesem Programm wurde durch die Quantifizierung der Signalintensitäten der Input-DNA-Verdünnungsreihe eine Eichkurve erstellt. Damit konnten die relativen Signalintensitäten der ChIP-DNA-Amplifikationsprodukte ermittelt werden.

5.3.6 Allgemeine Hinweise zur Durchführung von PCR-Reaktion und Quantifizierung:

PCR:

- Es sollte grundsätzlich mit gestopften Spitzen gearbeitet werden.
- Es ist besonders stark auf exakt gleiche Mastermixmengen vor der Zugabe der Templates in den zu vergleichenden Ansätzen zu achten (gegebenenfalls beim Pipettieren jedes PCR-Tube in die Hand nehmen).
- Alle Verdünnungen der Input-DNA werden in TE-Puffer angesetzt.
- Alle Input-DNA-Verdünnungsstufen werden auf 2,5 µl berechnet und in diesem Volumen in die PCR gegeben.
- Die Zyklenzahl muss so gewählt werden, dass keine produktbedingte Sättigung bei der Reaktion eintritt.
- Für die Durchführung einer aussagekräftigen PCR ist darauf zu achten, dass das ChIP-DNA-Produkt bei mittlerer UV-Exposition gut sichtbar ist und innerhalb der Intensitätsgrenzen von höchster- zu niedrigster Verdünnung der Input-DNA liegt.

### Quantifizierung:

- Zum Zeitpunkt der Speicherung des aufgenommenen Gelbildes sollte es zu keiner Signal-Sättigung durch erhöhte UV-Exposition kommen.
- Eine größere Auftrennungstrecke im Gel führt in einigen Fällen zur verbesserten Detektierbarkeit von Intensitätsunterschieden, gleichzeitig nimmt aber die Schärfe der entsprechenden Banden ab.
- Werden für die Gelelektrophorese mehrere Kämme in einem Gel eingesetzt, so dass mehr als eine vertikale Bahn von aufgetrennten Produktbanden (relativ zur Laufrichtung) resultiert, so muss für die Quantifizierung der Produktintensitäten unbedingt folgender Sachverhalt berücksichtigt werden: Ethidiumbromid wandert im Gel im Gegensatz zur DNA in Richtung Kathode. Aus diesem Grund werden DNA-Banden in näher zur Kathode gelegenen Bahnen intensiver angefärbt und es resultieren stärkere Signalintensitäten. Für Produkte, die direkt miteinander verglichen werden sollen (z.B. ChIP-DNA-Produkte mit Input-DNA-Verdünnungsreihe) folgt daher, dass diese Proben unbedingt innerhalb einer vertikalen Spur liegen müssen. Diese Problematik kann umgangen werden, wenn das Ethidiumbromid nicht dem Agarosegel-Ansatz zugefügt wird, sondern die Gele erst nach Auftrennung der DNA-Fragmente angefärbt werden. Erfahrungsgemäß hat dieses Verfahren aber einen negativen Einfluss auf die resultierende Bandenschärfe.
- Werden mittels ChIP Kartierungsexperimente durchgeführt und sollen daher benachbarte DNA-Regionen aufgrund unterschiedlicher spezifischer Anreicherungswerte (bzw. verschiedener absoluter ChIP-Effizienzen) verglichen werden, so sollten die entsprechenden Kartierungen auf mindestens zwei unabhängigen ChIP-Experimenten durchgeführt werden. Innerhalb eines Kartierungsexperiments sollen in jedem Fall ausschließlich die gleichen ChIP-DNA-Ansätze und Input-DNA-Verdünnungen in den verschiedenen PCR-Reaktionen eingesetzt werden.

**6 ANHANG**

**6.1 Spezielle ChIP-Bedingungen**

Abbildung Nr.	ChIP-Aufarbeitung	Zelläquivalente pro IP	Volumen pro IP	Antikörper	Antikörper-Menge	ChIP-DNA-Anteil in PCR
6	Fixierung 5 Minuten 4°C	10 <sup>7</sup>	1 ml	α-c-Myc (N-262)	2 µg	1/20
				α-Gal 4 (DBD)		
7	Standard-Bedingungen	3,8*10 <sup>7</sup>	1 ml	α-c-Myc (N-262)	2 µg	1/20
				α-c-Myc (IG13)		
				α-c-Myb (H-141)		
				α-Gal 4 (DBD)		
8A	Standard-Bedingungen	10 <sup>7</sup>	200 µl	α-RNA-Pol-II (8WG16)	10 µl	1/100
8B	Standard-Bedingungen	10 <sup>7</sup>	200 µl	α-c-Myc (N-262)	2 µg	1/20
				α-Max (C-17)		
				α-H3 (C-19)		
				a-TRRAP (T-17)		
		5*10 <sup>6</sup>	200 µl	α-Ac-H3	3,5 µl	1/100
		α-Ac-H4	4 µl			
		5*10 <sup>7</sup>	1 ml	α-Mad1 (C-19)	2 µg	1/20
9A	Standard-Bedingungen	10 <sup>7</sup>	200 µl	α-Ac-H3	10 µl	1/40
				α-Ac-H4		
9B	Standard-Bedingungen	5*10 <sup>6</sup>	200 µl	α-Ac-H3	3 µl	1/100
				α-Ac-H4	4 µl	
10	Standard-Bedingungen	5*10 <sup>6</sup>	500 µl	α-Ac-H3	4 µl	1/40
				α-Ac-H4		
11A	Standard-Bedingungen	10 <sup>7</sup>	200 µl	α-RNA-Pol-II (8WG16)	10 µl	1/100
11B	Standard-Bedingungen	10 <sup>7</sup>	1 ml	α-c-Myc (N-262)	2 µg	1/20
12	Standard-Bedingungen	5*10 <sup>6</sup>	200 µl	α-Ac-H3	3 µl	1/40
				α-Ac-H4	4 µl	
13B	Standard-Bedingungen	5*10 <sup>6</sup>	1 ml	α-Ac-H3	6 µl	1/40
				α-Ac-H4		
				α-RNA-Pol-II (8WG16)		

6.2 Abkürzungen

α-	Anti- (Antikörper)
Ac-	<u>A</u> cetyl-
Acc.-Nr.	<u>A</u> ccession- <u>N</u> ummer
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
ATP	<u>A</u> denosin- <u>T</u> ri- <u>P</u> hosphat
bHLHZip	<u>b</u> asischer <u>H</u> elix- <u>L</u> oop- <u>H</u> elix Leucin- <u>Z</u> ipper
Bp	<u>B</u> asenpaare
°C	Grad <u>C</u> elsius
Cdc	<u>C</u> ell <u>d</u> ivision <u>c</u> ycle
CDK	<u>C</u> yclin <u>D</u> ependent <u>K</u> inase
cDNA	<u>c</u> opy <u>D</u> N <u>A</u>
ChIP	<u>C</u> hromatin <u>I</u> mmunpräzipitation
CKI	<u>C</u> DK <u>I</u> nhibitor
cm	<u>C</u> entimeter
ddH <sub>2</sub> O	<u>d</u> oppelt <u>d</u> estilliertes H <sub>2</sub> O
DNA	<u>D</u> esoxy- <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
EMSA	<u>E</u> lectrophoretic- <u>M</u> obility- <u>S</u> hift- <u>A</u> ssay
EtOH	<u>E</u> thanol
g	<u>G</u> ramm
GTF	<u>G</u> enereller <u>T</u> ranskriptionsfaktor
h	<u>H</u> our (Stunde)
HAT	<u>H</u> iston <u>A</u> cetyltransferase
HDAC	<u>H</u> iston <u>D</u> eacetylase
HMG	<u>H</u> igh <u>M</u> obility <u>G</u> roup
IgG	<u>I</u> mmunglobulin Isotyp G
Inr	<u>I</u> nitiator
kb	<u>k</u> ilo <u>b</u> asepairs
l	<u>L</u> iter
μ	<u>M</u> icro

ANHANG

m	<u>M</u> illi
min	<u>M</u> inuten
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
n	<u>N</u> ano
p	<u>P</u> ico
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonyl <u>f</u> luorid
RNA-Pol II	<u>R</u> NA- <u>P</u> olymerase <u>I</u> I
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
rRNA	<u>r</u> ibosomal <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfat- <u>P</u> olyacrylamid <u>G</u> eleelektrophorese
TPA	12- <u>O</u> - <u>T</u> etradecanoyl- <u>P</u> horbol-13- <u>A</u> ccetat
Tris	<u>T</u> ris- <u>H</u> ydroxymethylaminomethan
TSA	<u>T</u> richostatin <u>A</u>
upm	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
UV	<u>U</u> ltraviolett
v/v	Volumen pro Volumen-Verhältnis
w/v	Gewicht pro Volumen-Verhältnis

## 6.3 Wissenschaftlicher Werdegang

### Studium:

<i>Oktober 1992-Oktober 1997</i>	Biologie-Diplom Studium an der Universität Hannover
<i>Oktober 1994</i>	Vordiplom (Botanik, Zoologie, Physik, Chemie)
<i>Dezember 1996-September 1997</i>	Diplomarbeit bei Prof.Dr. Schmidtke (Institut für Humangenetik, MHH), Titel: Identifizierung und Charakterisierung von TSPY-homologen Sequenzen in der Maus
<i>Oktober 1997</i>	Biologie-Diplom, Gesamtnote: Sehr gut mit Auszeichnung

### Promotionsstudium:

<i>Januar 1998-Dezember 2000</i>	Promotions-Stipendium des Graduiertenkollegs: „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“ Beginn der naturwissenschaftlichen Doktorarbeit bei Prof.Dr. Bernhard Lüscher (Institut für Molekularbiologie, MHH)
<i>Januar 2001-Juni 2001</i>	Weiterführung des Promotionsstudiengangs – BAT IIa/2-Stelle als wissenschaftlicher Mitarbeiter
<i>Juni 2001</i>	Beendigung des experimentellen Teils der Doktorarbeit

### Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter:

<i>Ab Juni 2001</i>	Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter (Institut für Pharmakologie, MHH): Aufbau einer DNA-Microarray-Einheit im Rahmen des Z02-Projektes des SFB 566: „Zytokin-Rezeptoren und Zytokin-abhängige Signalwege als therapeutische Zielstrukturen“
---------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### Auszeichnung:

<i>Mai 2002</i>	Verleihung des Hans Heinrich Niemann Gedächtnis-Preises
-----------------	------------------------------------------------------------

### Voraussichtliche Promotion:

<i>Oktober 2002</i>	Abgabe der Dissertation
<i>Dezember 2002</i>	Disputation



## 6.4 Publikationen mit Daten aus dieser Dissertation

### **Publikation (geteilte Erstautorschaft):**

Bouchard, C., O. Dittrich, A. Kiermeier et al. (2001).

“Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc- dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter.”

Genes Dev **15**(16): 2042-7.

### **Abstract und Vortrag:**

Dittrich O, Menkel AR, Poreba E, Luscher B.

“Sequential recruitment of c-Myc and Mad1 to the cyclin D2 gene and associated changes in histone acetylation.”

4<sup>th</sup> EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, August 26-30, (2000)

## 6.5 Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernhard Lüscher für die Betreuung dieser Doktorarbeit. Seine optimistische Grundeinstellung, sein Interesse am aktuellen Stand meiner Forschungsergebnisse und seine ständige Gesprächsbereitschaft, waren für mich die wesentlichen Grundlagen für ein erfolgreiches wissenschaftliches Arbeiten. Ich verdanke Herrn Dr. Lüscher einen großen Teil meiner wissenschaftlichen Weiterentwicklung. Die dreieinhalb-jährige experimentelle Phase meiner Doktorarbeit habe ich vor allem aufgrund des offenen und freundschaftlichen Umgangs mit den Kolleginnen und Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe als persönliche Bereicherung erlebt. Die beschriebene freundschaftliche Atmosphäre im Umgang miteinander ist zu einem großen Teil auch durch die Persönlichkeit von Herrn Lüscher geprägt worden.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jörg Schmidtke für die Übernahme des Korreferates. In seinem Institut habe ich meine wissenschaftliche Grundausbildung erhalten.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie für die ständige Hilfsbereitschaft und den freundschaftlichen Umgang miteinander.

Mein Dank gilt insbesondere den MitarbeiterInnen aus unserer Arbeitsgruppe: Juliane Lüscher-Firzlauff, Hannelore Burkhardt, Sabine Schreek, Jörg Vervoorts, Sabine Rottmann, Inken Wierstra, Gesa Walsemann, Kolja Eckert, sowie den früheren MitarbeiterInnen Dominique Brandt, Annette Menkel, Anja Krippner-Heidenreich, Anette Sommer und Matthias Austen für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die Hilfsbereitschaft und für den freundschaftlichen Umgang miteinander.

Ich danke Frau Britta Skawran für ihre Freundschaft und viele schöne Gespräche bei der Kaffeepause.

Ich danke meinem Vater Harro Dittrich für seine langjährige finanzielle Unterstützung für die Dauer meines Studiums.

Ich möchte mich bei meiner Mutter Rosmarie Dittrich und bei meinen Schwiegereltern Günther und Irma Breiholz für die große Unterstützung im Haushalt und bei der Betreuung unserer Kinder bedanken.

Ich danke meiner geliebten Familie, meiner Frau Anke Breiholz und meinen beiden Söhnen Jonathan und Yannik für das hohe Maß an Toleranz in Zeiten meiner geistigen und physischen Abwesenheit. Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Anke für die langjährige Übernahme eines Großteils der Aufgaben bei der Kindererziehung und im Haushalt, ohne die die Dissertation nicht hätte fertiggestellt werden können.

Ich bin Gott (dem Schicksal) dankbar für die Tiefpunkte im Verlauf der experimentellen Arbeit, da gerade diese Phasen für mich Chancen der persönlichen Weiterentwicklung und der Rückbesinnung auf das Wesentliche eröffnet haben.

## 6.6 Die Regulation der Gentranskription -ungekürzte Fassung-

### 6.6.1 Die Bedeutung differentieller Genregulation im lebenden Organismus

Die Regulierbarkeit der Expression von Genen stellt eine fundamentale Voraussetzung für die Existenz aller Lebewesen dar. Im weitesten Sinne gewährleistet eine genau koordinierte Genexpression die strukturelle und funktionelle Integrität einer individuellen Zelle. Zusätzlich befähigt regulierbare Genexpression Lebewesen, auf wechselnde Umwelteinflüsse angemessen und vorteilhaft reagieren zu können.

Wird ein vielzelliger Organismus betrachtet, so wird auch die Notwendigkeit der Steuerung ontogenetischer Abläufe deutlich. Jeder Teilprozess im Rahmen der Entwicklung eines Vielzellers, aus der befruchteten Eizelle bis hin zum vollständig ausdifferenzierten Lebewesen, bedarf einer genauesten Koordination der Genexpression.

Im vollständig entwickelten, vielzelligen Organismus sind die Individualität und der physiologische Zustand eines jeden Zelltyps über ein charakteristisches genomweites Expressionsmuster determiniert. Im Kontext der einzelnen Zelle ist regulierbare Genexpression gleichbedeutend mit einer Veränderbarkeit dieses individuellen Expressionsprofils.

Da jede Zelle des Vielzellers mit dem identischen genetischen Material ausgestattet ist, bedarf es eines hoch selektiven Regulationssystems um in jedem Zelltyp die Aktivierung unterschiedlicher Gengruppen gewährleisten zu können.

