

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT 1
INSTITUT FÜR BIOLOGIE

Diplomarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologe

Charakterisierung der Interaktion des epigenetischen Transkriptionsfaktors DPF3 mit dem BAF Chromatin- Remodeling-Komplex

vorgelegt von
Cornelia Dorn
geb. am 27.07.1984 in Berlin

angefertigt
am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin
in der Abteilung Lehrach, AG Cardiovascular Genetics von PD Dr. Silke Sperling
von März bis November 2009



MAX-PLANCK-GESellschaft

Die Diplomarbeit wurde vom 12.03.2009 bis 10.11.2009 am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin in der Arbeitsgruppe Cardiovascular Genetics angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Börner, Humboldt-Universität zu Berlin

PD Dr. Silke Sperling, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Börner dafür bedanken, dass er diese Arbeit begutachtet. Ein großer Dank gilt natürlich PD Dr. Silke Sperling für ihre Unterstützung, ihre Begeisterung und dafür, dass ich meine Arbeit in ihrer Gruppe anfertigen konnte. Die gesamte Arbeitsgruppe hat mich mit einer tollen Arbeitsatmosphäre und einem regen fachlichen Austausch immer wieder motiviert und viel lernen lassen. Dr. Martje Tönjes hat mir zahlreiche Techniken beigebracht, hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und war die beste Betreuerin, die man sich wünschen kann. Ilona Dunkel stand mir bei vielen größeren und kleineren Problemen im Labor zur Seite und hat mit ihrem Humor so manchen Arbeitstag aufgeheitert. Auch Jenny Schlesinger war immer äußerst hilfsbereit und hat sich sehr aufmerksam durch mein Manuskript gelesen. Michalina Mankowska hat sich mit mir zusammen durch viele Pulldowns gekämpft. Markus Schüler und Marcel Grunert haben meinen bioinformatischen Horizont erweitert und oft für erheiternde Mittags- und Teepausengespräche gesorgt. Qin Zhang hat mich über den deutschen Tellerrand hinausblicken lassen. Barbara Gibas hat sich um alle Bürokratie gekümmert und unsere grauen Zellen mit Schokolade versorgt.

Bei meiner Freundin Christina möchte ich mich dafür bedanken, dass sie meine Arbeit von Rechtschreibfehlern und falschen Kommas befreit hat. Und ein ganz besonders herzlicher Dank gilt schließlich meiner Familie und meinem Freund Benjamin für all ihre Unterstützung, ihre Aufmunterung und dafür, dass sie immer für mich da sind. Ihr seid die Besten!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Das Herz.....	5
1.2	Chromosomenorganisation und Regulation der Transkription.....	6
1.2.1	Histonmodifikationen.....	7
1.2.2	Chromatin-Remodeling-Komplexe.....	9
1.2.2.1	Der BAF Chromatin-Remodeling-Komplex.....	10
1.3	Der epigenetische Transkriptionsfaktor DPF3.....	12
1.4	Ziel der Arbeit.....	15
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	19
2.1.3	Bakterienmedien.....	21
2.1.4	Medien und Lösungen für die Arbeit mit eukaryotischen Zellen.....	22
2.1.5	Polyacrylamidgele zur Trennung von Proteingemischen.....	23
2.1.6	Enzyme.....	23
2.1.7	Antikörper.....	24
2.1.8	Primer.....	24
2.1.9	Vektoren.....	25
2.1.9.1	N-TAP-Vektor.....	25
2.1.9.2	pGEX-3X-Vektor.....	25
2.1.9.3	Flag-Vektoren.....	26
2.1.10	Plasmide.....	27
2.1.11	Bakterienstämme.....	27
2.1.11.1	<i>E. coli</i> DH10B.....	27
2.1.11.2	<i>E. coli</i> BL21 prae3.....	28
2.1.12	Software.....	28
2.1.13	Weitere Materialien und Geräte.....	28
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	29
2.2.1.1	HEK293T-Zellen.....	30
2.2.1.2	Kultivierung und Passagierung von HEK293T-Zellen.....	30
2.2.1.3	Auftauen von HEK293T-Zellen.....	30
2.2.1.4	Aussähen von HEK293T-Zellen für eine Transfektion.....	30
2.2.1.5	Plasmid-Transfektion von HEK293T-Zellen mit PEI.....	31

2.2.1.6	Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer	31
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.2.1	PCR	31
2.2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	32
2.2.2.3	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	33
2.2.2.4	Aufreinigung von DNA	33
2.2.2.5	Restriktionsverdau	33
2.2.2.6	Ligation	34
2.2.2.7	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i> DH10b	35
2.2.2.8	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i> BL21 prare3 für die Expression von GST-Proteinen	35
2.2.2.9	Dephosphorylierung von verdauter Vektor-DNA	35
2.2.2.10	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> DH10b	35
2.2.2.11	Übernachtskulturen von <i>E. coli</i> DH10b für die Analyse von Klonen	36
2.2.2.12	Vorkulturen von <i>E. coli</i> DH10b für die Plasmidisolation	36
2.2.2.13	Übernachtskulturen von <i>E. coli</i> DH10b für die Plasmidisolation	36
2.2.2.14	Vorkulturen von <i>E. coli</i> BL21 prare3 für die Expression von GST- Proteinen	37
2.2.2.15	Hauptkulturen von <i>E. coli</i> BL21 prare3 für die Expression von GST- Proteinen	37
2.2.2.16	Bestimmung der OD ₆₀₀ von Bakteriensuspensionen	37
2.2.2.17	Glycerin-Stocks von Bakterienkulturen	37
2.2.2.18	DNA-Sequenzierungen	38
2.2.3	Immunologische und proteinbiochemische Methoden	38
2.2.3.1	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> BL21 prare3	38
2.2.3.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	38
2.2.3.3	Gewinnung von Proteinextrakten aus HEK293T-Zellen für Pulldown- Assay	39
2.2.3.4	<i>In vitro</i> Translation	39
2.2.3.5	GST-Pulldown-Assay	39
2.2.3.6	Die TAP-Methode	41
2.2.3.7	TCA-Fällung von Proteinen	43
2.2.3.8	SDS-PAGE	43
2.2.3.9	Western Blot	43
2.2.3.10	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	44
2.2.3.11	Immunfluoreszenz-Färbung von HEK293T-Zellen	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Analyse von DPF3-Deletionskonstrukten mit der TAP-Methode	47
3.1.1	Klonierungen in den N-TAP-Vektor	49

3.1.2	Expression von Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen	50
3.1.3	Aufreinigung von TAP-Fusionsproteinen	51
3.1.4	Bindungsverhalten von aufgereinigten TAP-Fusionsproteinen	53
3.2	Untersuchung der direkten Bindung von DPF3 an den BAF-Komplex	54
3.2.1	Expression von Flag-Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen.....	55
3.2.2	<i>In vitro</i> Translation von Flag-Fusionsproteinen.....	56
3.2.3	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> BL21 prae3	56
3.2.4	GST-Pulldown mit HEK293T-Proteinextrakten.....	57
3.2.5	GST-Pulldown mit <i>in vitro</i> translatierten Flag-Proteinen.....	58
3.3	Analyse von DPF3-Deletionskonstrukten mittels GST-Pulldown	59
3.3.1	Klonierungen in den pGEX-3X-Vektor	60
3.3.2	Expression von Flag- und GST-Fusionsproteinen.....	60
3.3.3	GST-Pulldown mit DPF3-Deletionskonstrukten	60
3.4	Sequenzanalyse	62
3.4.1	Konservierung der Brg1-Bindebereiche	62
3.4.2	Suche nach konservierten Domänen und Motiven	66
4	Diskussion	69
4.1	Untersuchung der direkten Bindung von DPF3 an den BAF-Komplex	69
4.2	Charakterisierung der BRG1/DPF3-Bindung.....	71
4.3	Assoziation von HEY1 mit dem BAF-Komplex	76
5	Zusammenfassung.....	79
6	Abkürzungsverzeichnis	81
7	Referenzen.....	85
8	Anhang	91
8.1	Aminosäuresequenzen von DPF3.....	91
8.2	Alignment von humanem und murinem BRG1 und BAF60c	91
9	Eigenständigkeitserklärung.....	95

1 Einleitung

1.1 Das Herz

Das Herz ist das zentrale Organ des Kreislaufs. Es befindet sich im vorderen Mittelfell, einem Gewebsraum in der Brusthöhle, und liegt dem Zwerchfell auf. Beim erwachsenen Menschen ist es etwa doppelt faustgroß und wiegt ca. 300g. Das Herz empfängt sauerstoffarmes Blut aus dem Körperkreislauf über die obere und untere Hohlvene. Von dort aus gelangt es über den rechten Vorhof in den rechten Ventrikel. Über die Pulmonalklappe und die Pulmonalarterie wird das Blut in die Lunge gepumpt, wo es mit Sauerstoff angereichert wird. Das sauerstoffreiche Blut fließt über die Pulmonalvene zurück in das Herz und gelangt über den linken Vorhof in den linken Ventrikel. Dieser besitzt eine deutlich dickere Muskelwand als der rechte Ventrikel und pumpt das Blut über die Aortenklappe und die Aorta zurück in den Körperkreislauf (Abb. 1.1a).

In der Embryonalentwicklung ist das Herz das erste funktionsfähige Organ. Es entwickelt sich beim Menschen ab der dritten Embryonalwoche (Larsen, 1997). Seine Entwicklung erfordert eine komplexe Interaktion von Zellen des kardiogenen Mesoderms, der Neuralleiste und des Proepikards. Diese Entwicklungsvorgänge sind sehr anfällig für verschiedene Störungen. Angeborene Herzfehler stellen mit einer Inzidenz von 0,8% aller Lebendgeburten die größte Gruppe aller angeborenen Fehlbildungen beim Menschen dar. Nur eine Minderheit der angeborenen Herzfehler wird von Defekten einzelner Gene, wie z.B. der Transkriptionsfaktoren *NKX2.5* oder *TBX5*, ausgelöst. Bei der Mehrheit handelt es sich um multigenische und multifaktorielle Erkrankungen, deren Ursachen noch nicht im Detail verstanden sind (Kaynak et al., 2003). Die Phänotypen angeborener Herzfehler weisen eine große Variation auf, von sehr milden Formen bis zu komplexen Fehlbildungen, die mehrfache operative Eingriffe nötig machen bzw. nicht lebensfähig sind. Ein Beispiel für eine solche komplexe Fehlbildung ist die Fallotsche Tetralogie (Tetralogy of Fallot; TOF), die von einem Ventrikelseptumdefekt, einer Verengung der Pulmonalklappe, einem hypertrophen rechten Ventrikel und einer überreitenden Aorta gekennzeichnet wird. (Taussig, 1947) (Abb. 1.1b). Eine überreitende Aorta erhält Blut aus beiden Ventrikeln, es liegt ein Rechts-Links-Shunt vor. Dadurch ist die Sauerstoffversorgung des Körpers mangelhaft und es kann zur Zyanose kommen.

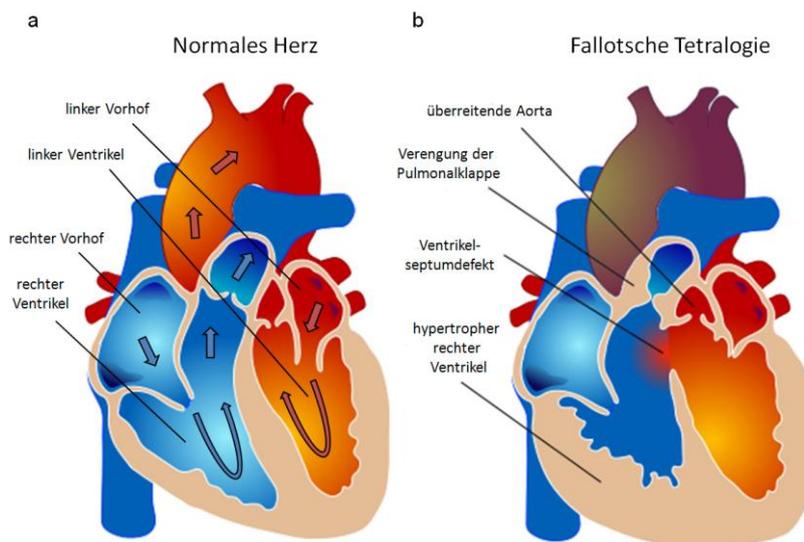


Abb. 1.1: Anatomie eines gesunden Herzens (a) und der Fallotschen Tetralogie (b) im Vergleich (modifiziert nach Ruiz, 2006). Im gesunden Herzen ist der Fluss von sauerstoffarmem Blut (blaue Pfeile) und sauerstoffreichem Blut (rote Pfeile) markiert.

1.2 Chromosomenorganisation und Regulation der Transkription

Ein diploider menschlicher Zellkern enthält 46 Chromosomen mit einer durchschnittlichen Länge von je 2cm. Da ein normaler Interphasekern nur einen Durchmesser von ca. 10µm hat, muss die DNA-Doppelhelix stark verkürzt werden (Hennig, 2002). Dies wird durch die Organisation der DNA im Chromatin erreicht, das außer der DNA noch Histone und Nicht-Histonproteine enthält (Abb. 1.2a). Zu den Nicht-Histonproteinen zählen z.B. die High mobility group (HMG)-Proteine. Die fundamentale Einheit des Chromatins sind die Nukleosomen: je 147 Basenpaare der Doppelhelix legen sich in 1,65 Windungen um ein Kern-Oktamer (core) aus den Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4. Diese Proteine kommen pro Nukleosom jeweils zweimal vor. An der Linker-DNA zwischen den Nukleosomen lagert sich je ein H1-Protein an. Die Kette von Nukleosomen hat einen Durchmesser von 11nm und wird weiter zu einer Chromatinfaser von 30nm aufgewunden. Diese 30nm-Faser bildet große Schleifen („Supertwist“) und wird schließlich zu den Chromatiden eines Chromosoms kondensiert (Kornberg, 1977; Luger et al., 1997). Histone sind kleine globuläre Proteine, die hoch konserviert sind. Sie sind reich an basischen Aminosäuren und können, vor allem an ihrem N-Terminus, posttranslational modifiziert werden (1.2.1). Die Organisation des Chromatins ist dynamisch und spiegelt die Aktivität des betreffenden Chromosomenabschnitts wider. In euchromatischen Bereichen liegt das Chromatin aufgelockert vor, die DNA ist leicht für Enzyme wie Polymerasen oder Transkriptionsfaktoren zugänglich. Heterochromatische Bereiche dagegen sind stark kondensiert. Ein Beispiel für fakultatives Heterochromatin

stellt das Barr-Körperchen dar, bei dem es sich um ein weitgehend stillgelegtes X-Chromosom der Frau handelt (Lyon, 1961). Diese Stilllegung ist notwendig, um die richtige Gendosis zu gewährleisten. Die Organisation des Chromatins stellt also, neben anderen Mechanismen wie der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, eine wichtiges Instrument der Transkriptionsregulation dar.

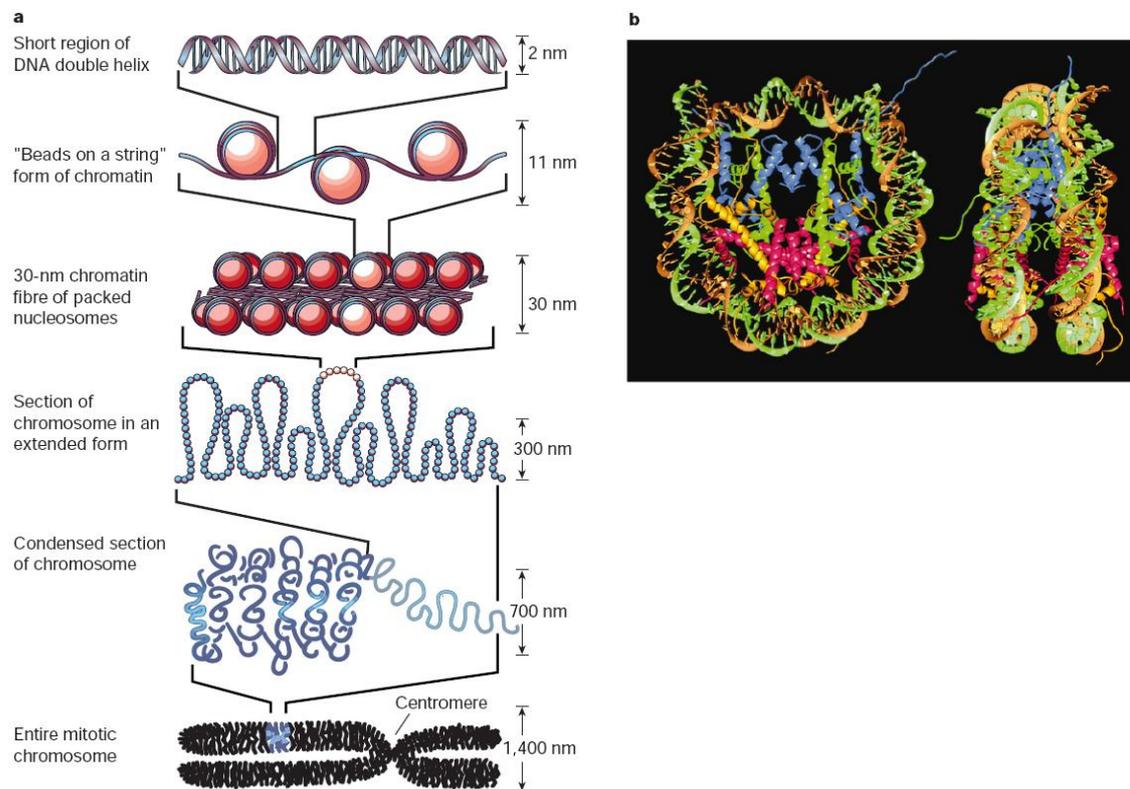


Abb. 1.2: (a) Organisationsstufen des Chromatins von der DNA-Doppelhelix bis zum kondensierten Chromosom. (b) Struktur eines Nucleosoms. Zu sehen sind die vier Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 in Rot, Gelb, Blau und Hellgrün sowie die DNA-Helix in Orange und Grün (Felsenfeld and Groudine, 2003).

1.2.1 Histonmodifikationen

Die Regulation der Chromatinstruktur beinhaltet verschiedene Mechanismen, wie den Austausch von Histonproteinen, die Aktivität von Chromatin-Remodeling-Komplexen sowie die posttranslationale Modifikation von Histonen. Diese Modifikationen befinden sich hauptsächlich am freien N-Terminus der Histone, der C-Terminus wird nur selten modifiziert. Wichtige Modifikationen sind z.B. die Acetylierung von Lysin, die Phosphorylierung von Serin oder Threonin und die Methylierung von Arginin oder Lysin (Abb. 1.3). Ihre Wirkung auf die Chromatinstruktur kann direkt sein, z.B. durch die Veränderung von elektronischen Ladungen oder internucleosomalen Kontakten. Darüber hinaus kann die Oberfläche der Histone so verändert werden, dass die Interaktion mit Chromatin-bindenden Proteinen, z.B. mit Chromatin-Remodeling-Komplexen (1.2.2),

gefördert oder unterdrückt wird. Verschiedene Histonmodifikationen korrelieren mit Transkriptionsaktivierung oder –inhibierung. So wirken die Acetylierung von Lysin und die Methylierung von Arginin meist aktivierend, während die Methylierung von z.B. Lysin 9 an H3 (H3K9me) die Transkription inhibiert (Berger, 2007). Acetylierungen werden von Histon-Acetyltransferasen (HATs) katalysiert und neutralisieren die positiven Ladungen der Histonproteine. Dadurch wird die Interaktion zur negativ geladenen DNA geschwächt und die Nukleosomenstruktur lockert sich auf. Histon-Deacetylasen (HDACs) entfernen Acetylreste und sorgen damit für eine Kondensierung des Chromatins (Backs and Olson, 2006). Methylierungen werden von Histon-Methyltransferasen katalysiert. Ihre Wirkung ist abhängig von der Position und vom Grad der Methylierung, wobei Mono-, Di- und Trimethylierungen möglich sind. Das Hinzufügen oder Entfernen von Histonmodifikationen kann von bereits existierenden Modifikationen abhängig sein (Fingerman et al., 2008).