Wie komplex die Anforderungen an dieses System im Vielzeller sind, spiegelt sich auch wider, wenn betrachtet wird, auf welche unterschiedliche Weise einzelne Gene reguliert werden können und müssen.

Obwohl im Rahmen der Proteinbiosynthese an verschiedenen Stellen regulierende Mechanismen wirksam werden, wird in diesem Text ausschließlich Regulation auf der Ebene der Transkription dargestellt, da diese das weitaus umfassendste regulatorisch wirksame Potential aufweist und nur die Transkriptionsregulation Inhalt der vorliegenden Arbeit ist. Den zentralen Schritt stellt hierbei die Initiation der Vorläufer-RNA Synthese dar.

### 6.6.2 Vier verschiedene Kategorien der Genregulation

Anhand von vier Beispielen werden in diesem Abschnitt die grundsätzlichen Regulationsformen der Transkription dargestellt. Bei der Einteilung in die vier aufgeführten

Kategorien handelt es sich um eine schematisierte Klassifizierung. Unter Umständen können einige Gene hinsichtlich ihres Regulationsmechanismus mehr als einer Kategorie zugeordnet werden:

**Konstitutive Expression (-Repression):**

Viele Gene, deren Produkte im Rahmen allgemeiner Stoffwechselwege benötigt werden, werden konstitutiv exprimiert. In diesen Fällen reicht ein konstanter Spiegel der synthetisierten Genprodukte (in der Regel Enzyme) aus, um eine spezifische Funktion zu gewährleisten. Es besteht keine Notwendigkeit zusätzlicher Regulation. Ein Beispiel liefert das Stoffwechselenzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), dessen konstitutiv aktivierte Expression zu einer breiten Anwendung als Normalisierungskontrolle in Expressions-Studien geführt hat.

Die Mehrzahl der Gene einer Zelle sind jedoch überwiegend konstitutiv reprimiert.

**Zellschicksal- / Zellzyklus-abhängige Expression:**

Unter diese Gruppe fallen Gene, deren Produkte die physiologische Konstitution einer Zelle im Rahmen von Zellzyklusregulation und Zellschicksal festlegen. Das Expressionsmuster dieser Gene determiniert das unmittelbare Schicksal der individuellen Zelle anhand von 4 grundsätzlichen Optionen: Prinzipiell ergeben sich für Zellen die Möglichkeiten 1) des Wachstums bzw. der Zellteilung (Fortschreiten im Zellzyklus), 2) der Zelldifferenzierung, 3) des Ruhezustandes (G<sub>0</sub>-Phase) oder 4) des programmierten Zelltodes (Apoptose).

Die Gene dieser Gruppe programmieren Zellen weitgehend unabhängig vom spezifischen Zelltyp bzw. vom jeweiligen Differenzierungsstatus, für einen bestimmten „Weg“ innerhalb des unmittelbaren Zellzyklusgeschehens.

Eine genau abgestimmte Regulation des Wachstumsverhaltens von Zellen ist gerade im Vielzeller von fundamentaler Bedeutung. Fehlreguliertes Wachstumsverhalten von Zellen birgt Gefahren für den Gesamtorganismus. Onkogene und Tumorsuppressorgene sind gute Beispiele dafür, daß sich die Aktivität von Genprodukten direkt auf das unmittelbare Schicksal einer Zelle auswirken kann, wenn sie unangemessen reguliert oder inaktiviert werden (Chin et al. 1998; McCormick 1999; Macleod 2000; Lutz et al. 2002).

Ein zusätzliches Charakteristikum für Zellschicksal- / Zellzyklus-abhängige Expression ergibt sich aus dem Zusammenhang, daß vor allem die zeitlichen Aktivitätsmuster der entsprechenden Gene direkt mit der jeweiligen Funktion im Rahmen des Zellzyklusgeschehens zusammenhängen.

Bei vielen unmittelbar Zellzyklus-abhängig regulierten Genen kommt es in besonderem Maße auf einen exakt koordinierten Wechsel von Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismen an. Ein konkretes Beispiel hierfür sind viele Zykline, deren zeitliches Expressionsmuster durch einen alternierenden Wechsel von Genaktivität und Inaktivität gekennzeichnet ist. Es ist hierbei in erster Linie das charakteristische Expressionsmuster, daß direkt mit der spezifischen Funktion im Rahmen der Zellzyklus-Stimulation korreliert (Sherr 1993).

### **Signalinduzierte Expression**

Zellen müssen in der Lage sein, adäquat auf eine Veränderung äußerer Umwelteinflüsse zu reagieren. Auf der Ebene der einzelnen Zelle ist „Reaktion“ gleichbedeutend mit Veränderung des Genexpressionsmusters.

Bestimmte Zelltypen sind für bestimmte Signale sensibilisiert (in der Regel durch spezifische membranständige Oberflächenrezeptoren). Wird ein Signal empfangen, so wird dieses durch verschiedene Signaltransduktionswege in den Zellkern weitergeleitet. Als unmittelbare „Antwort“ der Zelle wird anschließend die Expression oder Reprimierung einzelner Gene induziert. Zahlreiche Beispiele für Signalinduzierte Genexpression finden sich im Bereich der Kommunikation zwischen Zellen. Durch ein umfangreiches Netzwerk verschiedener Cytokine und spezifischer Cytokin-Rezeptoren wird beispielsweise die Kommunikation zwischen Immunzellen koordiniert (Belardelli 1995).

Die Befähigung eines bestimmten Zelltyps, ein Signal zu registrieren und angemessen zu reagieren, stellt ein spezifisches funktionelles Merkmal dieser Zelle dar. Damit diese Funktion im Rahmen des individuellen Schicksals der Zelle erhalten bleibt, müssen Signal-abhängig regulierte Gene auch nach einem einmaligen Regulationsprozeß noch potentiell aktivierbar bleiben. Diese Gene können also im Verlauf des individuellen Zellschicksals oftmals reinduziert werden.

### **Differenzierungsabhängige- / Zelltypspezifische Expression**

Wie bereits beschrieben, ist die Individualität eines jeden Zelltyps primär durch ein einzigartiges Genexpressionsmuster festgelegt. Neben der überwiegenden Mehrzahl der Gene, die entweder gleichbleibend reguliert werden (konstitutiv aktiviert oder reprimiert sind) oder in vergleichbarem Ausmaß potentiell regulierbar sind (Zellzyklus- oder Signal-abhängig), sind es genau die Differenzierungsabhängig-regulierten Gene, die Individualität einzelner Zelltypen, bzw. die Ausbildung eines spezifischen, Struktur und Funktion umfassenden Phänotyps gewährleisten.

Innerhalb dieser Gengruppe kann die spezielle Regulationsform unterteilt werden: Einige Gene werden ab einem bestimmten Zeitpunkt der Differenzierung induziert, die Gene bleiben aktiv und die entsprechenden Genprodukte sind direkt an der Ausbildung des Phänotyps der ausdifferenzierten Zelle beteiligt. Ein Beispiel hierfür ist die Regulation des  $\beta$ -globin Gens: Das  $\beta$ -globin Gen wird zu einem genau festgelegten Zeitpunkt im Rahmen der ontogenetischen Entwicklung in Erythrozyten aktiviert und stellt im adulten Säugerorganismus ein hochspezifisches phänotypisches Merkmal dieser Zellen dar (Crossley and Orkin 1993; Dillon et al. 1997).

Andere Differenzierungs-abhängig regulierte Gene sind für bestimmte Teilschritte des gesamten Differenzierungsprozesses verantwortlich. Im Rahmen musterbildender Prozesse der frühen Ontogenese gibt es viele Beispiele für diese Art der Genregulation. Hier sind es in der Regel Gene für Transkriptionsfaktoren die in Form eines zeitlich und / oder lokal exakt festgelegten Aktivierungsprogramms induziert werden (Driever and Nüsslein-Volhard 1988; Ingham 1988).

Oftmals werden diese Gene im ausdifferenzierten Organismus nicht mehr benötigt und müssen daher wieder reprimiert werden. Ihre Funktion besteht primär in der Koordination eines bestimmten „Differenzierungsschrittes“.

Als weiteres Beispiel für primär Differenzierungs-abhängig regulierte Gene können die Zelltyp-spezifischen Oberflächenmoleküle (-marker) angesehen werden, die im Rahmen der Hematopoese Individualität und Differenzierungsgrad der blutbildenden Zellen spezifizieren. Im Verlauf der T-Zell-Reifung korreliert beispielsweise die Kombination der Oberflächenmoleküle CD4, CD8, CD25 und CD44 mit dem spezifischen Differenzierungszustand der Zellen (Leclercq and Plum 1996; Glimcher and Singh 1999).

In ausdifferenzierten T-Zellen sind die Oberflächenmarker CD4 und CD8 jeweils charakteristisch für funktionell unterscheidbare T-Zell-Subpopulationen.

Ein wesentlicher Unterschied zur Steuerung bei den Signal-abhängig regulierten Genen besteht darin, daß die Induktion der Differenzierungs-abhängig regulierten Gene in ein zeitlich genau determiniertes Entwicklungsprogramm integriert ist. Die Gene werden in der Regel nur ein einziges mal aktiviert, bleiben dann aktiv, wenn sie unmittelbar am Phänotyp der ausdifferenzierten Zelle beteiligt sind oder werden wieder reprimiert, weil die Genprodukte nicht mehr benötigt werden.

Anhand der vier beschriebenen Beispiele zur speziellen Form von Genregulation wird deutlich, wie vielfältig die Anforderungen an ein Steuerungssystem der Genexpression sind. Vor dem Hintergrund identischen genetischen Materials individueller Zelltypen müssen Entwicklungs- und Wachstumsprozesse koordiniert werden. Auch Spezialisierung und Aufgabenteilung zwischen Zellen und Gewebeverbänden sind zu gewährleisten. Besteht die Gefahr, dass durch fehlreguliertes Wachstumsverhalten oder autoaggressive Zell-Zell-Interaktionen der vielzellige Organismus in seiner Gesamtheit bedroht ist, so muss die Gewichtung immer auf die Konstitution des Gesamtorganismus hin ausgerichtet sein. Gegebenenfalls müssen Einzelzellen, durch den als Apoptose bezeichneten Mechanismus, selektiv eliminiert werden. Auch diesem Prozess liegt spezifisch gesteuerte Genregulation zugrunde.

Aus der wissenschaftlichen Sicht kann die lebende Natur auf verschiedenen Ebenen untersucht und beschrieben werden. Die Regulation von Genen hat sich jedoch als so grundlegend aussagekräftiges System herausgestellt, daß alle beobachtbaren Effekte oder ganz allgemein, alle Veränderungen im Rahmen lebender Systeme, am genauesten und uneingeschränkt auf der Ebene veränderbarer Expressionsprofile beschrieben werden können. Die Funktionsweise des steuernden Koordinationssystems zu verstehen, bedeutet in diesem Zusammenhang zu einem fundamentalen (aber naturwissenschaftlichen) Verständnis der belebten Natur zu gelangen.

### 6.6.3 Eukaryontische Transkriptionsregulation als Zusammenwirken einzelner Teilprozesse

In den zwei vorangegangenen Kapiteln ist beschrieben worden, wie komplex die Anforderungen an ein zelluläres Steuerungssystem sind, mit dem die unterschiedlichen Formen der Genregulation allumfassend koordiniert werden sollen.

Für ein Verständnis der enormen Komplexität derartiger Steuerungen, ist es erforderlich die Prozesse im zeitlichen Verlauf zu analysieren. Für die Untersuchung muss der Gesamtprozess in einzelne Teilabläufe untergliedert werden. Erst dann wird es möglich, kausale Abhängigkeiten zu erkennen - und direkte von indirekten Effekten zu unterscheiden. Eine derartige Betrachtungsweise ist unumgänglich, wenn einer Einzelkomponente eine spezifische Funktion im Hinblick auf den untersuchten Gesamtprozess zugeordnet werden soll.



Im folgenden Abschnitt werden die Komponenten der „Transkriptions-Maschinerie“ vorgestellt und es wird aufgezeigt, wie sich aus dem Zusammenwirken einzelner Teilprozesse das Bild eines hochspezifisch arbeitenden Regulationssystems im eukaryontischen Vielzeller ergibt.

Die Darstellungsform ist so gewählt, dass immer zuerst eine bestimmte Komponente des Regulationsapparates beschrieben wird. Anschließend wird aufgezeigt, auf welche Weise diese Einzelkomponente zur Spezifität der Genregulation beitragen kann, bzw. welches intrinsische regulatorische Potential zugrunde liegt.

Innerhalb des letzten Abschnitts (Abschnitt 6.6.8) wird an mehreren Stellen der Versuch unternommen, ein zusammenfassendes Bild zur differentiellen Genregulation zu „skizzieren“, wobei integrativ auf die vorher geschilderten Einzelkomponenten Bezug genommen wird. In diesem Abschnitt wird auf das enorme regulatorisch wirksame Potential hingewiesen, welches die phylogenetische Entwicklung der Chromatin-Struktur in Eukaryonten ermöglicht hat.

#### 6.6.4 Komponente 1: RNA-Polymerase-II

Im eukaryontischen System wird die Gesamtheit der für Proteine kodierenden Gene von der RNA-Polymerase II (RNA-Pol-II) transkribiert. Dieses Enzym katalysiert die Vorläufer-RNA-Synthese. Als Voraussetzung hierfür muss der Bereich des Transkriptionsstartes innerhalb von Promotoren erkannt und von der Polymerase besetzt werden. Die entsprechende Region wird auch als Core-Promotor bezeichnet. Dem isolierten RNA-Polymerase-II-Enzym fehlt die entsprechende Aktivität zur spezifischen Erkennung des Core-Promotors. Assoziierte Faktoren (siehe Komponente 2, Abschnitt 6.6.5) gewährleisten die korrekte Promotorerkennung und Initiation der Gentranskription (Roeder 1996). Die RNA-Pol-II weist am C-Terminus ein charakteristisches Hepta-Peptid-Wiederholungsmotif auf (Hirose and Manley 2000). 52 Wiederholungen dieses 7-mer Aminosäuremotifs bilden in Säugetieren den C-Terminus der RNA-Pol-II aus. Dieser Bereich wird auch als C-Terminale Domäne (CTD) bezeichnet und spielt eine Rolle bei der Transkriptionsinitiation (siehe Komponente 2).

Intrinsisches regulatorisches Potential (RNA-Polymerase-II):

Die RNA-Pol-II ist das zentrale Element der Gentranskription. Die Spezifität der Gentranskription leitet sich aber erst aus der physikalischen und / oder funktionellen Interaktion mit allen zusätzlichen Komponenten des Regulationsapparates ab (siehe Komponenten 2-5).

6.6.5 Komponente 2: Generelle Transkriptionsfaktoren und Core-Promotor-Elemente

Die Erkennung eines Core-Promotors und die initiale physikalische Interaktion der RNA-Pol-II mit dem entsprechenden DNA-Abschnitt wird durch die sogenannten Generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) vermittelt. Diese Faktoren sind teilweise aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt. Anfang der (19)90-er Jahre wurden eine Vielzahl von Untersuchungen zur Funktion dieser Faktoren durchgeführt (Buratowski et al. 1989; Zawel and Reinberg 1993). Unter Einsatz rekombinanter oder aufgereinigter GTFs wurden dabei *in-vitro* Transkriptionssysteme rekonstituiert, um die zeitlichen Abläufe bei der Promotorerkennung zu analysieren. Anhand der erhaltenen Daten wurde das Modell des schrittweisen Aufbaus eines Initiationskomplexes entwickelt (Buratowski 1994; Roeder 1996): In einem ersten Schritt bindet der Faktor TFIID an die TATA-Box, ein DNA-Element innerhalb von Core-Promotoren, das im Bereich des Nukleotids -30 (relativ zum Transkriptionsstart) lokalisiert ist. TFIID setzt sich aus dem TATA-Box bindenden Protein (TBP) und einer großen Anzahl von TBP assoziierten Faktoren (TAFs) zusammen. Während die Erkennung der TATA-Box über die direkte physikalische Interaktion von TBP mit der TATA-Box vermittelt wird, interagieren einige TAFs mit benachbarten DNA-Abschnitten. Die Erkennung und Besetzung der TATA-Box stellt den ersten Schritt im Aufbau eines sogenannten basalen Transkriptionskomplexes dar.

TFIIB bindet an den TFIID-DNA-Komplex, stabilisiert die Bindung und bewirkt die Korekrutierung des Faktors TFIIF und der RNA-Pol-II. Damit ein transkriptionskompetenter Initiationskomplex entstehen kann, binden zum Schluss die GTFs TFIIE und TFIIH. TFIIE weist eine intrinsische DNA-Helikase-Aktivität auf und bewirkt eine ATP-abhängige Dissoziation der DNA-Einzelstränge im Promotorbereich. TFIIF hat Kinase-Aktivität und stimuliert durch die Phosphorylierung der RNA-Pol-II-CTD die Transkriptionsinitiation.

Neben der TATA-Box spielt das Initiator-Element (Inr) eine Rolle bei der Erkennung von Core-Promotoren und der korrekten Positionierung des Initiationskomplexes (Weis and

Reinberg 1992). Dieses Element überspannt den Transkriptionsstartpunkt des Core-Promotors. Es konnten eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die spezifisch Inr-Bindungsaktivität aufweisen, wie z.B. TFII-I, USF, YY1 und verschiedene TAFs. Möglicherweise besteht die Funktion der Inr-bindenden Proteine in einer Rekrutierung von TFIID in TATA-Box freien Core-Promotoren (Novina and Roy 1996). Zusätzlich sind verschiedene weitere Elemente identifiziert worden, die vermutlich Kontext-abhängig ebenfalls an einer korrekten Transkriptions-Initiation am Core-Promotor beteiligt sind (Ince and Scotto 1995; Verrijzer and Tjian 1996; Lagrange et al. 1998).

Die wesentliche Aufgabe von GTFs und Core-Promotor-Elementen besteht in der Koordination der Transkriptions-Initiation. Core-Promotoren werden spezifisch erkannt und nur an diesen Stellen bildet sich ein transkriptionskompetenter Komplex aus. Durch dieses Erkennungssystem wird es dem Transkriptionsapparat möglich Gene im Kontext des Genoms zu identifizieren.

*Intrinsisches regulatorisches Potential (Generelle Transkriptionsfaktoren und Core-Promotor-Elemente):*

Der Core-Promotor hat nicht nur die Funktion, den Transkriptionsstart von Genen zu definieren, sondern beeinflusst zusätzlich Stärke und Spezifität der Gentranskription.

Seit mehr als zehn Jahren ist bekannt, dass sich die Bindungsstärke von isoliertem TBP und TFIID an der TATA-Box in-vitro unterscheiden (Nakatani et al. 1990). Diese Unterschiede fallen besonders bei schwachen Promotoren ins Gewicht. Für mehrere TAFs konnte eine Funktion im Rahmen der selektiven Erkennung von Core-Promotoren aufgezeigt werden (Roeder 1996; Verrijzer and Tjian 1996).

Das Vorhandensein und die Anordnung von Core-Promotor-Elementen variiert Gen-spezifisch. Beispielsweise gibt es Gene, die sowohl TATA-Box, als auch Initiator-Element aufweisen, Gene die keines der Elemente beinhalten und Gene, in denen nur eines der Elemente vorhanden ist (Novina and Roy 1996). In mehreren Fällen konnte beschrieben werden, dass das Inr-Element im endogenen Kontext Gewebe-spezifische Expression vermittelt (Eichbaum et al. 1994; Garraway et al. 1996). Darüber hinaus ist die spezielle Kombination von TATA-Box und / oder Inr-Element in einigen Fällen charakteristisch für bestimmte Subgruppen von Genen, die auf ähnliche Weise reguliert werden (Novina and Roy 1996). In einer Untersuchung konnte durch die Einführung einer TATA-Box in einen TATA-Box-losen Promotor eine signifikante Steigerung der Transkriptionsrate erreicht werden.

Gleichzeitig ging jedoch das Potential das entsprechende Gen Zelltyp-spezifisch zu aktivieren verloren.

Neben den beschriebenen Daten zur initialen Besetzung von Core-Promotoren durch TFIID, gibt es eine Vielzahl von Ergebnissen, die unterstützen, dass die TFIID-TATA-Box Interaktion den entscheidenden, möglicherweise limitierenden Schritt bei der Aktivierung eines Gens bestimmt (Colgan and Manley 1992; Sauer et al. 1995; Jackson-Fisher et al. 1999; Kuras and Struhl 1999; Li et al. 1999). Wie noch beschrieben werden wird, stellt TFIID damit einen adäquaten Angriffspunkt für zusätzliche regulatorisch wirksame Komponenten des Transkriptionsapparates dar (siehe Komponente 3 und 4).

### 6.6.6 Komponente 3: Spezifische Transkriptionsfaktoren und DNA-Regulator-Elemente

Zusätzlich zum Core-Promotor-Bereich beinhalten eukaryontische Promotoren sequenz-spezifische Regulator-Elemente, die die Transkription positiv (Enhancer-Elemente) oder negativ (Silencer-Elemente) beeinflussen können. Für die Vermittlung dieser Effekte binden spezifische Transkriptionsfaktoren selektiv an die responsiven DNA-Bindungselemente. Die spezifische DNA-Bindung dieser Faktoren stellt die Voraussetzung für eine direkte physikalische Interaktion mit Komponenten des basalen Transkriptionskomplexes, oder eine funktionelle Einflussnahme auf den Ablauf des Genregulationsprozesses dar (siehe auch Komponente 4 und 5).

Aufgrund ihrer Eigenschaft ganz bestimmte Regulator-Elemente erkennen und binden zu können, werden spezifische Transkriptionsfaktoren in unterschiedliche Familien eingeteilt (Mitchell and Tjian 1989).

#### *Intrinsisches regulatorisches Potential (Spezifische Transkriptionsfaktoren und DNA-Regulator-Elemente):*

Die kombinatorische Vielfalt, die sich aus der großen Anzahl verschiedener spezifischer Transkriptionsfaktoren und der Anordnung unterschiedlicher Regulator-Elemente in Promotoren ergibt, leistet einen großen Beitrag zur Spezifität von Genregulation. In vielen Beispielen werden Transkriptionsfaktoren Gewebe-spezifisch exprimiert, damit auch die entsprechenden Zielgene streng Gewebe-spezifisch aktiviert werden können.

Innerhalb der hematopoetischen Zell-Differenzierung vollzieht sich die Spezifizierung ganzer Entwicklungslinien im Rahmen eines zeitlich exakt determinierten Genexpressionsprogramms. Für diese genau koordinierte Aktivierung zahlreicher Zelltyp-spezifischer Gene ist die Kooperativität von Zelltyp-spezifisch exprimierten Transkriptionsfaktoren verantwortlich (Lenny et al. 1997; Glimcher and Singh 1999).

Damit ein bestimmtes Gen induziert werden kann, müssen neben dem Vorhandensein aller kooperativ regulierenden spezifischen Transkriptionsfaktoren in der Zelle eine Reihe zusätzlicher Bedingungen erfüllt werden, die direkt diese Faktoren betreffen. Diese zusätzlichen Bedingungen können als eine weitere Möglichkeit des zellulären Transkriptionsapparates angesehen werden, regulativ wirksam zu werden, bzw. die Intensität der transkriptionellen Antwort in diesem Fall zu modulieren:

Im Fall des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sorgt beispielsweise ein komplexes Regulationssystem dafür, dass der Faktor solange im Cytoplasma „zurückgehalten“ wird, bis ein spezifisches, durch Phosphorylierung vermitteltes Signal die Translokation in den Zellkern induziert, so dass der Faktor transkriptionell aktiv werden kann (Scheidereit 1998). Diese Art der Regulation der Translokation stellt ein weit verbreitetes Prinzip dar, mit dem gewährleistet ist, dass unmittelbar auf ein bestimmtes Signal hin Zielgene aktiviert werden können und nicht erst der regulierende Faktor selbst synthetisiert werden muss.

Das Transaktivierungspotential spezifischer Transkriptionsfaktoren kann auch durch posttranslationelle Modifikationen moduliert werden: Durch Phosphorylierung oder Acetylierung des Faktors kann das DNA-Bindungspotential, die funktionelle Interaktion mit dem Polymerase-Komplex oder die Translokation in den Zellkern beeinflusst werden (Kwok et al. 1994; Oelgeschlager et al. 1995; Gu and Roeder 1997; Soutoglou et al. 2000).

Auch über einen Mechanismus der als „induced-fit“ bezeichnet wird, werden Veränderungen des funktionellen Potentials von Transkriptionsfaktoren hervorgerufen. Die Interaktion zweier Proteine löst in diesen Fällen eine allosterische Veränderung in der Konformation eines der Proteine aus, was dessen funktionelles Potential beeinflusst (Radhakrishnan et al. 1997; Burley and Roeder 1998). Für bestimmte Klassen von Transkriptionsfaktoren sind vergleichbare induced-fit Mechanismen bei der spezifischen Erkennung der responsiven Regulator-Elemente beschrieben worden (Patikoglou and Burley 1997). Da Proteine und auch DNA potentielle elektrische Ladungsträger sind, wird es bei jeder Art der physikalischen Interaktion zweier Oberflächen immer zu kleinen allosterischen Veränderungen kommen, so dass auch aus diesem Grund jede Interaktions-Oberfläche auch gleichzeitig als ein Ort potentiell regulatorischen Geschehens angesehen werden kann.

Die letzte hier aufgeführte Möglichkeit, durch welche regulatorische Prozesse auf der Ebene der spezifischen Transkriptionsfaktoren wirksam werden, ist die Steuerung der lokalen Konzentration der Transkriptionsfaktoren. Aus Experimenten zur Analyse des Transaktivierungspotentials von Faktoren (z. B. Transiente Transfektion, *In-vitro*-Transkription) geht hervor, dass in den meisten Fällen eine experimentell herbeigeführte Erhöhung der Faktorkonzentration oder die artifizielle Verbindung mehrerer Regulator-Elemente hintereinander zu einer gesteigerten Transkriptionsstimulation führen. Vermutlich ist hierfür die erhöhte lokale Faktor-Konzentration verantwortlich, die im Promotorbereich zu einer verstärkten Rekrutierung des Transkriptionskomplexes führt und damit die Expressionsrate erhöht. Inwieweit diese Möglichkeit in lebenden Zellen ausgenutzt wird ist unklar. In der Hefe existieren eine Reihe von Genen, in denen Regulator-Elemente geclustert vorliegen (Ptashne and Gann 1997).

#### 6.6.7 Komponente 4: Kofaktoren (Adaptoren, Mediatoren)\* und RNA-Pol-II Holoenzym

Anhand der Beschreibung der spezifischen Transkriptionsfaktoren (Komponente 3) wird deutlich, dass es für die Vermittlung des Regulationspotentials von Faktoren zu einer funktionellen Interaktion mit dem zentralen Molekül der Transkription, der RNA-Polymerase-II, kommen muss. Bei der Suche nach derartigen Interaktionen stand in den (19)80-er und (19)90-er Jahren die Identifikation und Analyse direkter physikalischer Kontakte im Vordergrund. In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass viele spezifische Transkriptionsfaktoren nicht direkt mit der RNA-Pol-II, sondern mit assoziierten Proteinen interagieren, die ihrerseits physikalisch mit der RNA-Pol-II verbunden sind.

Mittlerweile ist bekannt, dass derartige, auch als Adaptoren zu bezeichnende Proteine strukturell sehr heterogen sein können und in Form größerer Proteinkomplexe mit der RNA-Pol-II interagieren (Lemon and Tjian 2000).

\*Die Begriffe Adaptoren, Kofaktoren und Mediatoren sind teilweise synonyme Bezeichnungen. Den eindeutigen Überbegriff stellt der Kofaktor dar. Ein Kofaktor ist ein Protein oder Proteinkomplex, welcher Regulationseffekte zwischen spezifischen Transkriptionsfaktoren und dem RNA-Pol-II-Enzym vermittelt und damit essentiell für den jeweiligen Regulationsprozess wird. Während der Begriff Adapter sich auf die Fähigkeit eines Kofaktors bezieht, wechselseitige physikalische Kontakte herzustellen, umfasst die allgemeine Bezeichnung Mediator, so wie sie in dieser Arbeit verwendet wird, die Fähigkeit, regulatorische Potentiale in funktioneller Hinsicht vermitteln zu können. Mediator im engeren Sinne bezeichnet einen konkreten, aus der Hefe aufgereinigten Protein-Komplex.

Ein derartiges Adapter-System stellt der aus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) isolierte Mediator-Komplex dar, der in der Hefe mit der CTD der RNA-Pol-II physikalisch verbunden vorliegt (Bjorklund and Kim 1996). Für einzelne Komponenten des Mediators konnten physikalische Interaktionen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Im Vielzeller sind mittlerweile eine große Anzahl hochmolekularer Proteinkomplexe isoliert worden, in denen Homologe der Untereinheiten des Mediators, sowie zusätzliche Proteine identifiziert worden sind (Jones and Kadonaga 2000; Lemon and Tjian 2000).

Auch in diesen Komplexen beinhalten einzelne Untereinheiten Interaktionsoberflächen für spezifische Transkriptionsfaktoren.

Zu den Adapterkomplexen kann auch TFIID gezählt werden. Im Rahmen der Transkriptions-Initiation kommt es zu einer direkten Assoziation mit der RNA-Pol-II. Für eine Reihe spezifischer Transkriptionsfaktoren konnten darüber hinaus physikalische Kontakte mit einzelnen TAFs nachgewiesen werden (Verrijzer and Tjian 1996). Diese spezifischen Interaktionen scheinen für die selektive Aktivierung einzelner Gruppen von Genen in-vivo relevant zu sein (Holstege et al. 1998).

Eine Fülle von neueren Daten impliziert, dass die Form, in der die RNA-Pol-II mit Kofaktor-Komplexen assoziiert vorliegt variabel ist und ein dynamischer Austausch einzelner Komponenten stattfindet.

Hinweise für eine solche Flexibilität liefern Arbeiten, in denen große RNA-Pol-II-Komplexe, auch als RNA-Pol-II Holoenzym bezeichnet, aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Bestandteile charakterisiert worden sind (Kim et al. 1994; Koleske and Young 1994; Cho et al. 1998; Neish et al. 1998). Obwohl in den meisten derartig analysierten Komplexen sowohl GTFs, als auch viele Komponenten des Mediator-Komplexes (bzw. homologe Proteine aus Säuger-Zellen) nachgewiesen werden konnten, stellten sich die aufgereinigten Komplexe bezüglich zusätzlicher, individueller Bestandteile als sehr heterogen dar. So ergibt sich formal die Möglichkeit, dass unterschiedliche, strukturell eng verwandte Holoenzym-Komplexe auch innerhalb von lebenden Zellen nebeneinander existieren um unterschiedliche Effekte zu vermitteln.