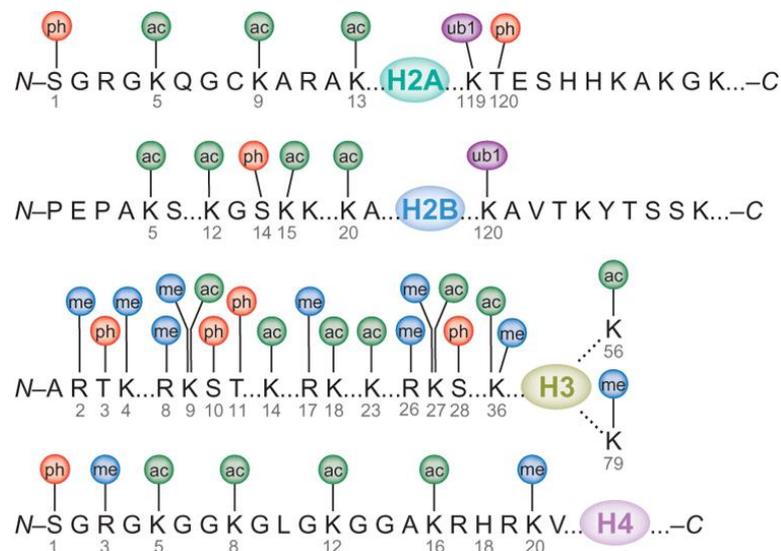


Abb. 1.3: Kovalente Modifikationen der vier humanen Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 an ihren C- und N-Termini (Bhaumik et al., 2007).

Histonmodifikationen werden von verschiedenen Proteindomänen erkannt. Die Bromodomäne, die in vielen Chromatin-assoziierten Proteinen und HATs vorkommt, bindet an acetyliertes Lysin (Mujtaba et al., 2007). Methylierungen werden z.B. von der Chromodomäne erkannt, die an methyliertes Lysin 4, 9 und 27 des Histons H3 bindet. Auch Plant Homeodomain (PHD)-Zinkfinger erkennen Methylierungen, genauer Trimethylierungen an Lysin 4 des Histons H3. Sie kommen in vielen nukleären Proteinen vor und enthalten konservierte Cystein- und Histidinreste, die zwei Zink-Ionen koordinieren. Dadurch werden zwei miteinander verflochtene Zinkfinger gebildet, die durch zwei kurze β -Faltblätter verbunden sind. Außerdem wird von zwei aromatischen Resten ein „Käfig“ gebildet, der für die Peptidbindung nötig ist (Bienz, 2006; Mellor, 2006).

Die kombinatorische Anordnung von verschiedenen Histonmodifikationen kann zu synergistischen oder antagonistischen Wirkungen auf die Chromatinstruktur führen. Damit wird durch diesen „Histon-Code“ dem genetischen Code eine Informationsebene hinzugefügt, die noch nicht im Detail verstanden ist (Jenuwein and Allis, 2001). Zusammen mit der Methylierung von DNA, einer weiteren Modifikation des Chromatins, werden Histonmodifikationen auch als epigenetische Markierungen bezeichnet. Die Beziehung dieser Markierungen zur epigenetischen Vererbung, d.h. der Vererbung von stabilen Chromatinveränderungen, ist noch unklar, da viele der Modifikationen reversibel und dynamisch sind (Berger, 2007).

1.2.2 Chromatin-Remodeling-Komplexe

Chromatin-Remodeling-Komplexe sind Multiprotein-Komplexe, welche die Lage von Nukleosomen entlang der DNA verändern, Histonproteine austauschen oder Nukleosomen ganz auflösen können. Sie haben damit eine zentrale Rolle in der Regulation der Chromatinstruktur. Alle Remodeling-Komplexe besitzen eine ATPase-Untereinheit, die für ihre katalytische Aktivität nötig ist. So müssen z.B. beim Verschieben von Nukleosomen mindestens 100 Kontakte zwischen der DNA und dem Histonoktamer überwunden werden, was die Hydrolyse von ATP erfordert. Chromatin-Remodeling-Komplexe lassen sich in verschiedene Familien einteilen, die sich in der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten voneinander unterscheiden (Gangaraju and Bartholomew, 2007). Sie gehören zur Superfamilie der DNA-stimulierten/abhängigen ATPasen in der SF2-Familie der DNA-Helicasen (Heyer et al., 2006).

Zu den fünf Familien von Chromatin-Remodeling-Komplexen gehören die SWI/SNF-, die CHD1-, die INO80-, die ISWI- und die RAD54-Familie (Gangaraju and Bartholomew, 2007). Die ISWI-Familie besteht aus relativ kleinen Komplexen von zwei bis vier Untereinheiten, zu denen z. B. der NURF-Komplex gehört (Längst et al., 1999). RAD54 spielt eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur durch homologe Rekombination. Es führt topologische Veränderungen in die DNA ein, die den Strangaustausch ermöglichen (Heyer et al., 2006; Zhang et al., 2007).

SWI/SNF ist ein Komplex aus etwa 11 Untereinheiten und wurde als erster Chromatin-Remodeling-Komplex in der Hefe entdeckt. Ursprünglich wurde er als Regulator des Paarungstypwechsels (mating type switch, SWI) und als Voraussetzung für das Wachstum auf anderen Energiequellen als Saccharose (sucrose non fermenting, SNF) charakterisiert (Peterson and Herskowitz, 1992). In *S. cerevisiae* gibt es, genau wie in *Drosophila* und im Menschen, zwei Versionen des Komplexes. In *Drosophila* enthalten beide Formen, genannt Brahma associated proteins (BAP) und Polybromo-associated BAP (PBAP), die gleiche katalytische Untereinheit (Brahma). Sie unterscheiden sich

aber in der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten, so enthalten PBAP-Komplexe die Polybromo-Untereinheit (Mohrmann and Verrijzer, 2005). SWI/SNF-Komplexe in Säugern werden eingeteilt in BRG1/hBRM-associated factors (BAF), die die spezifische Untereinheit BAF250 enthalten, und Polybromo-associated BAF (PBAF), die BAF180 enthalten. Viele Formen dieser Komplexe benötigen außerdem gewebespezifische Untereinheiten (Wang, 2003).

Remodeling-Komplexe können auf verschiedene Weise wirken. So legen SWI/SNF-Komplexe die nukleosomale DNA frei, indem DNA-Schleifen auf der Oberfläche des Nukleosoms gebildet werden. ISWI-Komplexe dagegen verschieben das gesamte Nukleosom entlang der DNA (Gangaraju and Bartholomew, 2007). Eine weitere Funktion von Chromatin-Remodeling-Komplexen ist der Austausch von Histonproteinen. Neben den konventionellen Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 gibt es diverse Histonvarianten, die spezielle Aufgaben in der Chromatinorganisation übernehmen. SWR1, das zur INO80-Familie gehört, bewirkt in der Hefe z.B. den Austausch von H2A gegen die Variante Htz1. Diese ist wichtig für die Festlegung von Grenzen zu stillgelegtem Chromatin (Krogan et al., 2003). Für die Rekrutierung von Remodeling-Komplexen spielen zwei Mechanismen eine zentrale Rolle, die Lenkung durch DNA-bindende Transkriptionsfaktoren und die Bindung an acetylierte Histone (Peterson and Workman, 2000).

1.2.2.1 Der BAF Chromatin-Remodeling-Komplex

BAF-Komplexe von Säugern gehören zur Familie der SWI/SNF Chromatin-Remodeling-Komplexe und enthalten die spezifische Untereinheit BAF250. Sie spielen eine wichtige Rolle in vielen Entwicklungsvorgängen und können auch an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein (Park et al., 2002). Die Komplexe bestehen aus etwa 10 Untereinheiten (Abb. 1.4). Ihre katalytische ATPase-Untereinheit kann entweder Brahma-related gene 1 (BRG1) oder Brahma (BRM) sein. Die etwa 250kDa großen Proteine BRG1 und BRM sind bis auf ihren N-Terminus homolog und besitzen u.a. eine Helicase- und eine Bromodomäne (Naidu et al., 2009). Die Bromodomäne kann acetylierte Lysine an Histonproteinen erkennen und auch an weitere Proteine binden. Verschiedene Untereinheiten des Komplexes (z.B. BAF60, BAF53 und BAF47) können ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, andere besitzen DNA-Bindedomänen (z.B. BAF170 und BAF155) (Simone, 2006). Auch BRG1 selbst kann direkte Interaktionen mit weiteren Proteinen eingehen, so bindet es z.B. an die Transkriptionsfaktoren NeuroD und Ngnr (Seo et al., 2005), an den Östrogen-Rezeptor (Ichinose et al., 1997) und an den Tumorsuppressor p53 (Naidu et al., 2009).