Ein anschauliches Beispiel für eine dynamische Umgruppierung eines RNA-Pol-II-Komplexes, liefert eine Untersuchung aus dem Jahr 1999 (Otero et al. 1999). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Übergang von der Initiationsphase zur Elongationsphase der Transkription von einem Austausch der CTD-assoziierten Subkomplexe begleitet wird. Während der Mediator die hypo-phosphorylierte und Initiations-kompetente RNA-Pol-II-Form bindet, kommt es beim Übergang zur Elongationsphase zu einem Austausch mit einem

als Elongator bezeichneten Komplex, der spezifisch mit der hyperphosphorylierten CTD-Form (bzw. der Elongations-kompetenten Form) interagiert.

Aus rekonstituierten *In-vitro*-Systemen ist bekannt, dass TFIID der einzige GTF ist, der beim Übergang zur Elongationsphase der Transkription am Promotor verbleibt, während andere GTFs jeweils unterschiedlich lang mit der synthetisierenden RNA-Pol-II komplexiert bleiben (Zawel et al. 1995). Aus diesen Daten ist ein Modell entstanden, wonach durch eine Art Recycling-Mechanismus vorgeformte Subkomplexe ausgenutzt werden, um eine erleichterte bzw. effizientere Reinitiation eines Gens zu ermöglichen.

Anhand der beschriebenen Beispiele wird deutlich, dass im zeitlichen Verlauf der Transkriptionsregulation durchaus dynamische Umstrukturierungs-Prozesse innerhalb von RNA-Pol-II-Komplexen stattfinden.

Darüber hinaus existieren auch Daten, die Gen und / oder Kontext-spezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der beteiligten RNA-Pol-II-Komplexe implizieren:

Beispielsweise existieren in humanen Zellen verschiedene TFIID-Komplexe, die die Effekte von unterschiedlichen Aktivatoren vermitteln (Brou et al. 1993).

In B-Lymphozyten konnte der erste Gewebe-spezifisch exprimierte TAF (TAF<sub>II</sub>105) isoliert werden. Dieser TAF bildet in B-Zellen einen TFIID-Subkomplex aus (Dikstein et al. 1996). TAF<sub>II</sub>105 vermittelt als spezifischer Kofaktor die Aktivierung anti-apoptotischer Gene durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Yamit-Hezi and Dikstein 1998).

Eine Reihe zusätzlicher Daten dokumentieren, dass neben TFIID noch weitere verwandte Komplexe existieren, die möglicherweise kontext-spezifisch die Funktion dieses universellen Kofaktors substituieren können (Hansen et al. 1997; Wieczorek et al. 1998).

Das letzte aufgeführte Beispiel für einen molekularen Adapter stellen die beiden stark homologen Koaktivatoren CBP und p300 dar. Für diese Proteine konnten eine enorme Menge von Interaktionen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren dokumentiert werden (Goodman and Smolik 2000). Diese Moleküle binden nicht DNA, sondern stellen einen physikalischen Kontakt zwischen spezifischen Transkriptionsfaktoren und dem RNA-Pol-II-Komplex her. An der Vermittlung des Kontaktes zur RNA-Pol-II scheint zusätzlich das Protein RNA-Helikase A (RHA) beteiligt zu sein (Nakajima et al. 1997). Kotransfektions-Experimente belegen, dass CBP prinzipiell in der Lage ist, Transaktivierungspotentiale mehrerer Faktoren zu integrieren. Durch diesen Mechanismus können auch synergistische Effekte vermittelt werden (Oelgeschlager et al. 1996). Neben der Adapterfunktion weisen CBP und p300, aber auch viele Komponenten der anderen Kofaktoren spezifische enzymatische Aktivitäten auf, die



hauptsächlich auf der Ebene der Genregulation im Chromatinkontext relevant sind und an entsprechender Stelle beschrieben werden (siehe Komponente 5, Abschnitt 6.6.8). Interessanterweise konnten auch die Moleküle CBP und p300 in biochemischen Aufreinigungen als Bestandteile großer RNA-Pol-II Holoenzym-Komplexe identifiziert werden (Cho et al. 1998; Neish et al. 1998).

Durch biochemische Fraktionierungs-Methoden konnte aus Säuger-Zellextrakten eine weitere Gruppe allgemeiner Kofaktoren identifiziert werden (Meisterernst et al. 1991). Im Gegensatz zu den bislang beschriebenen Beispielen zeigen Proteine dieser, auch als USA (upstream stimulatory activity)-Fraktion bezeichneten Gruppe, keine stabile Bindung zum basalen Transkriptionsapparat.

Aus der USA-Fraktion konnten eine Reihe von Einzelkomponenten isoliert werden. Hierbei handelt es sich sowohl um positive Kofaktoren (im englischen als PCs bezeichnet) als auch um negative Kofaktoren (NC) (Kaiser and Meisterernst 1996).

Viele Komponenten der USA-Fraktion entfalten ihr regulatorisch wirksames Potential, indem sie die Stärke, mit der spezifische Transkriptionsfaktoren ihre responsiven DNA-Elemente binden verändern. Andere USA-Komponenten beeinflussen Interaktionen von Transkriptionsfaktoren mit RNA-Pol-II Holoenzym-Komplexen. Vermutlich können diese Eigenschaften der USA-Kofaktoren, wie im Fall des Proteins PC4, Signal-abhängig reguliert werden (Kaiser and Meisterernst 1996).

Genau wie die TAFs in TFIID, der Mediator in der Hefe, entsprechend analoge Komplexe im Vielzeller und die Kofaktoren CBP / p300, wird auch durch die Faktoren der USA-Fraktion das regulatorisch wirksame Potential von spezifischen Transkriptionsfaktoren durch eine funktionelle Interaktion mit der RNA-Pol-II vermittelt. Auf diese Weise ist es dem Transkriptionsapparat möglich, durch die kooperative Wirkung von Regulator-Elementen, spezifischen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren die Aktivität der RNA-Pol-II zu beeinflussen. Lange Zeit wurde in diesem Zusammenhang das Model der RNA-Pol-II Rekrutierung als Erklärungsansatz zugrunde gelegt (Ptashne and Gann 1997). Nach diesem Modell besteht die resultierende Beeinflussung der RNA-Pol-II darin, dass synthetisierende Enzym im Rahmen regulierbarer Effizienz zum jeweils aktivierten Promotor zu rekrutieren.

*Intrinsisches regulatorisches Potential (Kofaktoren (Adaptoren, Mediatoren) und RNA-Pol-II Holoenzym):*

Genau festgelegte Kombinationen spezifischer Transkriptionsfaktoren, die ihre reponsiven Elemente erkennen und bestimmte Promotoren spezifisch besetzen (siehe Komponente 3, Abschnitt 6.6.6), stellen nur eine erste Ebene im Rahmen differentieller Genregulation dar. Das große Ausmaß an Variabilität, dass sich aus der kombinatorischen Vielfalt spezifischer Faktoren ergibt, wird durch eine selektive Kooperation mit Kofaktoren nochmal erweitert.

Damit ein eukaryontisches Gen selektiv aktiviert werden kann, müssen spezifische Transkriptionsfaktoren kooperieren. Im Rahmen des Rekrutierungsmodells wird Kooperativität möglich, weil die einzelnen Aktivitäten auf das gleiche Ziel fixiert sind, eine effiziente Rekrutierung der RNA-Pol-II zu erreichen. In ihrer Funktion als molekulare Adaptoren gewährleisten eine große Gruppe von überwiegend konstitutiv exprimierten Kofaktoren diese Kooperativität sowie die Vermittlung synergistischer Effekte (Carey 1998). Damit wird ein Beitrag zu einer großen Auslenkbarkeit von Induktionsprozessen geliefert.

Bei der bisherigen Beschreibung unterschiedlicher Protein-Komponenten von Transkriptionskomplexen wurden vor allem die spezifischen Transkriptionsfaktoren als variable Parameter zur Erzeugung von Selektivität herausgestellt. Hierdurch zeichnet sich das Bild einer flexiblen Regulator-Komponente (in Form von DNA-gebundenen spezifischen Transkriptionsfaktoren) und einer uniformen Transkriptionsmaschinerie ab. Durch diese Sichtweise entsteht der Eindruck eines wenig flexiblen RNA-Pol-II-Komplexes.

Wie jedoch bei der Beschreibung der Kofaktoren deutlich wurde, werden in Zellen auch die großen RNA-Pol-II-Komplexe in dynamischer Weise formiert und vermutlich Kontextspezifisch umgruppiert. Diese Prozesse können das Potential, einzelne Gene selektiv zu regulieren zusätzlich erhöhen.

Differentielle Genregulation bedeutet nicht nur Gene selektiv aktivieren zu können. Zusätzlich muss die Stärke der Transkription genau reguliert sein. Es muss verhindert werden, dass Gene unangemessen aktiviert werden und in bestimmten Fällen muss über längere Zeit ein alternierendes Muster von Aktivität und Repression gewährleistet bleiben (vergleiche Abschnitt 6.5.2).

Ein Teil der hierfür erforderlichen Mechanismen wird von den Kofaktoren gesteuert. Kofaktoren integrieren einzelne Transaktivierungspotentiale und vermitteln somit auch synergistische Effekte. Das beste Beispiel für derartige Prozesse liefern die Untersuchungen

an Strukturen die als Enhanceosomen bezeichnet werden (Carey 1998). In diesen Komplexen kommt es zu einer physikalischen Assoziation von spezifischen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren. Erst ein adäquat formierter Gesamtkomplex gewährleistet die Integration von Aktivierungspotentialen einzelner Faktoren in synergistischer Weise. Dies führt zu einer maximalen Auslenkbarkeit der transkriptionellen Aktivität in positiver Richtung.

Im Rahmen konstituierter *In-vitro*-Systeme konnte gezeigt werden, dass auch die Kombination von Kofaktor-Komplexen zu einer Verstärkung des Transkriptionsniveaus führen kann (Chao et al. 1996).

In jedem der drei großen Kofaktor-Komplexe, TFIID, Mediator und der USA-Fraktion sind jeweils auch inhibierende Komponenten oder Subkomplexe identifiziert worden, die zum Teil hoch Gen-spezifisch Repression vermitteln (Bjorklund and Kim 1996; Kaiser and Meisterernst 1996; Holstege et al. 1998; Liu et al. 1998). Neben der Potenz solcher Kofaktoren, Gene in einem inaktiven Zustand zu halten, erweitern negative Kofaktoren die potentielle Auslenkbarkeit der transkriptionellen Antwort bzw. die Dynamik transkriptioneller Prozesse.

Viele Komponenten der USA-Fraktion haben die Aufgabe, im Rahmen der Transkriptionsinitiation, über die Induktion von Konformationsänderungen die Stärke essentieller physikalischer Interaktionen zu regulieren (Kaiser and Meisterernst 1996). Es scheint sich hierbei um ein System zu handeln, dem bei der Feinabstimmung der regulatorischen Prozesse eine wesentliche Rolle zukommt und das selbst wiederum Signal-abhängig regulierbar ist.

Zellen müssen in der Lage sein, unter veränderten Bedingungen mitunter einen sehr schnellen Wechsel der Expressionsmuster von Genen zu koordinieren. Durch mehrere Arbeiten konnte innerhalb der letzten Jahre ein Mechanismus aufgezeigt werden, der es dem Transkriptionsapparat ermöglicht, Gene schnell inaktivieren zu können. In Versuchen, in denen verschiedene Transaktivierungsdomänen von Transkriptionsfaktoren an funktionell heterologe DNA-Bindungsdomänen fusioniert worden sind, wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig die gleiche Beobachtung gemacht: Die Stärke der Transaktivierungsdomänen korrelierte mit der Instabilität des jeweiligen Faktors (Molinari et al. 1999; Salghetti et al. 1999). Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus wurde in einer Arbeit aus dem Jahre 2001 aufgedeckt (Chi et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass der Hefe-Transkriptionsfaktor GCN4 von der Srb10 Komponente des Mediator-Komplexes (also einer Kofaktor-Komponente) phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung initiiert einen Ubiquitin-

vermittelten Abbau des Transkriptionsfaktors. Die Ubiquitin-vermittelte Degradation läuft in allen bislang untersuchten Fällen nur genau dann ab, wenn die entsprechenden Transaktivierungsdomänen intakt sind, also genau dann, wenn RNA-Pol-II Holoenzym-Komplexe rekrutiert werden. Es scheint sich hierbei daher um einen Autoregulations-Mechanismus zu handeln, der gewährleistet, dass für ein dauerhaft hohes Transkriptionsniveau ständig spezifische Faktoren nachsynthetisiert werden müssen. Andererseits wird ein schnelles Abschalten von Genen durch den Abbau des aktivierenden und rekrutierenden Transkriptionsfaktors möglich (Thomas and Tyers 2000; Tansey 2001).

Kofaktoren stellen sich als feines Netzwerk von Molekülen dar, durch welche Selektivität, Stärke und Auslenkbarkeit von Transkriptionsprozessen in hohem Maße regulierbar gestaltet werden können. Gerade die Interaktionsoberflächen die einen effizienten Aufbau transkriptionskompetenter RNA-Pol-II-Komplexe gewährleisten, werden von den Kofaktoren bereitgestellt oder reguliert. Im Rahmen des Rekrutierungsmodells wird die Transkriptionseffizienz primär durch das Potential zur Rekrutierung des RNA-Pol-II-Enzyms bestimmt. Besonders die Feinregulation der limitierenden Schritte stellt sich unter diesem Gesichtspunkt als Wechselspiel positiver und negativer Kofaktor-Aktivitäten dar (Burley and Roeder 1998).

Obwohl immer noch viele Aspekte eukaryontischer Genregulation mit einem RNA-Pol-II Rekrutierungsmodell kompatibel sind, so zeigt sich bei der Beschreibung der nächsten „Dimension“ in Form der regulatorischen Mechanismen auf Chromatin-Ebene, dass für die physikalische Formation eines transkriptionskompetenten Initiationskomplexes im Chromatin-Kontext noch weitaus komplexere Mechanismen erforderlich sind, als sie ein einfaches Rekrutierungsmodell impliziert. Hierdurch entstehen aber andererseits noch vielschichtigere Regulationsmöglichkeiten.

### 6.6.8 Komponente 5: Chromatin und Kofaktoren im Chromatin-Kontext

Eukaryontische genomische DNA liegt im Zellkern nicht isoliert, sondern Protein-assoziiert als Chromatin vor. Die hauptsächlichen Protein-Komponenten sind die Core-Histone H2A, H2B, H3 und H4 das Linker-Histon H1 und verschiedene Gruppen von High-Mobility-Group- (HMG-) Proteinen (Kornberg and Lorch 1999; Thomas and Travers 2001). Die repetitive Einheit des Chromatins ist das Nukleosom. Das Nukleosom besteht aus einem Oktamer, das sich aus je zwei Molekülen der Core-Histone zusammensetzt. 146 Bp DNA sind

in zwei Windungen um den Histon-Kern (Nukleosomen-Core) „gewickelt“. Die in ihrer Länge leicht variablen DNA-Abschnitte zwischen den Nukleosomen (Linker-Regionen) werden von je einem Molekül H1 gebunden. Während der zentrale Teil des Core-Partikels eine hoch geordnete Struktur aufweist, zeigen jeweils 15-30 Aminosäuren der N-terminalen Enden aller vier Core-Histone in hochauflösenden Strukturanalysen einen wenig geordneten Aufbau und ragen in unterschiedlichen Orientierungen aus dem Core-Partikel heraus (Luger et al. 1997). Diese Regionen werden auch als Nukleosomen-Tails bezeichnet.