Die Zusammensetzung der etwa 2MDa großen Komplexe ist von ihrer Funktion abhängig und gewebespezifisch. So wird z.B. die 60kDa große Untereinheit Baf60c in frühen Mausembryonen spezifisch im Herzen, in den Somiten, im Neuralrohr und in den Anlagen der Gliedmaßen exprimiert. Die Reduktion des Baf60c-Levels mittels RNA-Interferenz führt u.a. zu Fehlbildungen des Herzens, die angeborenen Herzfehlern im Menschen ähnlich sind. Lickert et. al schlagen vor, dass die Funktion von Baf60c darin besteht, die Interaktion von Transkriptionsfaktoren wie dem herzspezifischen Gata4 mit dem BAF-Komplex zu fördern. Dadurch wird der Komplex zu bestimmten Zielsequenzen rekrutiert, an denen die Chromatinstruktur dann aufgelockert werden kann. So aktiviert Baf60c gemeinsam mit Gata4 die Transkription von Nkx2-5, einem weiteren Transkriptionsfaktor, der essentiell für die Herzentwicklung ist (Lickert et al., 2004). Auch in der Neuralentwicklung spielen BAF-Komplexe eine wichtige Rolle. Neuronale Vorläuferzellen der Maus exprimieren Komplexe mit den Untereinheiten Baf53a und Phf10. Für den Austritt aus dem Zellzyklus und die Differenzierung zu postmitotischen Neuronen ist ein Austausch dieser beiden Proteine gegen Baf53b, Dpf1 und Dpf3 nötig (Lessard et al., 2007).

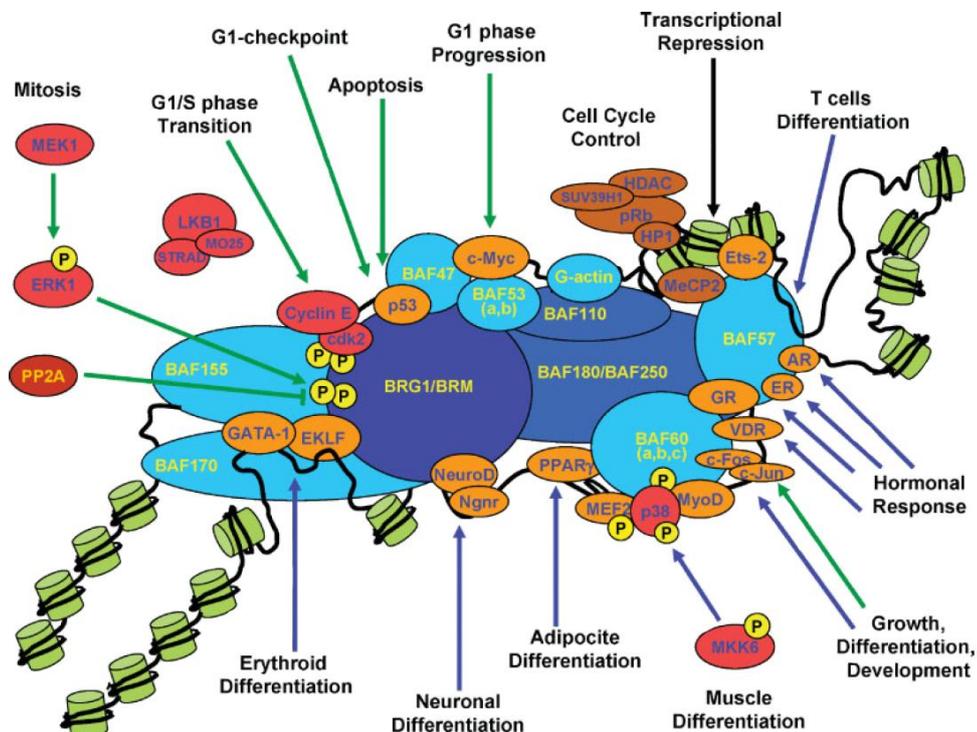


Abb. 1.4: Der SWI/SNF-Komplex in Säugern. Dargestellt sind der Komplex und verschiedene Signalwege, die auf ihn wirken. Die Untereinheit BAF250 charakterisiert den BAF-Komplex, BAF180 kommt dagegen in PBAF-Komplexen vor (Simone, 2006).

1.3 Der epigenetische Transkriptionsfaktor DPF3

D4, zink and double PHD fingers, family 3 (DPF3), auch bekannt als CERD4, ist ein evolutionär hoch konserviertes Mitglied der d4-Proteinfamilie. Die Mitglieder dieser Familie sind durch eine einzigartige N-terminale 2/3-Domäne, eine C₂H₂-Zinkfingerdomäne und zwei tandemartig angeordnete, C-terminale PHD-Zinkfinger gekennzeichnet. Weitere bisher bekannte Mitglieder der Proteinfamilie sind DPF1 und DPF2. DPF1, auch Neuro-d4 genannt, wird überwiegend im Gehirn exprimiert und hat eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Neuronen (Lessard et al., 2007). DPF2, auch bekannt als Ubid4/Requiem, wird ubiquitär exprimiert und ist für die Apoptose nach dem Entzug von Nahrungsfaktoren nötig (Gabig et al., 1994). Die Mitglieder der Proteinfamilie sind von Nematoden bis zu Vertebraten konserviert, was auf eine generelle wichtige Bedeutung hinweist. Die Diversität in der Expression lässt auf spezielle Funktionen der einzelnen Proteine schließen (Chestkov et al., 1996).

DPF3 wurde erstmals 1996 beim Screening einer humanen genomischen Bibliothek identifiziert (Chestkov et al., 1996). 2001 wurde es aus cDNA-Bibliotheken von Maus und Huhn kloniert und charakterisiert. Dabei wurde die Existenz von zwei Splicevarianten nachgewiesen (Ninkina et al., 2001). Auch im Menschen führt die Expression von *DPF3* zu zwei Splicevarianten (DPF3a und DPF3b) (Lange et al., 2008). Im Huhn sind bis heute vier Varianten bekannt und im Zebrabärbling gibt es eine Spliceform. Die humanen und murinen Proteine unterscheiden sich in nur einer Aminosäure.

Abb. 1.5 zeigt die Struktur des humanen DPF3a- und DPF3b-Proteins. Die nur in der d4-Familie vorkommende 2/3-Domäne wird aus den Exons zwei und drei gebildet, ihre Funktion ist noch ungeklärt. In der 2/3-Domäne befindet sich ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS). Zwischen der 2/3-Domäne und dem C₂H₂-Zinkfinger liegt eine nukleäre Interaktionsdomäne (nuclear receptor interaction domain; NID), die fünf Aminosäuren umfasst.

In der Mitte der Proteine befindet sich ein C₂H₂-Zinkfinger. Diese Domäne kommt in vielen eukaryotischen Proteinen vor und ist seit langem für ihre Bindung an Nukleinsäuren bekannt. Sie ist aber auch in der Lage, Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln (Brayer and Segal, 2008). Die typische fingerartige Struktur der Domäne wird gebildet, indem zwei Cysteine und zwei Histidine ein Zinkion koordinieren.

Im C-terminalen Bereich von DPF3b befindet sich ein Tandem-PHD-Finger, DPF3a ist verkürzt und besitzt nur den halben ersten PHD-Finger (Lange et al., 2008). Die PHD-Domäne vermittelt allgemein Protein-Protein-Interaktionen und kann an modifizierte Histone binden (1.2.1).

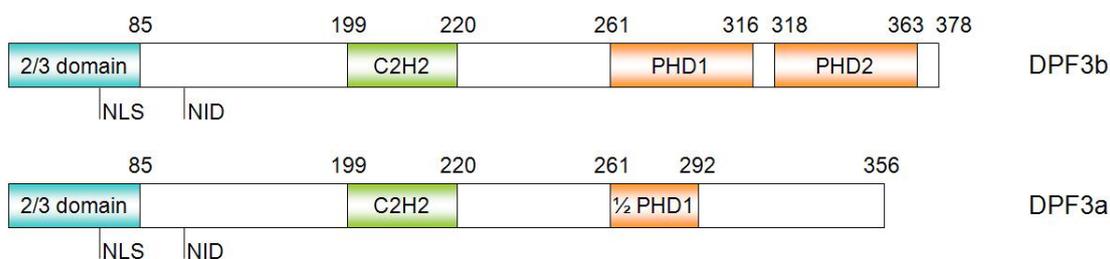


Abb. 1.5: Proteinstruktur der d4-Proteinfamilie am Beispiel von DPF3a und DPF3b. Gezeigt werden die 2/3-Domäne (blau), der C2H2-Zinkfinger (grün) und die PHD-Finger (orange). NLS: nukleäres Lokalisationssignal; NID: nukleäre Interaktionsdomäne. Die Zahlen stehen für die Nummern der Aminosäuren. Die Darstellung ist nicht linear.

DPF3 wird während der Embryonalentwicklung von Maus, Huhn und Zebrafisch im Herzen, in den Somiten und im Gehirn exprimiert. Im Mausembryo konnte die Expression ab dem Embryonaltag 7,5 in den Ventrikeln, in den Atrien und im Ausflusstrakt des sich entwickelnden Herzens nachgewiesen werden. Das Expressionslevel sinkt während der Embryonalentwicklung und ist nach der Geburt auf niedrigem Level stabil. Ein Knockdown von *dpf3* im Zebrafisch führt zu Fehlbildungen und einer verminderten Pumpleistung des Herzens sowie zu Störungen in der Anordnung von Aktinfilamenten. Betroffene Tiere zeigen eine charakteristische gebogene Morphologie des Schwanzes (Lange et al., 2008).