Die „Verpackung“ genomischer DNA in Chromatin hat einen generell inhibitorischen Einfluss auf Gentranskription. Am deutlichsten kann dieser Effekt in rekonstituierten *In-vitro* Transkriptionssystemen aufgezeigt werden: Werden aufgereinigte essentielle GTFs (TFIID, TFIIB, TFIIF, TFIIE, TFIIH), das RNA-Pol-II-Enzym und die zwei Kofaktoren TFIIA und PC4 mit nicht nukleosomal verpackter („nackter“) Promotor-DNA inkubiert, so kann ein bestimmtes „basales“ Transkriptionsniveau ermittelt werden. Wird die Template-DNA zuvor mit einem aus *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) isolierten Extrakt (S-190) und einem Überschuss an Histonen vorinkubiert, so bildet sich eine nukleosomale DNA-Struktur aus. In dieser Form wird die basale Transkription inhibiert und kann nicht oder vergleichbar schlecht durch spezifische Transkriptionsaktivatoren induziert werden.

Im Rahmen zweier Arbeiten aus dem Jahre 1998 konnte definiert werden, welche zusätzlichen Aktivitäten zu derartigen Ansätzen addiert werden müssen, um auch im Chromatin-Kontext den Ablauf von Transkriptionsprozessen gewährleisten zu können. Es handelt sich hierbei um die aus humanen Extrakten isolierten Komplexe RSF und FACT (LeRoy et al. 1998; Orphanides et al. 1998). Während der FACT-Komplex einen nukleosomal bedingten Elongationsblock aufzulösen vermag, gewährleistet eine Aktivität des RSF-Komplexes, dass in der nukleosomalen DNA Transkriptions-Initiation stattfinden kann, die sonst inhibiert wird. Der Aktivierungsprozess verläuft über eine Umstrukturierung des Chromatin-Templates und ist abhängig von der Zugabe eines DNA-bindenden Transkriptionsaktivators. Durch die Kooperativität des Aktivator-Proteins mit einer Enzym-Aktivität aus dem RSF-Komplex, einer ATP-abhängigen Helikase-Aktivität, wird parallel zur Transkriptions-Initiation (oder kurz davor) ein definierter Abschnitt der Promotor-DNA von Nukleosomen „freigeräumt“. Findet die Reaktion statt mit dem Aktivatorprotein nur mit dessen isolierter DNA-Bindungsdomäne (DBD) statt, wird zwar der Promotor umstrukturiert, es findet jedoch keine Transkriptions-Initiation statt.

Mittlerweile ist allgemein akzeptiert, dass Chromatin-bedingte Repression über einen entscheidenden Mechanismus vermittelt wird: Im Gegensatz zu freier DNA ist die „Zugänglichkeit“ nukleosomal verpackter DNA-Elemente für Transkriptionsfaktoren und für RNA-Pol-II-Komplexe in drastischer Weise eingeschränkt.

Im eukaryontischen Organismus haben sich zwei fundamentale, evolutionär konservierte Systeme entwickelt, durch die Transkription im Chromatin-Kontext gewährleistet bleibt und durch die zusätzlich ein enormes regulatorisch wirksames Potential entsteht: Das bereits beschriebene „Nukleosomen-Remodeling“ und die „Acetylierung der Core-Histon-Tails“.

#### 1) Nukleosomen-Remodeling:

Wie bereits beschrieben, ist es die Helikase-Aktivität, die im humanen RSF-Komplex das Nukleosomen-Remodeling vermittelt. Eine Vielzahl von Komplexen mit entsprechender Aktivität sind bereits identifiziert worden. Sehr gut charakterisiert sind die beiden aus der Hefe isolierten Remodeling-Komplexe SWI/SNF und der essentielle RSC-Komplex (Travers 1999). Die katalytische Untereinheit ist im Fall des SWI/SNF-Komplexes das Swi2/Snf2-Protein und im RSC-Komplex eine homologe Helikase. Beide Komplexe steigern *in-vitro* das DNA-Bindungspotential spezifischer Transkriptionsfaktoren in ATP-abhängigen Reaktionen. Dabei katalysieren die Helikasen Reaktionen, die zu einer Auflockerung der DNA-Histon-Kontakte und damit zu einer gesteigerten Mobilisierbarkeit der Nukleosomen führen (Bazett-Jones et al. 1999; Lorch et al. 1999; Travers 1999). Im Fall des SWI/SNF-Komplexes konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass ein Nukleosom auf einem DNA-Molekül „verschoben“ werden kann (Whitehouse et al. 1999). Für beide Komplexe wurde beschrieben, dass sie den Transfer eines intakten Nukleosoms auf ein separates DNA-Molekül katalysieren (Owen-Hughes and Workman 1996; Lorch et al. 1999). Neben diesen *in-vitro* Daten existieren zahlreiche Hinweise für die biologische Bedeutung dieser beiden Komplexe im Rahmen spezifischer Genregulation (Holstege et al. 1998; Biggar and Crabtree 1999; Sudarsanam et al. 1999).

Aus Fruchtfliegen-Embryos wurden mehrere Komplexe mit ähnlicher Aktivität isoliert: NURF, CHRAC und ACF (Pazin and Kadonaga 1997). In diesen Komplexen liegt jeweils die gleiche Helikase Untereinheit, ISWI (Imitation Switch), mit verschiedenen weiteren Proteinen komplexiert vor. Hieraus resultieren jeweils leicht unterschiedliche Aktivitäten. Allen drei Komplexen wiederum gemeinsam ist das generelle Potential, die Mobilisierbarkeit von Nukleosomen und die Zugänglichkeit von responsiven Elementen für spezifische Transkriptionsfaktoren erhöhen zu können (Varga-Weisz et al. 1995; Corona et al. 1999).

Die letzte große Gruppe von Faktoren mit Nukleosomen-Remodeling-Aktivität sind die CHD-Polypeptide. Auch diese Proteine weisen Helikase-Aktivität auf, aber zusätzlich beinhalten

diese Komplexe Histon-Deacetylase-Aktivität (siehe auch nächster Abschnitt). Die entsprechenden Komplexe scheinen vorwiegend Repression zu vermitteln (Tong et al. 1998; Zhang et al. 1998).

## 2) Acetylierung der Core-Histon-Tails:

Wie bereits im vorangehenden Abschnitt beschrieben, ist der allgemein reprimierende Einfluss des Chromatins auf eine Inhibierung der Interaktionen von Transkriptions-Komponenten mit der DNA zurückzuführen. Neben dem System des Nukleosomen-Remodeling hat sich ein zweiter Mechanismus entwickelt, durch den die Zugänglichkeit responsiver DNA-Elemente für DNA-bindende Faktoren reguliert werden kann:

Alle 4 Core-Histone können im Bereich ihrer N-terminalen Tail-Regionen posttranslational modifiziert werden. Die mittlerweile am besten charakterisierte Modifikation ist die Acetylierung konservierter Lysine. Diese Reaktion wird von sogenannten Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) katalysiert (Roth et al. 2001). In der Reaktion werden Acetyl-Gruppen vom Acetyl-CoA-Donor auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe der konservierten Lysine übertragen. Die jeweilige Rückreaktion wird innerhalb von Zellen von Histon-Deacetylase (HDACs) ausgeführt.

HATs werden in zwei Gruppen eingeteilt: Die cytoplasmatischen B-Typ-HATs acetylieren neu synthetisierte Histone in charakteristischer Weise und markieren die Proteine dadurch als Substrate für die Neuf ormation von Nukleosomen im Zuge der DNA-Replikation (Verreault 2000). Die zweite Gruppe von HATs, die A-Typ-HATs, sind kernständig und im Rahmen ihrer Funktion als „Kofaktoren im Chromatin-Kontext“ zusammen mit den HDs direkt an der Transkriptionsregulation von Genen in nukleosomal-verpackter DNA beteiligt.

Eine Fülle von Daten, die hauptsächlich innerhalb der letzten 10 Jahre entstanden sind, implizieren einen engen Zusammenhang von Histon-Acetylierung, Zugänglichkeit von Promotor-Elementen und differentieller Genregulation in eukaryontischen Lebewesen:

Histon-Acetylierung verringert die Affinität von Histon-Tails zur DNA, verändert die nukleosomale Konformation und führt *in-vitro* zu einer verbesserten Zugänglichkeit von Promotor-DNA-Abschnitten für Transkriptionsregulatoren (Norton et al. 1989; Hong et al. 1993; Lee et al. 1993; Vettese-Dadey et al. 1996).

Bei Untersuchungen zur Funktion von identifizierten A-Typ-HATs konnte 1998 zum ersten Mal gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität der HATs direkten Einfluss auf die

Regulation von Genen *in-vivo* ausübt (Kuo et al. 1998; Martinez-Balbas et al. 1998; Wang et al. 1998). Eine Stimulation der Transkription und eine verstärkte Histon-Acetylierung im Promotorbereich wurden genau dann beobachtet, wenn katalytisch aktive, exogene HATs in Zellen eingebracht wurden. Mutanten ohne HAT-Aktivität zeigten in den gleichen Versuchen weder eine Beeinflussung des lokalen Acetylierungsniveaus, noch wurde die Transkription der untersuchten Gene stimuliert.

Eine große Anzahl verschiedener A-Typ-HATs konnten mittlerweile identifiziert werden (Roth et al. 2001). Die Enzyme liegen in der Regel gebunden innerhalb größerer Proteinkomplexe vor. Obwohl für die Mehrzahl dieser Komplexe eine Funktion bei der Stimulation der Gentranskription aufgezeigt werden konnte, beeinflussen HATs auch andere zelluläre Prozesse wie z. B. RNA-Elongation und DNA-Replikation (Roth et al. 2001) und spielen vermutlich eine Rolle bei der Erkennung UV-geschädigter DNA (Brand et al. 2001).

Am besten charakterisiert sind mittlerweile die HAT-Komplexe, die als katalytische Untereinheit das erstmals in der Bäckerhefe aufgereinigte GCN5 oder das stark homologe (aber nicht orthologe) Protein PCAF, das nur in Säugetieren vorkommt, enthalten. Hierzu gehören die Komplexe ADA und SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) aus der Bäckerhefe (Grant et al. 1998b), sowie der humane PCAF-Komplex (Ogryzko et al. 1998). Funktionell und hinsichtlich einzelner Proteinbestandteile weniger gut charakterisiert ist der humane STAGA-Komplex (Martinez et al. 1998).

Vor allem durch Untersuchungen an Temperatur-sensitiven Mutanten der Bäckerhefe hat sich ergeben, dass HAT-Komplexe funktionell in verschiedene Subkomplexe unterteilt werden können (Grant et al. 1998b; Sterner et al. 1999). Diese Subkomplexe erfüllen jeweils Teilaufgaben: Die HAT-Komplexe müssen zu den jeweiligen Promotoren rekrutiert werden. Aus diesem Grund existieren Interaktionsoberflächen, die mit spezifischen Transkriptionsfaktoren physikalisch interagieren. Für die HAT-Komplexe SAGA und ADA definieren die Proteine Ada2, Ada3 und Gcn5 einen entsprechenden funktionellen Subkomplex. Andere Teile der HAT-Komplexe vermitteln den Kontakt zum basalen Transkriptionskomplex. Innerhalb des SAGA-Komplexes scheinen hierfür die Proteine Spt3 und Spt8 verantwortlich zu sein, da sie physikalisch und funktionell mit TBP interagieren. Ein weiterer funktioneller Subkomplex ist für die Acetylierung nukleosomaler Histone erforderlich, da die isolierten HATs nur freie Histone und nicht Histone im chromosomalen Kontext acetylieren können.



Maßgeblich für diese Eigenschaft sind vermutlich die Untereinheiten Ada2 und Ada3, welche in allen der beschriebenen GCN5-HAT-Komplexe, sowie in dem kürzlich identifizierten A2-Komplex vorkommen (Sendra et al. 2000).

Eine Gemeinsamkeit der meisten HAT-Komplexe ist das Vorkommen einer bestimmten Gruppe von TAFs die sogenannte Histon-Faltungsmotive aufweisen (Grant et al. 1998a; Ogryzko et al. 1998). Wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 6.6.5) sind TAFs auch integrale Bestandteile des TFIID-Komplexes. Interessanterweise weist auch der TFIID-Komplex mit hTAF<sub>II</sub>250 eine HAT-Untereinheit auf (Mizzen et al. 1996). Diese HAT ist für die selektive Aktivierung ganz bestimmter Gengruppen erforderlich (Holstege et al. 1998; Weissman et al. 1998).

Da die erwähnten TAFs mit Histon-Faltungsmotiv innerhalb von TFIID oder den anderen HAT-Komplexen stöchiometrisch und physikalisch Nukleosomen-ähnlich zusammengesetzt sind (Burley and Roeder 1996), besagt eine Hypothese, dass dieser Subkomplex mit Nukleosomen um Promotor-DNA kompetitiert (Ogryzko et al. 1998). Da die Nukleosomen-ähnlichen Subkomplexe keine den Histon-Tails homologen Abschnitte beinhalten, könnten diese Strukturen als konstitutiv aktivierende Komponenten wirken. Möglicherweise handelt es sich bei dem Nukleosomen-ähnlichen Aufbau auch ausschließlich um eine universelle Strukturkomponente.

Auch die bereits beschriebenen Koaktivatorproteine CBP/p300 (siehe Abschnitt 6.6.7) weisen HAT-Aktivität auf. Ein gut fundiertes Modell ihrer Funktionsweise dokumentiert, wie über einen prototypischen Mechanismus die Histon-Acetylierung zu spezifischer Genregulation beiträgt: Durch die große Anzahl von spezifischen Transkriptionsfaktoren, die physikalisch mit CBP/p300 interagieren können (Goodman and Smolik 2000), können diese Adaptoren Kontext- und Gen-spezifisch zu Promotoren rekrutiert werden. Im Bereich der Promotor-DNA werden Nukleosomen durch CBP/p300 acetyliert (Chen et al. 1999b). Sowohl die physikalische Assoziation mit dem Promotor, als auch die Erhöhung des Acetylierungsniveaus sind in diesem Fall transiente Prozesse (Chen et al. 1999b; Shang et al. 2000). Ein acetylierter Core-Promotorbereich ist Voraussetzung für die Ausbildung eines Präinitiationskomplexes aus generellen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Pol II, da die Zugänglichkeit des Promotors durch die Acetylierung steigt. Es gibt Hinweise, dass innerhalb derartiger Abläufe auch andere Substrate durch CBP/p300 acetyliert werden können. In einer Arbeit weisen Daten darauf hin, dass die Acetylierung einer korekrutierten Acetylase durch CBP/p300 wichtig für die Destabilisierung des Aktivierungskomplexes und damit für das Abschalten des Aktivierungsvorgangs ist (Chen et al. 1999b). In dem zitierten Beispiel

handelt es sich bei der korekrutierten Acetylase um ACTR, ein Mitglied der p160-Familie von Koaktivatoren, die alle intrinsische HAT-Aktivität aufweisen. Wie auch in dem beschriebenen Fall spielen diese Koaktivatoren eine Rolle bei der Regulation von Hormonrezeptor-abhängigen Genen. Im Gegensatz zur enzymatischen Aktivität von CBP/p300 ist die Funktion der jeweiligen HAT-Aktivitäten der p160-Koaktivatoren jedoch weniger genau bekannt.

Die zitierten Ergebnisse und eine Vielzahl zusätzlicher Arbeiten der (19)90-er Jahre implizieren den Eindruck eines generell positiven Zusammenhangs zwischen einem erhöhten Acetylierungsgrad und transkriptioneller Aktivität. Neuere Untersuchungen belegen in einzelnen Fällen jedoch auch Ausnahmen von dieser Regel, in Form einer Verbindung von Transkription mit Histon-Deacetylierung (Deckert and Struhl 2001; Sheldon et al. 2001). Diese Ausnahmen stellen sich meist Promotor-spezifisch dar. Darüber hinaus wird zunehmend deutlicher, dass ein hoher Acetylierungsgrad in Promotor-Bereichen in vielen Fällen nicht direkt mit dem Ausmaß an Gentranskription korreliert, sondern primär einen Zustand voraktivierten Chromatins darstellt, welches einen potentiell aktivierbaren Promotor beinhaltet. Dieser Zusammenhang wird im Englischen auch als „Potentiation of Chromatin“ oder „Priming“ bezeichnet (O'Neill and Turner 1995; Ford et al. 1996; Kramer et al. 1998; Francastel et al. 2000) (und siehe unten).

Wie bereits beschrieben, sind für die jeweiligen Rückreaktionen, den Deacetylierungsvorgängen an den Histonen, die HDACs verantwortlich. In Säugetierzellen werden die HDACs in zwei Familien unterteilt. Je nachdem zu welcher der zwei HDACs aus der Bäckerhefe, Rpd3 oder Hda1 die größere Homologie besteht, werden die Mitglieder der zwei Gruppen als Klasse 1- oder Klasse 2-HDACs bezeichnet (Knoepfler and Eisenman 1999). Kürzlich wurde mit HDAC-9 die vorläufig neuste Deacetylase (eine Klasse 2-HDAC) isoliert (Zhou et al. 2001).

Auch die HDACs liegen in Zellen in größeren Proteinkomplexen vor. Dies konnte zumindest für die beiden Klasse 1-Mitglieder HDAC-1 und HDAC-2 gezeigt werden. Zwei gut charakterisierte HDAC-Komplexe sind der Sin3-Komplex und der Mi-2- bzw. NuRD-Komplex (Tong et al. 1998; Xue et al. 1998). In beiden Fällen wurden jeweils sowohl HDAC-1 als auch HDAC-2 identifiziert und beide Komplexe vermitteln Genrepression. Zusammen mit den Proteinen RbAP46 und -48 bilden die HDAC-Enzyme einen sogenannten „enzymatischen Kernkomplex“, der die Deacetylase-Aktivität im Falle beider Komplexe beinhaltet (Knoepfler and Eisenman 1999). Im Sin3-Komplex liegt dieser Kern mit den Proteinen Sin3A bzw. Sin3B, sowie zusätzlich den Proteinen SAP18 und SAP30 assoziiert

vor. Bei Sin3 handelt es sich um molekulare Adapterproteine, für die Interaktionen mit einer Reihe verschiedener Transkriptionsfaktoren bzw. –Repressoren beschrieben wurden. In Analogie zur Situation bei den HAT-Komplexen, scheinen HDAC-Komplexe dieser Gruppe über die DNA-bindenden Faktoren zu den jeweiligen Zielpromotoren rekrutiert zu werden. In diesem Fall wird das Histon-Acetylierungsniveau durch Deacetylierung von Histonen lokal gesenkt, um Genaktivität zu inhibieren. Ein solcher Mechanismus konnte in einer Arbeit zur Genregulation in der Bäckerhefe beschrieben werden. Zusätzlich wurde hier eine Kartierung des deacetylierten Bereiches durchgeführt. Die ermittelte Region erstreckt sich über ca. 500 Bp Promotor-DNA (Kadosh and Struhl 1998).

Wird die physikalische Interaktion zwischen Sin3 und den HDACs durch entsprechende Manipulationen verhindert, so verliert der Sin3-Komplex seine repressorische Aktivität fast vollständig (Knoepfler and Eisenman 1999). Dies bestätigt die entscheidende Funktion der Deacetylase-Aktivität bei der Genrepression. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass neben lokal eng umgrenzten Regionen (z.B. in Core-Promotorbereichen) auch sehr viel größere Bereiche ständig globalen Acetylierungs- und Deacetylierungsprozessen unterworfen werden (Vogelauer et al. 2000).

Der Mi-2/NuRD-Komplex beinhaltet neben der Deacetylase-Aktivität zusätzlich Nukleosomen-Remodeling-Aktivität. Die Proteinkomponente Mi-2 $\beta$  weist die zugrundeliegende Helikase/ATP-ase-Aktivität auf. Außerdem ist im Komplex mit MDB-3 ein Protein enthalten, welches spezifisch methylierte CpG DNA-Sequenzen erkennt und bindet (Bird and Wolffe 1999). Die Methylierung von CpG-reichen DNA-Abschnitten stellt einen Mechanismus dar, über den DNA-Bereiche transkriptionell inaktiviert werden können ( im Englischen: „Silencing“). Die Rekrutierung von Mi-2/NuRD oder eines verwandten Komplexes über ein MDB-Protein stellt den zugrundeliegenden Mechanismus dar, durch den die spezifische Genrepression in diesen Fällen vermittelt wird.

Acetylierungs- und Deacetylierungsvorgänge von Chromatin-Komponenten stellen sich als antagonistische Mechanismen zur Regulierung eukaryontischer Gene dar. Die verantwortlichen Enzyme, sowie die durch sie ausgelösten strukturellen Veränderungen an Promotoren dürfen jedoch nicht isoliert betrachtet werden. Ihre Wirkungsweise kann nur im Kontext des gesamten Genregulationsvorgangs verstanden werden. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass ein hohes Acetylierungsniveau in Promotorregionen noch nicht notwendigerweise aktive Gentranskription impliziert. Vielmehr scheinen Acetylierungsprozesse in Promotorbereichen in vielen Fällen nur einen notwendigen

Teilschritt auf dem Weg zur vollen Geninduktion darzustellen. Entsprechend etablierte Modelle beschreiben daher einen Zwei-Stufen-Prozess der Genaktivierung: Einem als „Derepression“ bezeichneten Schritt, in dem das Chromatin im Promotorbereich aus einem hoch kondensierten und deacetylierten Zustand in einen Zustand verstärkter nukleosomaler Acetylierung und daher verbesserter Zugänglichkeit übergeht, folgt ein auch als „Echte Aktivierung“ bezeichneter Prozess. Erst im Rahmen dieses zweiten Vorgangs wird es vielen Faktoren und dem RNA-Pol-II-Komplex möglich, physikalisch mit der DNA im Promotorbereich zu interagieren und schlussendlich mRNA-Synthese zu gewährleisten.

Der Zeitrahmen, in dem die zwei beschriebenen Stufen aufeinander folgen, kann beträchtlich variieren. In einer Vielzahl dokumentierter Regulationsabläufe erfolgen Histon-Acetylierung und Transkriptionsinitiation fast simultan (Chen et al. 1999b; Parekh and Maniatis 1999; Shang et al. 2000). Dem gegenüber steht die Aktivierung von Genen im Rahmen zellulärer Differenzierungsprozesse (O'Neill and Turner 1995; Kramer et al. 1998; Schubeler et al. 2000). In diesen Fällen können über Zeitspannen, die viele Zellgenerationen umfassen, Gene in einem voraktivierten Zustand gehalten werden. Dieser Zustand ist durch ein erhöhtes Acetylierungsniveau und parallel durch eine erhöhte Nuklease-Empfindlichkeit im Bereich von Promotoren (DNase-I hypersensitive Regionen) gekennzeichnet. Erst wenn zusätzlich die entsprechend benötigten Transkriptionsfaktoren gebildet werden bzw. im Zellkern verfügbar sind und/oder Signal-abhängig adäquat modifiziert worden sind, wird in diesen Fällen die Gentranskription initiiert.

Beim beschriebenen Zwei-Stufen-Modell der Genaktivierung stellt sich die Frage, durch welchen Mechanismus initial eine lokale Aktivierung des kondensierten Chromatins (also der erste Schritt) erfolgen kann, solange die Zugänglichkeit für DNA-bindende Regulatoren noch deutlich vermindert ist. In vielen beschriebenen Fällen besteht die Lösung dieses Problems in der Aufrechterhaltung kurzer Abschnitte gut zugänglichen Chromatins. Dies können DNA-Bindungsstellen innerhalb von Linker-Regionen oder größere konstitutiv Nukleosomen-freie Gebiete sein (Gaudreau et al. 1997; Agalioti et al. 2000). Diese Bereiche gewährleisten, dass Transkriptionsfaktoren in einem frühen Stadium des Aktivierungsprozesses mit der DNA wechselwirken können, um einen komplexen zeitlich geordneten Ablauf des Genregulationsprozesses initial auszulösen. Im folgenden Prozess können Nukleosomen-Remodeling und HAT-Aktivitäten schrittweise zum Promotor rekrutiert werden, um das Chromatin im Core-Promotorbereich so zu modifizieren, dass RNA-Pol-II-Komplexe am Promotor etabliert werden können (Cosma et al. 1999; Agalioti et al. 2000).

*Intrinsisches regulatorisches Potential (Chromatin und Kofaktoren im Chromatin-Kontext):*

In den Abschnitten 6.5.1 und 6.5.2 ist beschrieben worden, wie komplex die Anforderungen an das steuernde Genregulationssystem im eukaryontischen Organismus sind. Im Vergleich zu den Prokaryonten müssen die Mechanismen der Genregulation bei höheren Eukaryonten zwei entscheidenden zusätzlichen Anforderungen gerecht werden: 1) Im Vielzeller kommt es zu umfangreichen Spezialisierungen einzelner Zell- und Gewebeverbände, daher müssen in unterschiedlichen Körperzellen trotz identischer DNA-Sequenz viele Gene jeweils unterschiedlich reguliert werden können und 2) im Vielzeller hat die Gesamtkonstitution des Organismus höchste Priorität über Einzelzellschicksale. Aus diesen Gründen ist im eukaryontischen Vielzeller ein erhöhtes Ausmaß regulatorisch wirksamer Mechanismen erforderlich. Diese Prozesse müssen exakt koordiniert werden. Es kommt an jedem einzelnen Promotor, in jeder Zelle und zu jedem Zeitpunkt darauf an, dass sich die regulatorisch wirksamen Komponenten auf eine Weise formatieren, die genau die adäquate transkriptionelle Aktivität hervorbringt. Zusätzlich muss ein erhebliches Maß an Flexibilität gewährleistet sein, wenn aufgrund spontan veränderter äußerer Umstände plötzliche Veränderungen der Genaktivitäten erforderlich werden.

Das bisher beschriebene Bild der Genregulation im Eukaryonten kann auf folgende Weise schematisiert wiedergegeben werden: Für die spezifische Regulation eines Gens müssen die essentiellen Einzelkomponenten (Proteine) vorhanden sein, adäquat posttranslational modifiziert worden sein, zum richtigen Zeitpunkt zum Promotor rekrutiert werden, um durch enzymatische Aktivität oder die Gewährleistung physikalischer Interaktionen kooperativ zur Steuerung der Genaktivität beizutragen.

In den vorangehenden Abschnitten sind bereits Beispiele dafür beschrieben worden, dass Signaltransduktionswege Teilschritte dieses allgemeinen Ablaufs beeinflussen bzw. steuern können. Die weitaus umfangreichste Steuerungsmöglichkeit ergibt sich jedoch direkt am Genpromotor, genauer an der Chromatinstruktur im Promotorbereich. Durch das intrinsische Potential des Chromatins, variable Zugänglichkeit zu DNA-Abschnitten vermitteln zu können, bleibt die Etablierung eines transkriptionskompetenten RNA-Pol-II-Komplexes an jeder Stelle, an der Einzelkomponenten notwendigerweise mit Promotor-DNA interagieren müssen, regulierbar.

Für kein anderes Protein sind in einer Region vergleichbarer Größe (ca. 30 Aminosäuren) so viele unterschiedliche posttranslationale Modifikationsmöglichkeiten beschrieben worden, wie für den Bereich der N-terminalen Histon-Tails. Neben der bereits ausführlich beschriebenen Acetylierung, wurden Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinierung und

ADP-Ribosylierung dokumentiert. Es beginnt sich abzuzeichnen, dass neben den Acetylierungsvorgängen auch andere dieser kovalenten Modifikationen direkt an der Genregulation beteiligt sind (Strahl and Allis 2000). Beispielsweise korreliert die spezifische Phosphorylierung des Serins 10 am Histon H3 direkt mit der Aktivierung der sogenannten „immediate-early Gene c-Jun und c-Fos sowie des c-Myc Gens durch mitogene Stimuli. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass verschiedene HATs das Histon H3 mit erhöhter Effizienz acetylieren, wenn H3 am Serin 10 phosphoryliert ist und das beide Prozesse bei der Regulation spezifischer Zielgene *in-vivo* funktionell eng gekoppelt sind (Cheung et al. 2000; Lo et al. 2000).

Auf der Grundlage umfangreicher Daten wurde ein entgegengesetzt gerichteter Prozess postuliert, der zu einer transkriptionellen Repression durch Chromatinkondensation führt, aber ebenfalls am Histon-Tail von H3 initiiert wird (Rea et al. 2000; Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001): Die dem Serin 10 in H3 unmittelbar benachbarte Aminosäure Lysin 9 kann durch das Enzym SUV39H1 methyliert werden. Diese spezifische Modifikation ermöglicht dem Protein HP-1 (Heterochromatin Protein 1) die physikalische Interaktion mit H3. Innerhalb dieser Bereiche wird Chromatin-Kondensation induziert und damit Genrepression vermittelt. Möglicherweise führt eine Art Kettenreaktion entlang des Chromatins zu einer Ausbreitung konstitutiv reprimierter Chromatinabschnitte (Heterochromatin).

Durch die Methylierung an Arginin-Resten von H3 können komplett entgegengesetzte biologische Effekte hervorgerufen werden: Im Fall des Koaktivators CARM1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase-1) wirkt sich die Methylierung von H3 stimulatorisch aus. Der Verlust der entsprechenden enzymatischen Aktivität führt zu einer signifikanten Verringerung der stimulatorischen Aktivität von CARM1 (Chen et al. 1999a).

Zahlreiche Publikationen der letzten drei bis vier Jahre liefern weitere Beispiele für die entscheidende Funktion der posttranslationalen Modifikationen der Histon-Tails für die Transkriptionsregulation und dessen Steuerung durch aktivierte Signalwege. Die Histon-Tail-Regionen stellen sich als Adapter für unterschiedliche Signalwege dar, und werden in eng benachbarten Regionen Kontext-spezifisch modifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass einige dieser Prozesse unmittelbare Voraussetzung für Folgeprozesse darstellen und dass sich verschiedene andere Modifikationen gegenseitig ausschließen.