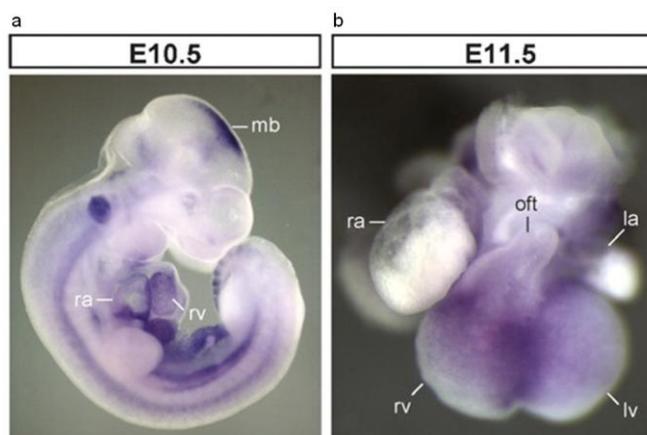


Abb. 1.6: Expressionsmuster von *Dpf3* mRNA (a) im Mausembryo 10,5 Tage nach der Befruchtung und (b) im Herz 11,5 nach der Befruchtung. mb: midbrain (Mittelhirn); la: left atrium (linker Vorhof); lv: left ventricle (linker Ventrikel); ra: right atrium (rechter Vorhof); rv: right ventricle (rechter Ventrikel); oft: outflow tract (Ausflusstrakt) (Lange et al., 2008)

Analysen von gesunden und fehlgebildeten Herzen haben gezeigt, dass beide Splicevarianten von DPF3 im hypertrophen Myokard des rechten Ventrikels von Patienten mit Fallotscher Tetralogie (1.1) signifikant überexprimiert sind. Dies lässt auf eine wichtige Rolle von DPF3 in der Entwicklung des menschlichen Herzens schließen (Kaynak et al., 2003; Lange et al., 2008).

Bisher waren PHD-Domänen für ihre Bindung an methylierte Lysine der Histone H3 und H4 bekannt, während Lysin-Acetylierungen nur von Bromodomänen erkannt werden (Kouzarides, 2007). Die Untersuchung der PHD-Finger von DPF3 zeigte, dass der Tandem-PHD-Finger von DPF3b neben methylierten Histonen auch acetylierte Lysine der Histonproteine H3 und H4 binden kann. Für die Bindung an H3 sind dabei sowohl PHD1 als auch PHD2 nötig, während H4-Acetylierungen auch von PHD2 allein erkannt werden können. Der Tandem-PHD-Finger von DPF3b ist damit der erste bekannte PHD-Finger, der neben methylierten auch acetylierte Histone binden kann (Lange et al., 2008).

Mit Hilfe der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (tandem affinity purification; TAP) (2.2.3.6) mit anschließender massenspektrometrischer Analyse (TAP-MS) konnten in humanen embryonalen Nierenzellen (human embryonic kidney; HEK293T) nukleäre Interaktionspartner von DPF3 identifiziert werden. Beide Isoformen sind mit dem BAF Chromatin-Remodeling-Komplex assoziiert (Lange et al., 2008).

Mittels Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender Chip-Detektion (ChIP-chip) wurden mögliche Zielgene von DPF3 untersucht. Dabei zeigte sich, dass DPF3-Zielgene besonders für die Zellproliferation, den Nukleosomenaufbau und das Chromatin-Remodeling wichtig sind und eine Rolle in der kardiovaskulären Entwicklung und in der Zytoskelett-Organisation haben. Weiterhin konnte ein gemeinsames Vorkommen von modifizierten Histonen, DPF3 und BRG1 an DNA-Zielsequenzen nachgewiesen werden (Lange et al., 2008).

Promoteranalysen konnten zeigen, dass die Expression von *DPF3* vom Transkriptionsfaktor Myocyte-specific enhancer factor 2a (MEF2a) aktiviert wird (Lange et al., 2008). MEF2 ist ein zentral wichtiger Faktor für die Herz- und Muskelentwicklung. *Mef2a*-defiziente Embryos des Zebrafisches zeigen phänotypisch ähnliche Störungen wie *dpf3*-Knockdown-Embryos (Naya et al., 2002).

Diese Ergebnisse weisen auf eine zentrale Rolle von DPF3 in der Herz- und Skelettmuskelentwicklung hin. Seine Funktion besteht wahrscheinlich darin, den BAF-Komplex als gewebespezifische Untereinheit zu verschiedenen Histonmodifikationen zu rekrutieren (Lange et al., 2008). Dabei ist die Rolle von DPF3a noch unklar, da es verkürzt ist und nicht an modifizierte Histone binden kann.

Neben der Bedeutung für die Herz- und Muskelentwicklung zeigten andere Studien eine Rolle von DPF3-Polymorphismen in der Entstehung von Brustkrebs (Hoyal et al., 2005) und Zahnanomalien (Vieira et al., 2008). Auch in der Entwicklung von Neuronen könnte DPF3 eine Bedeutung haben (Lessard et al., 2007). Bisher findet sich allerdings keine funktionale Charakterisierung der Rolle von DPF3 in diesen Vorgängen.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist die Charakterisierung der Interaktion zwischen dem epigenetischen Transkriptionsfaktor DPF3 und dem BAF Chromatin-Remodeling-Komplex. Dabei ist die zentrale Frage, mit welcher Domäne DPF3 an den BAF-Komplex bindet. Außerdem soll untersucht werden, an welcher Untereinheit des Komplexes die Bindung stattfindet.

Für die Untersuchung der DPF3-Domänen sollen TAP-Experimente mit anschließender Analyse durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) und Western Blot durchgeführt werden. Es werden TAPtag-markierte DPF3-Deletionskonstrukte und Flag-markiertes Baf60c verwendet. Die Deletionskonstrukte sind verkürzte DPF3-Proteine, denen verschiedene Domänen fehlen. Kann ein verkürztes Protein nicht an den BAF-Komplex binden, lässt sich daraus schließen, dass die fehlende Domäne für die Bindung an den Komplex verantwortlich ist. Mit der TAP-Methode kann nicht nur der direkte Interaktionspartner von DPF3, sondern der gesamte BAF-Komplex aufgereinigt werden. Daher kann Flag-Baf60c verwendet werden, obwohl der direkte Bindungspartner von DPF3 noch nicht bekannt ist. Wenn ein Deletionskonstrukt an den BAF-Komplex bindet, wird Flag-Baf60c mittels Western Blot nachweisbar.

Zuerst müssen die Deletionskonstrukte in den N-TAP-Vektor kloniert werden. Anschließend sollen die Vektoren mit einem Expressionsvektor für Flag-Baf60c in HEK293T-Zellen ko-transfiziert werden. Die Expression der TAPtag- und Flag-Fusionsproteine soll mittels Western Blot und Immunfluoreszenzfärbungen getestet werden. Wenn die Fusionsproteine ausreichend stark exprimiert werden, erfolgt die Aufreinigung über den TAPtag und die Analyse der erhaltenen Proteine mittels Western Blot.

Der Interaktionspartner von DPF3 soll mit Hilfe von Glutathion-S-Transferase (GST)-Pulldowns ermittelt werden. Dafür werden GST-markiertes DPF3 sowie Flag-markiertes Brg1 und Baf60c verwendet. Baf60c wurde gewählt, da es eine herz- und muskelspezifische Untereinheit des BAF-Komplexes darstellt und damit ein wahrscheinlicher Bindungspartner für DPF3 ist. Brg1 ist die katalytische Untereinheit des Komplexes und wird von verschiedenen Proteinen gebunden, die für eine Rekrutierung zum Chromatin sorgen. Somit kommt auch Brg1 als Interaktionspartner für DPF3 in Frage.

Für die Pulldown-Experimente sollen GST-Fusionsproteine in *Escherichia coli* BL21 prae3 exprimiert werden. Flag-markierte Proteine werden in HEK293T-Zellen und durch *in vitro* Translation exprimiert. Die Expression der Proteine soll mittels Western Blot

und/oder Immunfluoreszenzfärbungen überprüft werden. Nach dem GST-Pulldown werden Flag-Proteine, die an GST-DPF3 gebunden haben, mittels Western Blot nachgewiesen.

Wenn der Interaktionspartner von DPF3 gefunden wurde, soll die Pulldown-Technik außerdem verwendet werden, um die Ergebnisse der TAP-Experimente zu bestätigen. Dafür werden GST-markierte DPF3-Deletionskonstrukte verwendet, welche zum Teil noch kloniert werden müssen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen den zentral wichtigen epigenetischen Transkriptionsfaktor DPF3 weiter charakterisieren und damit zusätzliche, wichtige Einblicke in die Regulation der Herzentwicklung geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

1kb DNA Ladder	New England Biolabs
100bp DNA Ladder	New England Biolabs
6x DNA Buffer	Fermentas
Aceton	Merck
Agar	MPI-MG
Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen
Ammoniumbicarbonat	MPI-MG
Ampicillin	Sigma
APS	Merck
β -Mercaptoethanol	Calbiochem
Borsäure	Merck
Bradford-Reagenz	Sigma
BSA (100x)	New England Biolabs
CaCl_2	Merck
Calmodulin Sepharose 4B	GE Healthcare
Chloramphenicol	Sigma
DAPI	Invitrogen
DMEM	Gibco
dNTPs (5mM)	MPI-MG
DTT	Sigma
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare
EDTA	Merck
EGTA	Merck
Ethanol (technisch)	MPI-MG
Ethanol (reinst, unvergällt)	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
FBS	Biochrom
Fluka H_2O	Fluka
Glucose	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Merck

Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare
HCl	Merck
Hefeextrakt	Merck
HEPES	Sigma
IgG Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare
Imidazol	Fluka
IPTG	Fermentas
Isopropanol	Merck
KCl	Merck
KH_2PO_4	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
MgCl_2	Merck
MgOAc	MPI-MG
Mops	Sigma
Mowiol 4-88	Roth
NaCl	Merck
NaF	MPI-MG
Na_2HPO_4	Merck
NaOH	Merck
Natriumvanadat	Sigma
Nonidet P-40 IGEPAL (NP-40)	Sigma
NuPage LDS 4x Sample Buffer	Invitrogen
PBS, cell culture grade	Sigma
PEI	Polysciences Inc.
Penicillin/Streptomycin Lösung, cell culture grade	Sigma
PMSF	Sigma
Precision Plus Protein Standard	Biorad
Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete EDTA-free	Roche
RNase AWAY	Molecular BioProducts
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bislösung 30% (29:1)	Roth
SDS	Sigma
TCA, flüssig	Merck
Temed	Invitrogen
TE-Puffer, Endotoxin-frei	Qiagen
Tris	Sigma
TrisBase	Sigma

Triton X-100	Sigma
Trypan Blue Solution	Sigma
Trypsin-EDTA (0,05%), cell culture grade	Gibco
Trypton	Merck
Tween20 SigmaUltra	Sigma
ZnAc	Roth
ZnCl ₂	MPI-MG

2.1.2 Puffer und Lösungen

Einfache Lösungen mit definierter Konzentration oder Molarität werden in dieser Auflistung nicht aufgeführt. Die entsprechende Menge an Festsubstanz wurde eingewogen und mit ddH₂O aufgefüllt. Bei einigen Lösungen wurde anschließend der pH-Wert eingestellt (mit HCl bzw. NaOH). Wenn nötig, wurden die Lösungen autoklaviert oder steril filtriert.

Blockierungslösung	3% Milchpulver in PBS-T
Blotpuffer	1x Tris-Glycin-Puffer 20% Methanol
CoIP-Puffer	20mM Tris, pH 7,4 150mM NaCl 1mM EDTA, pH 8,0 1% Triton-X 4% Protease Inhibitor Cocktail, complete EDTA-free (Roche) 1mM NaVO ₂ 1 mM DTT 0,1mM PMSF

Zu einer Stammlösung aus Tris, NaCl, EDTA und Triton-X wurden die anderen Zutaten vor Gebrauch frisch hinzugegeben.

GST-Lysepuffer

50mM Tris, pH 8,0
 150mM NaCl
 2mM DTT
 50µM ZnAc
 0,5mM PMSF
 4% Protease Inhibitor Cocktail, complete EDTA-free (Roche)
 0,000003% Benzonase

Zu einer Tris-NaCl-Stammlösung wurden alle anderen Zutaten vor Gebrauch frisch hinzugegeben.

HEK-Lysepuffer

20mM Tris, pH 7,4
 150mM NaCl
 1mM EDTA, pH 8,0
 1% Triton-X
 0,00001% Benzonase
 1x Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)
 1mM NaVO₂
 1mM DTT
 0,1mM PMSF

Zu einer Stammlösung aus Tris, NaCl, EDTA und Triton-X wurden die anderen Zutaten vor Gebrauch frisch hinzugegeben.

PBS (10x Stocklösung)

80g/l NaCl
 2g/l KCl
 11,5g/l KH₂PO₄
 11,5g/l Na₂HPO₄
 pH 7,4

Für eine gebrauchsfertige PBS-Lösung (1x) wurde die Stocklösung 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

PBS-T

0,05% Tween in PBS (1x)

PEI (10x Stocklösung) Polyethylenimin (PEI) wurde bei 80°C in 200ml sterilem ddH₂O gelöst, die Konzentration betrug 10mg/ml. Die Stocklösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

Für eine gebrauchsfertige Lösung (1x PEI) wurde die Stocklösung bei 80°C erwärmt, 1:10 in sterilem ddH₂O verdünnt und mit HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert und bei -80°C gelagert.

Protease Inhibitor Cocktail 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail, complete EDTA-free (Roche) wurde in 2ml ddH₂O gelöst und bei -20°C gelagert. Dies ergab eine 25fach konzentrierte Lösung.

SDS-Laufpuffer 1x Tris-Glycin-Puffer
0,1% SDS

TBE (5x Stocklösung) 54g/l TrisBase
27,5g/l Borsäure
10mM EDTA
pH 8,0

Für eine gebrauchsfertige TBE-Lösung (0,5x) wurde die Stocklösung 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

Tris-Glycin-Puffer (10x Stocklösung) 30g/l Tris
144g/l Glycin

Die Stocklösung wurde 1:10 mit ddH₂O verdünnt und für das Ansetzen von Blotpuffer und SDS-Laufpuffer verwendet.

2.1.3 Bakterienmedien

LB-Medium 10g/l Trypton
5g/l Hefeextrakt
10g/l NaCl

LB-Amp-Medium LB-Medium
100µg/ml Ampicillin

LB-Amp/Cm-Medium	LB-Medium 100µg/ml Ampicillin 34µg/ml Chloramphenicol
LB-Amp-Agar	15g/l Agar in LB-Medium 100µg/ml Ampicillin
LB-Amp/Cm-Agar	15g/l Agar in LB-Medium 100µg/ml Ampicillin 34µg/ml Chloramphenicol
GST-LB-Medium	LB-Medium 20mM Mops, pH 7,9 22mM Glukose 50µM ZnAc 100µg/ml Ampicillin 24µg/ml Chloramphenicol

LB-Medium und –Agar wurden autoklaviert und bis zur Zugabe weiterer Zutaten bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.4 Medien und Lösungen für die Arbeit mit eukaryotischen Zellen

DMEM-Komplettmedium	DMEM 10% fetales Rinderserum (fetal bovine serum; FBS) 1% Penicillin/Streptomycin Lösung (Endkonzentration 100µg/ml)
Trypsin/EDTA	Die Lösung wurde gebrauchsfertig geliefert, aliquotiert und bei –20°C gelagert.
FBS	Die Lösung wurde gebrauchsfertig geliefert, aliquotiert und bei –20°C gelagert.
Penicillin/Streptomycin	Die Lösung wurde gebrauchsfertig geliefert, aliquotiert und bei –20°C gelagert.

PBS, cell culture grade Die Lösung wurde gebrauchsfertig geliefert und bei 4°C gelagert.

2.1.5 Polyacrylamidgele zur Trennung von Proteingemischen

	5% (Sammelgel)	8% (Trenngel)	10% (Trenngel)
H ₂ O	3,4ml	2,3ml	1,9ml
30% Acrylamid-Lösung	0,83ml	1,3ml	1,7ml
1M Tris (pH 6,8)	0,63ml	-	-
1,5M Tris (pH 8,8)	-	1,3ml	1,3ml
10% SDS	50µl	50µl	50µl
10% APS	50µl	50µl	50µl
TEMED	5µl	3µl	2µl

Tab. 2.1: Zusammensetzung verschiedener Polyacrylamidgele

Das Trenngel wurde in 1.0mm-Kassetten von Invitrogen gegossen und mit ddH₂O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel gegossen.

2.1.6 Enzyme

Alle Enzyme wurden zusammen mit den zugehörigen Puffern geliefert und entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt.

Enzym	Firma	Aktivität
AcTEV Protease	Invitrogen	10U/µl
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs	5U/µl
BamHI	New England Biolabs	20U/µl
Benzonase	Merck	25U/µl
EcoRI	New England Biolabs	20U/µl
HotStar Taq Polymerase	Qiagen	5U/µl
Phusion Hot Start Polymerase	Finnzymes	2U/µl
Sall	New England Biolabs	20U/µl
T4 Ligase	New England Biolabs	400U/µl
XhoI	New England Biolabs	20U/µl

Tab. 2.2: Enzyme

2.1.7 Antikörper

Für alle Antikörper wurden die optimalen Verdünnungen bereits in der AG bestimmt.

Antikörper	Firma	Quelle	Verdünnung im WB	Verdünnung in der IF
α -CBP	Upstate (05-932)	rabbit, monoclonal	1:1000	1:300
α -Flag	Sigma (F3165)	mouse, monoclonal	1:600	1:300
α -GST	Zymed (71-7500)	rabbit, polyclonal	1:2000	
α -mouse-Alexa Flour 488	Invitrogen (A-11029)	goat		1:2000
α -mouse-HRP	Sigma (A0168)	goat antiserum	1:10000	
α -rabbit-Alexa Flour 594	Invitrogen (A-11037)	goat		1:500
α -rabbit-HRP	Sigma (A2074)	mouse, monoclonal	1:10000	

Tab. 2.3: Antikörper und verwendete Verdünnungen

2.1.8 Primer

Primer für Klonierungen

Laborkürzel	Primername	Gen	Sequenz 5'-3'
cd007	dpf3b_h_xxaa91_bamhi_f	DPF3b	cagtatggatccttgaagatccaaaactgcgg
cd008	dpf3_h_xaa91_bamhi_f	DPF3b	gatcggatcctgaagatccaaaactgcgg
cd009	hey1_h_xaa2_bamhi_f	HEY1	cagtaggatcccaagcgagctcaccgag
cd010	hey1_h_stop_ecori_r	HEY1	cagtagaattctaaaaagctccgatctccgt
cd011	egfp_xaa2_bamhi_f	EGFP	cagtaggatcccgtgagcaagggcgaggagctg
cd012	egfp_stop_ecori_r	EGFP	cagtagaattcttactgtacagctcgcca
cd014	dpf3b_h_aa221_stop_ecori_r	DPF3b	agtagaattctagtgtgagcatagtggtgta
d066	h1_r2_stop_ecori	DPF3	cagtagaattctaggcctggcagccaaag
d068	h1_f1_start_bamhi	DPF3	cagtaggatcccgcgactgtcattcacaaccc
d072	h1_f2_xxstart_bamhi	Dpf3b	cagtaggatccttgcgactgtcattcacaaccc
d180	dpf3_h_aa236_ecori_r	DPF3b	agtagaattctaccgagtctcctggtcttgag
sp115	dpf3_h_aa261_stop_ecori_r	DPF3	tatgaattctcagtagtattgggaatgactg
sp116	dpf3_h_aa90_stop_ecori_r	DPF3	agtagaattcaatcttcaggtgggtgcaatc

Primer für Sequenzierungen

Laborkürzel	Primername	verwendet für	Sequenz 5'-3'
sp33	calm_fwd	N-TAP-Vektor	catagccgtctcagcagccaaccg
von Eurofins MWG Operon bereitgestellt	pGEXfor	pGEX-3X-Vektor	atagcatggcctttgcagg

Tab. 2.4: Primer

2.1.9 Vektoren

Für die Expression von markierten Proteinen wurden verschiedene Vektoren verwendet. TAPtag- und Flag-markierte Proteine wurden in HEK293T-Zellen exprimiert, GST-markierte Proteine in *E. coli* BL21 prae3.