Unter Verweis auf den im Jahre 2000 erstmals eingeführten Begriff „Histon-Code“ (Strahl and Allis 2000) kann abschließend noch einmal die Bedeutung des Chromatins als fundamentale Komponente eukaryontischer Genregulation herausgestellt werden: Neben dem

Vorhandensein und dem adäquaten Zustand transkriptioneller Regulatoren müssen diese Einzelkomponenten in einem zeitlich und funktionell hoch geordneten Ablauf schrittweise zum Zielpromotor gelangen. Genau die Bildung der dann erforderlichen physikalischen Kontakte wird signalabhängig über die Chromatinstruktur und mittelbar über den akuten posttranslationellen Status der Histone reguliert.

Die Autoren verwenden den Begriff, um zu verdeutlichen, dass bestimmte Kombinationen entsprechender Histon-Modifikationen ganz genau definierte biologische Programme (z.B. Genaktivierung oder –Inaktivierung) einleiten. Vor diesem Hintergrund sind nicht einzelne Modifikationen aussagekräftig, sondern das Veränderungsmuster im Ganzen, das wie eine Art Code durch spezifisch bindende Faktoren“entziffert“ werden kann.

Das Steuerungssystem der eukaryontischen Zelle muss unter wechselnden Umständen an Tausenden von Genloci ständig adäquate Expressionsprofile hervorrufen, damit die Zelle und vor allem der Gesamtorganismus überlebensfähig bleibt.

Aus einem etwas veränderten Blickwinkel kann das Chromatin als eine Art Verrechnungsinstanz angesehen werden. Ähnlich einer Nervenzelle im Bereich synaptischer Verschaltungen besteht die Hauptfunktion des Chromatins in der Festlegung einer resultierenden biologischen Aktivität aus unterschiedlichen und zum Teil entgegengesetzt gerichteten Einzelpotentialen.

Im Fall der Genregulation muss aus der Summe der positiven und negativen Faktoren und den jeweils aktivierten Signalwegen (bzw. deren Auswirkungen auf Faktoren und Chromatinstruktur) ein adäquater Aktivierungsgrad der jeweiligen Gene „eingestellt“ werden. Aufgrund der beschriebenen vielfältigen Akzeptorstellen für Signalwege im Bereich der Histon-Tails und dem daraus resultierenden Potential, die DNA-Zugänglichkeit in weitem Umfang regulieren zu können, eignet sich das Chromatin hierfür in ausgezeichneter Weise.

Zustand und Schicksal der Einzelzelle sind davon abhängig, dass an Tausenden von Genloci ständig optimale Aktivitätsmuster eingestellt werden. Das hoch komplexe zuständige Steuerungssystem kann als eine Art „Gehirn der Zelle“ angesehen werden, das sowohl den physiologischen Zustand der Zelle als auch die unmittelbaren Umwelteinflüsse registriert und entsprechende „Antworten“ in Form genomweiter Expressionsprofile koordiniert.

## 6.7 Literaturverzeichnis

- Agalioti, T., S. Lomvardas, B. Parekh, J. Yie, T. Maniatis, and D. Thanos. 2000. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* **103**: 667-78.
- Amati, B., K. Alevizopoulos, and J. Vlach. 1998. Myc and the cell cycle. *Front Biosci* **3**: D250-68.
- Amati, B., S.R. Frank, D. Donjerkovic, and S. Taubert. 2001. Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta* **1471**: M135-45.
- Askew, D.S., J.N. Ihle, and J.L. Cleveland. 1993. Activation of apoptosis associated with enforced myc expression in myeloid progenitor cells is dominant to the suppression of apoptosis by interleukin-3 or erythropoietin. *Blood* **82**: 2079-87.
- Ayer, D.E. and R.N. Eisenman. 1993. A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev* **7**: 2110-9.
- Ayer, D.E., L. Kretzner, and R.N. Eisenman. 1993. Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* **72**: 211-22.
- Bannister, A.J., P. Zegerman, J.F. Partridge, E.A. Miska, J.O. Thomas, R.C. Allshire, and T. Kouzarides. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**: 120-4.
- Bazett-Jones, D.P., J. Cote, C.C. Landel, C.L. Peterson, and J.L. Workman. 1999. The SWI/SNF complex creates loop domains in DNA and polynucleosome arrays and can disrupt DNA-histone contacts within these domains. *Mol Cell Biol* **19**: 1470-8.
- Biggar, S.R. and G.R. Crabtree. 1999. Continuous and widespread roles for the Swi-Snf complex in transcription. *Embo J* **18**: 2254-64.
- Billin, A.N., A.L. Eilers, C. Queva, and D.E. Ayer. 1999. Mlx, a novel Max-like BHLHZip protein that interacts with the Max network of transcription factors. *J Biol Chem* **274**: 36344-50.
- Bird, A.P. and A.P. Wolffe. 1999. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**: 451-4.
- Bjorklund, S. and Y.J. Kim. 1996. Mediator of transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* **21**: 335-7.
- Bouchard, C., O. Dittrich, A. Kiermaier, K. Dohmann, A. Menkel, M. Eilers, and B. Luscher. 2001. Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* **15**: 2042-7.
- Bouchard, C., P. Staller, and M. Eilers. 1998. Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol* **8**: 202-6.
- Bouchard, C., K. Thieke, A. Maier, R. Saffrich, J. Hanley-Hyde, W. Ansorge, S. Reed, P. Sicinski, J. Bartek, and M. Eilers. 1999. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* **18**: 5321-33.
- Boyd, K.E., J. Wells, J. Gutman, S.M. Bartley, and P.J. Farnham. 1998. c-Myc target gene specificity is determined by a post-DNA-binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13887-92.
- Brand, M., J.G. Moggs, M. Oulad-Abdelghani, F. Lejeune, F.J. Dilworth, J. Stevenin, G. Almouzni, and L. Tora. 2001. UV-damaged DNA-binding protein in the TFIIIC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. *Embo J* **20**: 3187-96.



- Brand, M., K. Yamamoto, A. Staub, and L. Tora. 1999. Identification of TATA-binding protein-free TAFII-containing complex subunits suggests a role in nucleosome acetylation and signal transduction. *J Biol Chem* **274**: 18285-9.
- Brooks, A.R., D. Shiffman, C.S. Chan, E.E. Brooks, and P.G. Milner. 1996. Functional analysis of the human cyclin D2 and cyclin D3 promoters. *J Biol Chem* **271**: 9090-9.
- Brou, C., S. Chaudhary, I. Davidson, Y. Lutz, J. Wu, J.M. Egly, L. Tora, and P. Chambon. 1993. Distinct TFIID complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *Embo J* **12**: 489-99.
- Buratowski, S. 1994. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* **77**: 1-3.
- Buratowski, S., S. Hahn, L. Guarente, and P.A. Sharp. 1989. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* **56**: 549-61.
- Burley, S.K. and R.G. Roeder. 1996. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* **65**: 769-99.
- Burley, S.K. and R.G. Roeder. 1998. TATA box mimicry by TFIID: autoinhibition of pol II transcription. *Cell* **94**: 551-3.
- Cairo, S., G. Merla, F. Urbinati, A. Ballabio, and A. Reymond. 2001. WBSCR14, a gene mapping to the Williams--Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network. *Hum Mol Genet* **10**: 617-27.
- Carey, M. 1998. The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* **92**: 5-8.
- Chao, D.M., E.L. Gadbois, P.J. Murray, S.F. Anderson, M.S. Sonu, J.D. Parvin, and R.A. Young. 1996. A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* **380**: 82-5.
- Chen, D., H. Ma, H. Hong, S.S. Koh, S.M. Huang, B.T. Schurter, D.W. Aswad, and M.R. Stallcup. 1999a. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* **284**: 2174-7.
- Chen, H., R.J. Lin, W. Xie, D. Wilpitz, and R.M. Evans. 1999b. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**: 675-86.
- Cheng, T., H. Shen, D. Giokas, J. Gere, D.G. Tenen, and D.T. Scadden. 1996. Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13158-63.
- Cheung, P., K.G. Tanner, W.L. Cheung, P. Sassone-Corsi, J.M. Denu, and C.D. Allis. 2000. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* **5**: 905-15.
- Chi, Y., M.J. Huddleston, X. Zhang, R.A. Young, R.S. Annan, S.A. Carr, and R.J. Deshaies. 2001. Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev* **15**: 1078-92.
- Cho, H., G. Orphanides, X. Sun, X.J. Yang, V. Ogryzko, E. Lees, Y. Nakatani, and D. Reinberg. 1998. A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol* **18**: 5355-63.
- Colgan, J. and J.L. Manley. 1992. TFIID can be rate limiting in vivo for TATA-containing, but not TATA- lacking, RNA polymerase II promoters. *Genes Dev* **6**: 304-15.
- Corona, D.F., G. Langst, C.R. Clapier, E.J. Bonte, S. Ferrari, J.W. Tamkun, and P.B. Becker. 1999. ISWI is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Mol Cell* **3**: 239-45.
- Cosma, M.P., T. Tanaka, and K. Nasmyth. 1999. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* **97**: 299-311.
- Deckert, J. and K. Struhl. 2001. Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol Cell Biol* **21**: 2726-35.

- Dey, A., H. She, L. Kim, A. Boruch, D.L. Guris, K. Carlberg, S.M. Sebti, D.T. Woodley, A. Imamoto, and W. Li. 2000. Colony-stimulating factor-1 receptor utilizes multiple signaling pathways to induce cyclin D2 expression. *Mol Biol Cell* **11**: 3835-48.
- Dikstein, R., S. Zhou, and R. Tjian. 1996. Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130. *Cell* **87**: 137-46.
- Eichbaum, Q.G., R. Iyer, D.P. Raveh, C. Mathieu, and R.A. Ezekowitz. 1994. Restriction of interferon gamma responsiveness and basal expression of the myeloid human Fc gamma R1b gene is mediated by a functional PU.1 site and a transcription initiator consensus. *J Exp Med* **179**: 1985-96.
- Eisenman, R.N. 2001. Deconstructing myc. *Genes Dev* **15**: 2023-30.
- Ford, A.M., C.A. Bennett, L.E. Healy, M. Towatari, M.F. Greaves, and T. Enver. 1996. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10838-43.
- Francastel, C., D. Schubeler, D.I. Martin, and M. Groudine. 2000. Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 137-43.
- Frank, S.R., M. Schroeder, P. Fernandez, S. Taubert, and B. Amati. 2001. Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev* **15**: 2069-82.
- Garraway, I.P., K. Semple, and S.T. Smale. 1996. Transcription of the lymphocyte-specific terminal deoxynucleotidyltransferase gene requires a specific core promoter structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4336-41.
- Gaudreau, L., A. Schmid, D. Blaschke, M. Ptashne, and W. Horz. 1997. RNA polymerase II holoenzyme recruitment is sufficient to remodel chromatin at the yeast PHO5 promoter. *Cell* **89**: 55-62.
- Gehring, S., S. Rottmann, A.R. Menkel, J. Mertsching, A. Krippner-Heidenreich, and B. Luscher. 2000. Inhibition of proliferation and apoptosis by the transcriptional repressor Mad1. Repression of Fas-induced caspase-8 activation. *J Biol Chem* **275**: 10413-20.
- Glimcher, L.H. and H. Singh. 1999. Transcription factors in lymphocyte development--T and B cells get together. *Cell* **96**: 13-23.
- Goodman, R.H. and S. Smolik. 2000. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* **14**: 1553-77.
- Grandori, C., S.M. Cowley, L.P. James, and R.N. Eisenman. 2000. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 653-99.
- Grant, P.A., D. Schieltz, M.G. Pray-Grant, D.J. Steger, J.C. Reese, J.R. Yates, 3rd, and J.L. Workman. 1998a. A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* **94**: 45-53.
- Grant, P.A., D.E. Sterner, L.J. Duggan, J.L. Workman, and S.L. Berger. 1998b. The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin- modifying complexes. *Trends Cell Biol* **8**: 193-7.
- Gu, W. and R.G. Roeder. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**: 595-606.
- Hansen, S.K., S. Takada, R.H. Jacobson, J.T. Lis, and R. Tjian. 1997. Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF. *Cell* **91**: 71-83.
- Harbour, J.W. and D.C. Dean. 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**: 2393-409.
- Henriksson, M. and B. Luscher. 1996. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* **68**: 109-82.

- Hirose, Y. and J.L. Manley. 2000. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* **14**: 1415-29.
- Holstege, F.C., U. Fiedler, and H.T. Timmers. 1997. Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *Embo J* **16**: 7468-80.
- Holstege, F.C., E.G. Jennings, J.J. Wyrick, T.I. Lee, C.J. Hengartner, M.R. Green, T.R. Golub, E.S. Lander, and R.A. Young. 1998. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**: 717-28.
- Hong, L., G.P. Schroth, H.R. Matthews, P. Yau, and E.M. Bradbury. 1993. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* **268**: 305-14.
- Hu, M., D. Krause, M. Greaves, S. Sharkis, M. Dexter, C. Heyworth, and T. Enver. 1997. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* **11**: 774-85.
- Hurlin, P.J., C. Queva, and R.N. Eisenman. 1997. Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites. *Genes Dev* **11**: 44-58.
- Hurlin, P.J., E. Steingrimsson, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and R.N. Eisenman. 1999. Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *Embo J* **18**: 7019-28.
- Ikura, T., V.V. Ogryzko, M. Grigoriev, R. Groisman, J. Wang, M. Horikoshi, R. Scully, J. Qin, and Y. Nakatani. 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* **102**: 463-73.
- Ince, T.A. and K.W. Scotto. 1995. A conserved downstream element defines a new class of RNA polymerase II promoters. *J Biol Chem* **270**: 30249-52.
- Jackson-Fisher, A.J., C. Chitikila, M. Mitra, and B.F. Pugh. 1999. A role for TBP dimerization in preventing unregulated gene expression. *Mol Cell* **3**: 717-27.
- Jeong, S. and A. Stein. 1994. Micrococcal nuclease digestion of nuclei reveals extended nucleosome ladders having anomalous DNA lengths for chromatin assembled on non-replicating plasmids in transfected cells. *Nucleic Acids Res* **22**: 370-5.
- Jones, K.A. and J.T. Kadonaga. 2000. Exploring the transcription-chromatin interface. *Genes Dev* **14**: 1992-6.
- Kadosh, D. and K. Struhl. 1998. Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol Cell Biol* **18**: 5121-7.
- Kaiser, K. and M. Meisterernst. 1996. The human general co-factors. *Trends Biochem Sci* **21**: 342-5.
- Kaldis, P. 1999. The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci* **55 (2)**: 284-96.
- Kim, Y.J., S. Bjorklund, Y. Li, M.H. Sayre, and R.D. Kornberg. 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* **77**: 599-608.
- Knoepfler, P.S. and R.N. Eisenman. 1999. Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* **99**: 447-50.
- Koleske, A.J. and R.A. Young. 1994. An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* **368**: 466-9.
- Kornberg, R.D. and Y. Lorch. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**: 285-94.
- Kramer, J.A., J.R. McCarrey, D. Djakiew, and S.A. Krawetz. 1998. Differentiation: the selective potentiation of chromatin domains. *Development* **125**: 4749-55.