2.1.9.1 N-TAP-Vektor

Der N-TAP-Vektor wurde freundlicherweise von Anne-Claude Gingras bereitgestellt. Er basiert auf dem pcDNA3-Vektor von Invitrogen (Abb. 2.1) und enthält einen N-terminalen TAPtag. Der TAPtag ist ein Tandem-Tag, der aus Protein A, einer Schnittstelle für die Tobacco etch virus (TEV)-Protease und dem Calmodulin-Bindepeptid besteht (2.2.3.6).

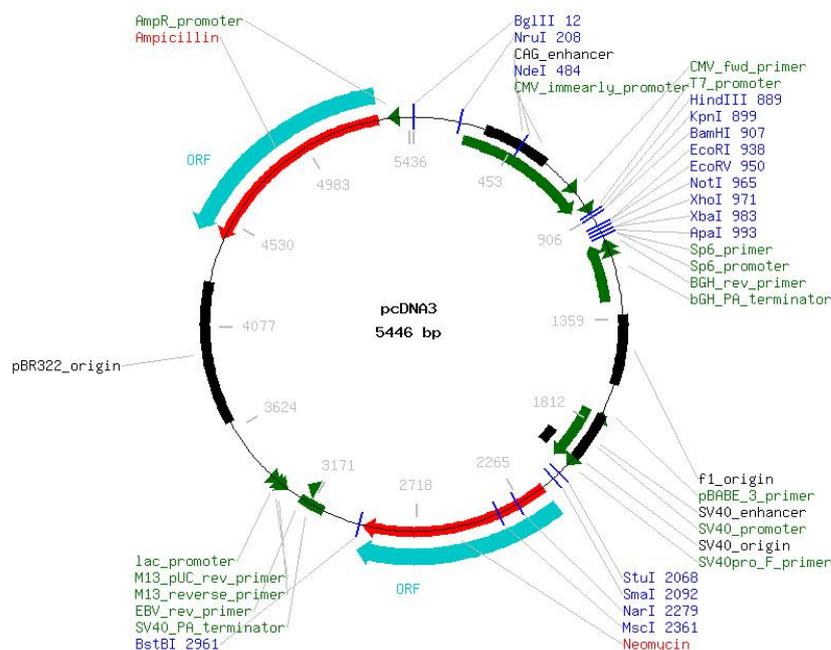


Abb. 2.1: Vektorkarte von pcDNA3 (LabLife, 2009)

2.1.9.2 pGEX-3X-Vektor

Der pGEX-3X-Vektor (Novagen) wurde freundlicherweise von Jürgen Willert zur Verfügung gestellt. Der Vektor enthält einen N-terminalen GST-Tag. GST ist ein Enzym von ca. 25 kDa, das eine hohe Affinität für Glutathion besitzt, und eignet sich daher gut für die Aufreinigung von Fusionsproteinen über eine Glutathion-haltige Matrix. Vor dem Tag befindet sich der tac-Promoter, ein künstlich erzeugter Hybrid aus dem trp- und dem

2.1.10 Plasmide

Name	Abkürzung	Gen	Quelle
pGEX-3X_hDPF3b_aa89-aa378	GST-DPF3b_aa89-aa378	DPF3b	in dieser Arbeit kloniert
NTAP_hHEY1	TAP-HEY1	HEY1	in dieser Arbeit kloniert
NTAP_EGFP	TAP-EGFP	EGFP	in dieser Arbeit kloniert
hDPF3b_aa02-236_pGEX	GST-DPF3_aa02-236	DPF3	in dieser Arbeit kloniert
hDPF3b_aa02-221_pGEX	GST-DPF3_aa02-221	DPF3	in dieser Arbeit kloniert
NTAP-DPF3-AA1-261	TAP-DPF3_aa01-261	DPF3	in dieser Arbeit kloniert
NTAP-DPF3-AA1-90	TAP-DPF3_aa01-90	DPF3	in dieser Arbeit kloniert
NTAP-DPF3-AA89-378	TAP-DPF3b_aa89-378	DPF3b	in dieser Arbeit kloniert
Flag-human-Hey1	Flag-HEY1	HEY1	B. Belandia
N-TAP	TAP	Vektor leer	A.-C. Gingras, MPI-MG
pGex-3X_h_Dpf3/2	GST-DPF3b	DPF3b	C. Grimm, MPI-MG
pGex-3x_h_Dpf3/2_aa169-378	GST-DPF3b_aa169-378	DPF3b	C. Grimm, MPI-MG
pGEX-3X	GST	Vektor leer	Novagen
pGex-3x_Dpf3_aa189-236	GST-DPF3_aa189-236	DPF3	C. Grimm, MPI-MG
pGex-3x_Dpf3/2_aa246-378	GST-DPF3b_aa246-378	DPF3b	C. Grimm, MPI-MG
pGex-3x_Dpf3/1_aa246-356	GST-DPF3a_aa246-356	DPF3a	C. Grimm, MPI-MG
pGex-3x_Dpf3_aa84-199	GST-DPF3_aa84-199	DPF3	C. Grimm, MPI-MG
pGex-3x_Dpf3/2_aa222-378	GST-DPF3b_aa222-378	DPF3b	C. Grimm, MPI-MG
pGex-3x_Dpf3_aa2-261	GST-DPF3_aa02-261	DPF3	C. Grimm, MPI-MG
pcDNA3.1_FLAG-Baf60c	Flag-Baf60c	Baf60c	B. Kaynak, MPI-MG
pcDNA3.1_Flag_Brg1	Flag-Brg1	Brg1	B. Kaynak, MPI-MG
pTL1_FlagC_h_Gata4	GATA4-Flag	GATA4	M. Mankowska, MPI-MG
pGEX3x_hHEY1	GST-HEY1	HEY1	M. Mankowska, MPI-MG
pIRES-EGFP3	IRES-EGFP	EGFP	P. Tomann, MPI-MG
N-TAP-DPF3/2	TAP-DPF3b	DPF3b	M. Tönjes, MPI-MG
NTAP-DPF3-AA1-236	TAP-DPF3_aa01-236	DPF3	M. Tönjes, MPI-MG
NTAP-DPF3-AA1-199	TAP-DPF3_aa01-199	DPF3	M. Tönjes, MPI-MG

Tab. 2.5: Plasmide

2.1.11 Bakterienstämme

2.1.11.1 *E. coli* DH10B

Der Stamm *E. coli* DH10B wurde entwickelt, um große DNA-Klone zu vermehren (Durfee et al., 2008). Zu seinen Eigenschaften gehören z.B. seine hohe Transformationseffizienz und die Fähigkeit, große Plasmide stabil zu halten. In dieser Arbeit wurde der Stamm für alle Klonierungen und zum Halten oder Vermehren von Plasmiden verwendet. Die Bakterien standen bereits mit CaCl_2 behandelt zur Verfügung und wurden bei -80°C gelagert.

2.1.11.2 *E. coli* BL21 prare3

E. coli BL21 (Novagen) ist ein Protease-defizienter Stamm, der für die Expression von Proteinen genutzt wird. Das Plasmid prare3 codiert für in *E. coli* seltene tRNAs und verbessert damit die Expression von eukaryotischen Proteinen. Zusätzlich verleiht es Resistenz gegen Chloramphenicol. In dieser Arbeit wurde der Stamm verwendet, um GST-markierte Proteine zu exprimieren. Die Bakterien standen bereits mit CaCl₂ behandelt zur Verfügung und wurden bei –80°C gelagert.

2.1.12 Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgende Software verwendet:

Programm	Anwendung
Photoshop (Adobe)	Bildbearbeitung, Erstellen von Grafiken
Powerpoint (Microsoft)	Erstellen von Grafiken
Axiovision (Carl Zeiss)	Auswertung von Fluoreszenz-Mikroskopbildern
VektorNTI (InforMax)	Sequenzanalyse, Entwurf von Primern
Citavi (Swiss Academic Software)	Verwaltung von Referenzen

Tab. 2.6: Software

2.1.13 Weitere Materialien und Geräte

Bio Photometer	Eppendorf
Brutschrank	Heraeus
Cassettes, 1.0mm	Invitrogen
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus
Curix 60 Entwicklermaschine	Agfa
Digitalkamera	Canon
Einmalküvetten	Sarstedt
Einmalküvetten, UVette	Eppendorf
FastPlasmid Mini Kit	5Prime
Filmkassette	FUJIFILM
Geldoc 2000	Biorad
Glasplättchen	Roth
Histologiekasten	Roth
Immobilion-PSQ PVDF Membran, 0,2µm pore size	Millipore
Laborverbrauchsmaterial	Eppendorf, Greiner, TPP, Corning