- Kuo, M.H., J. Zhou, P. Jambeck, M.E. Churchill, and C.D. Allis. 1998. Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev* **12**: 627-39.
- Kuras, L. and K. Struhl. 1999. Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* **399**: 609-13.
- Kwok, R.P., J.R. Lundblad, J.C. Chrivia, J.P. Richards, H.P. Bachinger, R.G. Brennan, S.G. Roberts, M.R. Green, and R.H. Goodman. 1994. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**: 223-6.
- Lachner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, and T. Jenuwein. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116-20.
- Lagrange, T., A.N. Kapanidis, H. Tang, D. Reinberg, and R.H. Ebright. 1998. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* **12**: 34-44.
- Laherty, C.D., W.M. Yang, J.M. Sun, J.R. Davie, E. Seto, and R.N. Eisenman. 1997. Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* **89**: 349-56.
- Lee, D.Y., J.J. Hayes, D. Pruss, and A.P. Wolffe. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**: 73-84.
- Lemon, B. and R. Tjian. 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* **14**: 2551-69.
- Lenny, N., J.J. Westendorf, and S.W. Hiebert. 1997. Transcriptional regulation during myelopoiesis. *Mol Biol Rep* **24**: 157-68.
- LeRoy, G., G. Orphanides, W.S. Lane, and D. Reinberg. 1998. Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates in vitro. *Science* **282**: 1900-4.
- Li, X.Y., A. Virbasius, X. Zhu, and M.R. Green. 1999. Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors. *Nature* **399**: 605-9.
- Liu, D., R. Ishima, K.I. Tong, S. Bagby, T. Kokubo, D.R. Muhandiram, L.E. Kay, Y. Nakatani, and M. Ikura. 1998. Solution structure of a TBP-TAF(II)230 complex: protein mimicry of the minor groove surface of the TATA box unwound by TBP. *Cell* **94**: 573-83.
- Lo, W.S., R.C. Trievel, J.R. Rojas, L. Duggan, J.Y. Hsu, C.D. Allis, R. Marmorstein, and S.L. Berger. 2000. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* **5**: 917-26.
- Lorch, Y., M. Zhang, and R.D. Kornberg. 1999. Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* **96**: 389-92.
- Luger, K., A.W. Mader, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251-60.
- Luscher, B. 2001. Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene* **277**: 1-14.
- Luscher, B. and L.G. Larsson. 1999. The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene* **18**(19): 2955-66.
- Luscher, B. and R.N. Eisenman. 1988. c-myc and c-myb protein degradation: effect of metabolic inhibitors and heat shock. *Mol Cell Biol* **8**: 2504-12.
- Martinez, E., T.K. Kundu, J. Fu, and R.G. Roeder. 1998. A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. *J Biol Chem* **273**: 23781-5.
- Martinez-Balbas, M.A., A.J. Bannister, K. Martin, P. Haus-Seuffert, M. Meisterernst, and T. Kouzarides. 1998. The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *Embo J* **17**: 2886-93.
- McMahon, S.B., H.A. Van Buskirk, K.A. Dugan, T.D. Copeland, and M.D. Cole. 1998. The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* **94**: 363-74.

- McMahon, S.B., M.A. Wood, and M.D. Cole. 2000. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* **20**: 556-62.
- Meisterernst, M., A.L. Roy, H.M. Lieu, and R.G. Roeder. 1991. Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell* **66**: 981-93.
- Meroni, G., S. Cairo, G. Merla, S. Messali, R. Brent, A. Ballabio, and A. Reymond. 2000. Mlx, a new Max-like bHLHZip family member: the center stage of a novel transcription factors regulatory pathway? *Oncogene* **19**: 3266-77.
- Mitchell, P.J. and R. Tjian. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-8.
- Mizuguchi, G., C. Kanei-Ishii, T. Takahashi, T. Yasukawa, T. Nagase, M. Horikoshi, T. Yamamoto, and S. Ishii. 1995. c-Myb repression of c-erbB-2 transcription by direct binding to the c- erbB-2 promoter. *J Biol Chem* **270**: 9384-9.
- Mizzen, C.A., X.J. Yang, T. Kokubo, J.E. Brownell, A.J. Bannister, T. Owen-Hughes, J. Workman, L. Wang, S.L. Berger, T. Kouzarides, Y. Nakatani, and C.D. Allis. 1996. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**: 1261-70.
- Molinari, E., M. Gilman, and S. Natesan. 1999. Proteasome-mediated degradation of transcriptional activators correlates with activation domain potency in vivo. *Embo J* **18**: 6439-47.
- Nakajima, T., C. Uchida, S.F. Anderson, C.G. Lee, J. Hurwitz, J.D. Parvin, and M. Montminy. 1997. RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* **90**: 1107-12.
- Nakatani, Y., M. Horikoshi, M. Brenner, T. Yamamoto, F. Besnard, R.G. Roeder, and E. Freese. 1990. A downstream initiation element required for efficient TATA box binding and in vitro function of TFIID. *Nature* **348**: 86-8.
- Neish, A.S., S.F. Anderson, B.P. Schlegel, W. Wei, and J.D. Parvin. 1998. Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res* **26**: 847-53.
- Norton, V.G., B.S. Imai, P. Yau, and E.M. Bradbury. 1989. Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* **57**: 449-57.
- Novina, C.D. and A.L. Roy. 1996. Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet* **12**: 351-5.
- Oelgeschlager, M., R. Janknecht, J. Krieg, S. Schreek, and B. Luscher. 1996. Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins: effects on Myb- specific transactivation and on the cooperativity with NF-M. *Embo J* **15**: 2771-80. abs.html.
- Oelgeschlager, M., J. Krieg, J.M. Luscher-Firzlaff, and B. Luscher. 1995. Casein kinase II phosphorylation site mutations in c-Myb affect DNA binding and transcriptional cooperativity with NF-M. *Mol Cell Biol* **15**: 5966-74.
- Ogryzko, V.V., T. Kotani, X. Zhang, R.L. Schiltz, T. Howard, X.J. Yang, B.H. Howard, J. Qin, and Y. Nakatani. 1998. Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* **94**: 35-44.
- O'Neill, L.P. and B.M. Turner. 1995. Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription- independent manner. *Embo J* **14**: 3946-57.
- Orlando, V. 2000. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* **25**: 99-104. 3\_00001535 3\_00001535.
- Orlando, V., H. Strutt, and R. Paro. 1997. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**: 205-14.
- Orphanides, G., G. LeRoy, C.H. Chang, D.S. Luse, and D. Reinberg. 1998. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* **92**: 105-16.

- Otero, G., J. Fellows, Y. Li, T. de Bizemont, A.M. Dirac, C.M. Gustafsson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and J.Q. Svejstrup. 1999. Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell* **3**: 109-18.
- Owen-Hughes, T. and J.L. Workman. 1996. Remodeling the chromatin structure of a nucleosome array by transcription factor-targeted trans-displacement of histones. *Embo J* **15**: 4702-12.
- Parekh, B.S. and T. Maniatis. 1999. Virus infection leads to localized hyperacetylation of histones H3 and H4 at the IFN-beta promoter. *Mol Cell* **3**: 125-9.
- Patikoglou, G. and S.K. Burley. 1997. Eukaryotic transcription factor-DNA complexes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **26**: 289-325.
- Pazin, M.J. and J.T. Kadonaga. 1997. SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein- DNA interactions? *Cell* **88**: 737-40.
- Perez-Roger, I., S.H. Kim, B. Griffiths, A. Sewing, and H. Land. 1999. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J* **18**: 5310-20.
- Prendergast, G.C. 1999. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* **18**: 2967-87.
- Ptashne, M. and A. Gann. 1997. Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**: 569-77.
- Pulverer, B., A. Sommer, G.A. McArthur, R.N. Eisenman, and B. Luscher. 2000. Analysis of Myc/Max/Mad network members in adipogenesis: inhibition of the proliferative burst and differentiation by ectopically expressed Mad1. *J Cell Physiol* **183**: 399-410.
- Radhakrishnan, I., G.C. Perez-Alvarado, D. Parker, H.J. Dyson, M.R. Montminy, and P.E. Wright. 1997. Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions. *Cell* **91**: 741-52.
- Ranish, J.A., N. Yudkovsky, and S. Hahn. 1999. Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIB. *Genes Dev* **13**: 49-63.
- Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B.D. Strahl, Z.W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C.P. Ponting, C.D. Allis, and T. Jenuwein. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-9.
- Reeves, R., C.M. Gorman, and B. Howard. 1985. Minichromosome assembly of non-integrated plasmid DNA transfected into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **13**: 3599-615.
- Roeder, R.G. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **21**: 327-35.
- Roth, S.Y., J.M. Denu, and C.D. Allis. 2001. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120.
- Salghetti, S.E., S.Y. Kim, and W.P. Tansey. 1999. Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *Embo J* **18**: 717-26.
- Sauer, F., S.K. Hansen, and R. Tjian. 1995. Multiple TAFII's directing synergistic activation of transcription. *Science* **270**: 1783-8.
- Scheidereit, C. 1998. Signal transduction. Docking I kappaB kinases. *Nature* **395**: 225-6.
- Schubeler, D., C. Francastel, D.M. Cimbara, A. Reik, D.I. Martin, and M. Groudine. 2000. Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes Dev* **14**: 940-50.
- Sendra, R., C. Tse, and J.C. Hansen. 2000. The yeast histone acetyltransferase A2 complex, but not free Gcn5p, binds stably to nucleosomal arrays. *J Biol Chem* **275**: 24928-34.

- Shang, Y., X. Hu, J. DiRenzo, M.A. Lazar, and M. Brown. 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**: 843-52.
- Sheldon, L.A., M. Becker, and C.L. Smith. 2001. Steroid hormone receptor-mediated histone deacetylation and transcription at the mouse mammary tumor virus promoter. *J Biol Chem* **276**: 32423-6.
- Sherr, C.J. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**: 1059-65.
- Sherr, C.J. and J.M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**: 1501-12.
- Sinclair, A.J., I. Palmero, G. Peters, and P.J. Farrell. 1994. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Embo J* **13**: 3321-8.
- Sommer, A., K. Bousset, E. Kremmer, M. Austen, and B. Luscher. 1998. Identification and characterization of specific DNA-binding complexes containing members of the Myc/Max/Mad network of transcriptional regulators. *J Biol Chem* **273**: 6632-42.
- Sommer, A., S. Hilfenhaus, A. Menkel, E. Kremmer, C. Seiser, P. Loidl, and B. Luscher. 1997. Cell growth inhibition by the Mad/Max complex through recruitment of histone deacetylase activity. *Curr Biol* **7**: 357-65.
- Soutoglou, E., N. Katrakili, and I. Talianidis. 2000. Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol Cell* **5**: 745-51.
- Staller, P., K. Peukert, A. Kiermaier, J. Seoane, J. Lukas, H. Karsunky, T. Moroy, J. Bartek, J. Massague, F. Hanel, and M. Eilers. 2001. Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* **3**: 392-9.
- Sterner, D.E., P.A. Grant, S.M. Roberts, L.J. Duggan, R. Belotserkovskaya, L.A. Pacella, F. Winston, J.L. Workman, and S.L. Berger. 1999. Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA- binding protein interaction. *Mol Cell Biol* **19**: 86-98.
- Strahl, B.D. and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-5.
- Strutt, H. and R. Paro. 1999. Mapping DNA target sites of chromatin proteins in vivo by formaldehyde crosslinking. *Methods Mol Biol* **119**: 455-67.
- Sudarsanam, P., Y. Cao, L. Wu, B.C. Laurent, and F. Winston. 1999. The nucleosome remodeling complex, Snf/Swi, is required for the maintenance of transcription in vivo and is partially redundant with the histone acetyltransferase, Gcn5. *Embo J* **18**: 3101-6.
- Takahashi, Y., J.B. Rayman, and B.D. Dynlacht. 2000. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* **14**: 804-16.
- Takano, Y., Y. Kato, M. Masuda, Y. Ohshima, and I. Okayasu. 1999. Cyclin D2, but not cyclin D1, overexpression closely correlates with gastric cancer progression and prognosis. *J Pathol* **189**: 194-200.
- Tanguay, D.A., T.P. Colarusso, S. Pavlovic, M. Irigoyen, R.G. Howard, J. Bartek, T.C. Chiles, and T.L. Rothstein. 1999. Early induction of cyclin D2 expression in phorbol ester-responsive B-1 lymphocytes. *J Exp Med* **189**: 1685-90.
- Tansey, W.P. 2001. Transcriptional activation: risky business. *Genes Dev* **15**: 1045-50.
- Thomas, D. and M. Tyers. 2000. Transcriptional regulation: Kamikaze activators. *Curr Biol* **10**: R341-3.
- Thomas, J.O. and A.A. Travers. 2001. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **26**: 167-74.
- Tong, J.K., C.A. Hassig, G.R. Schnitzler, R.E. Kingston, and S.L. Schreiber. 1998. Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* **395**: 917-21.

- Travers, A. 1999. An engine for nucleosome remodeling. *Cell* **96**: 311-4.
- Varga-Weisz, P.D., T.A. Blank, and P.B. Becker. 1995. Energy-dependent chromatin accessibility and nucleosome mobility in a cell-free system. *Embo J* **14**: 2209-16.
- Verreault, A. 2000. De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev* **14**: 1430-8.
- Verrijzer, C.P. and R. Tjian. 1996. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem Sci* **21**: 338-42.
- Vettese-Dadey, M., P.A. Grant, T.R. Hebbes, C. Crane- Robinson, C.D. Allis, and J.L. Workman. 1996. Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *Embo J* **15**: 2508-18. abs.html.
- Vogelauer, M., J. Wu, N. Suka, and M. Grunstein. 2000. Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* **408**: 495-8.
- Wang, L., L. Liu, and S.L. Berger. 1998. Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes Dev* **12**: 640-53.
- Weis, L. and D. Reinberg. 1992. Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. *Faseb J* **6**: 3300-9.
- Weissman, J.D., J.A. Brown, T.K. Howcroft, J. Hwang, A. Chawla, P.A. Roche, L. Schiltz, Y. Nakatani, and D.S. Singer. 1998. HIV-1 tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11601-6.
- Wells, J., K.E. Boyd, C.J. Fry, S.M. Bartley, and P.J. Farnham. 2000. Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells. *Mol Cell Biol* **20**: 5797-807.
- Whitehouse, I., A. Flaus, B.R. Cairns, M.F. White, J.L. Workman, and T. Owen-Hughes. 1999. Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* **400**: 784-7.
- Wieczorek, E., M. Brand, X. Jacq, and L. Tora. 1998. Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* **393**: 187-91.
- Wittschieben, B.O., J. Fellows, W. Du, D.J. Stillman, and J.Q. Svejstrup. 2000. Overlapping roles for the histone acetyltransferase activities of SAGA and elongator in vivo. *Embo J* **19**: 3060-8.
- Xu, D., N. Popov, M. Hou, Q. Wang, M. Bjorkholm, A. Gruber, A.R. Menkel, and M. Henriksson. 2001. Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3826-31.
- Xue, Y., J. Wong, G.T. Moreno, M.K. Young, J. Cote, and W. Wang. 1998. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* **2**: 851-61.
- Yamit-Hezi, A. and R. Dikstein. 1998. TAFII105 mediates activation of anti-apoptotic genes by NF-kappaB. *Embo J* **17**: 5161-9.
- Zawel, L., K.P. Kumar, and D. Reinberg. 1995. Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev* **9**: 1479-90.
- Zawel, L. and D. Reinberg. 1993. Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **44**: 67-108.
- Zhang, Y., G. LeRoy, H.P. Seelig, W.S. Lane, and D. Reinberg. 1998. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* **95**: 279-89.
- Zhou, X., P.A. Marks, R.A. Rifkind, and V.M. Richon. 2001. Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10572-7.