LDS-NuPage-Gelelektrophoresesystem	Invitrogen
Mikroskope	Carl Zeiss
Neubauer Improved Zählkammer	Roth
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel-Gläser
pH-Meter	Radiometer
Plasmid Purification Midi Kit	Qiagen
Rollinkubator RM 5	Cat
Röntgenfilm FUJI MEDICAL X-Ray	SuperRX
Rotationsrad	Labinco
Schüttelinkubator	Thermo Forma
Schüttler R010	Gerhard
Stericup Sterilfiltrationssystem	Millipore
Sterilwerkbank	Heraeus
Thermal Cycler	MJ Research
Thermomixer	Eppendorf
TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega
Ultraschall-Desintegrator	Branson
Verbrauchsmaterial für Zellkultur	TPP, Greiner, Corning
Vortexer	Wilten & Co.
Waagen	Sartorius
Wasserbad	Memmert
Whatman Papier 3mm	Schleicher & Schuell
Whatman Faltenfilter, Ø 150mm	Schleicher & Schuell
Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System	Promega
Wipptisch Rocky N	LTF Labortechnik
X-Cell Sure Lock Blot-Kammer	Invitrogen
Zentrifugen	Eppendorf, Himac

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden in einem separaten Zellkultur-Raum unter einer Sterilwerkbank und mit sterilen Medien und Lösungen durchgeführt. Die Sterilwerkbank wurde vor und nach der Arbeit mit 70% Ethanol desinfiziert. Auch alle Lösungen, Kulturflaschen und andere Gegenstände, mit denen unter der Sterilwerkbank gearbeitet wurde, wurden von außen desinfiziert. PBS, Trypsin-EDTA und Medien wurden bei 4°C

gelagert und vor der Arbeit, wenn nicht anders vermerkt, im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.2.1.1 HEK293T-Zellen

HEK293 ist eine Zelllinie, die 1977 durch Transformation von humanen embryonalen Nierenzellen mit DNA-Fragmenten vom Adenovirus Typ 5 generiert wurde (Graham et al., 1977). Die Variante 293T exprimiert das „SV40-T-Antigen“ (Lebkowski et al., 1985). Dies erlaubt die episomale Replikation von transfizierten Plasmiden, die den „SV40 origin of replication“ besitzen. Die Kopienzahl der Plasmide liegt zwischen 400 und 1000 Plasmiden pro Zelle, sodass ein hohes Expressionslevel des Transgens erreicht werden kann. Die Zellen standen in flüssigem Stickstoff gelagert zur Verfügung und wurden nach dem Auftauen (2.2.1.3) über ca. 30 Passagen gehalten.

2.2.1.2 Kultivierung und Passagierung von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen mit DMEM-Komplettmedium bei 37°C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre gehalten. Die Zellen wurden alle drei bis fünf Tage passagiert. Dafür wurden sie mit 10ml PBS gewaschen und anschließend mit 2ml 0,05% Trypsin-EDTA trypsinisiert (1min Inkubation bei 37°C). Mit 8ml DMEM-Komplettmedium wurde die Trypsinierung gestoppt und die Zellen wurden im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in eine neue Zellkulturflasche mit 15ml frischem DMEM-Komplettmedium überführt.

2.2.1.3 Auftauen von HEK293T-Zellen

Die Zellen wurden schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein Falconröhrchen mit 10ml DMEM-Komplettmedium überführt. Nach einer Zentrifugation (500g, 5min, Raumtemperatur) wurde das Zellpellet in 5ml DMEM-Komplettmedium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche mit 15ml DMEM-Komplettmedium überführt.

2.2.1.4 Aussähen von HEK293T-Zellen für eine Transfektion

Für eine Transfektion (2.2.1.5) wurden $3 \cdot 10^6$ Zellen in einer P150-Zellkulturschale ausgesät. Dafür wurden die Zellen mit 2ml 0,05% Trypsin-EDTA trypsinisiert, anschließend wurden 8ml DMEM-Komplettmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden gefärbt und gezählt (2.2.1.6). Sie wurden entsprechend ihrer Dichte verdünnt und in einem Gesamtvolumen von 30ml DMEM-Komplettmedium ausgesät.

2.2.1.5 Plasmid-Transfektion von HEK293T-Zellen mit PEI

Polyethylenimin (PEI) ist ein kationisches Polymer, das zur Transfektion von Zellen eingesetzt werden kann. Es bildet zusammen mit DNA positiv geladene Partikel, die über Endocytose in die Zelle aufgenommen werden (Rudolph et al., 2000).

Ein bis drei Stunden vor der Transfektion wurde das DMEM-Komplettmedium gewechselt, zuvor wurden die Zellen mit DMEM-Komplettmedium gewaschen.

Für die Transfektion wurden 30µg Plasmid-DNA und 90µl PEI mit je 1,5ml DMEM gemischt. Die beiden Ansätze wurden vereinigt und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung auf die Zellen gegeben.

24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Medium erneuert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet (2.2.3.3 und 2.2.3.6).

2.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde zunächst eine Vitalfärbung durchgeführt. Dafür wurden 40µl Zellsuspension 1:1 mit Trypan-Blau versetzt. Dieser Farbstoff wird nur von toten Zellen aufgenommen, da deren Zellmembran nicht mehr intakt ist. Es wird also eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen möglich.

Etwa 20µl der gefärbten Zellen wurden in eine Neubauer Improved Zählkammer gegeben. Es wurden vier Großquadrate (Volumen: 0,1µl) ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Da die Zellen 1:1 mit Trypan-Blau verdünnt wurden, erhält man durch Multiplikation mit dem Faktor 2 die Dichte der Zellsuspension (Zellen/0,1µl). Durch Multiplikation mit dem Faktor 10^4 erhält man die Zellzahl pro ml.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Durch die zyklische Abfolge von DNA-Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation kann theoretisch eine exponentielle Vermehrung der DNA erreicht werden. Dies ist möglich durch die Verwendung der thermostabilen Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, die auch durch den Denaturierungsschritt bei 95°C nicht ihre Aktivität verliert (Saiki et al., 1988). Aus Archea (z.B. *Pyrococcus furiosus*) gewonnene Polymerasen besitzen außerdem einen Korrekturmechanismus und senken damit die Mutationsrate (Greagg et al., 1999).

In dieser Arbeit wurden die HotStar Taq von Qiagen (aus *T. aquaticus*) sowie die Phusion Hot Start Polymerase von Finnzymes (basierend auf *Pyrococcus*-Polymerase) genutzt. Folgende PCR-Ansätze wurden verwendet:

<u>HotStar Taq</u>		<u>Phusion Hot Start</u>	
Template-DNA	10ng	Template-DNA	1ng
dNTPs (5mM)	4µl	dNTPs (5mM)	2µl
Vorwärtsprimer (10µM)	2µl	Vorwärtsprimer (10µM)	2µl
Rückwärtsprimer (10µM)	2µl	Rückwärtsprimer (10µM)	2µl
HotStar Buffer (10x)	10µl	Phusion Buffer HF (5x)	10µl
HotStar Taq	0,2µl	Phusion Hot Start	0,5µl
ddH ₂ O	ad 100µl	ddH ₂ O	ad 100µl

Die PCR-Programme richteten sich nach der Hybridisierungstemperatur der verwendeten Primer und nach der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts. Dabei benötigt die Elongation von 500 Nukleotiden ca. 30s. Die Hybridisierungstemperatur der Primer (2.1.8) ist u.a. abhängig von ihrer Länge und dem GC-Gehalt. In dieser Arbeit wurden die vom Hersteller Invitrogen angegebenen Hybridisierungstemperaturen verwendet. Typische Programme für die beiden Polymerasen hatten folgenden Ablauf:

<u>HotStar Taq</u>		<u>Phusion Hot Start</u>	
95°C	15:00	95°C	00:30
95°C	00:30	95°C	00:10
55°C	00:30	55°C	00:30
72°C	01:00	72°C	01:00
72°C	05:00	72°C	07:00
4°C	anhaltend	4°C	anhaltend

35 Zyklen

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Die negativ geladene DNA wandert dabei in einer Agarose-Matrix im elektrischen Feld und wird nach ihrer molekularen Masse getrennt.

Die Gelelektrophorese wurde mit einem 1%igen Agarosegel durchgeführt. Dafür wurde die Agarose eingewogen, in 0,5x TBE gelöst und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Die

Agarose wurde in eine Gelkammer gefüllt und Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5µg/ml) wurde hinzugefügt. Nach dem Vermischen polymerisierte die Lösung bei Raumtemperatur in ca. 20-30min aus. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Puffer versetzt und auf das Gel geladen. Zusätzlich wurde ein 100bp- und ein 1kb-DNA-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 0,5x TBE-Puffer für 20-30min bei 80V. Anschließend erfolgte die Geldokumentation unter UV-Licht mit dem System Geldoc 2000 von Biorad.

2.2.2.3 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Nukleinsäurekonzentration von Lösungen wurde photometrisch bestimmt. DNA hat ihr Absorptionsmaximum bei 260nm, dabei entsprechen 50µg doppelsträngiger DNA einer OD_{260} von 1. Die DNA-Lösungen wurden 1:20 bis 1:100 in ddH₂O verdünnt und in einer UVette-Einmalküvette gegen einen Blindwert gemessen.

2.2.2.4 Aufreinigung von DNA

DNA wurde nach einer PCR oder nach einem Restriktionsverdau aufgereinigt, um Enzyme und Pufferbestandteile zu entfernen. Dies wurde nach Herstellerangaben mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System von Promega durchgeführt. Außerdem wurde mit dem Kit DNA aus Agarosegelen aufgereinigt.

2.2.2.5 Restriktionsverdau

DNA kann mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen an Erkennungssequenzen geschnitten werden, die jeweils für ein Enzym spezifisch sind. Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen mit ihren Erkennungssequenzen und die für einen Doppelverdau verwendeten Puffer (alles New England Biolabs) aufgeführt.

<u>Enzym</u>	<u>Erkennungssequenz</u>		
EcoRI	G AATTC CTTAA G	EcoRI-Puffer	Puffer 3
BamHI	G GATCC CCTAG G		
XhoI	C TCGAG GAGCT C	Puffer 3	
Sall	G TCGAC CAGCT G		

Die senkrechten Striche in den Erkennungssequenzen markieren die Schnittstellen der Enzyme. Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen generieren überstehende DNA-Enden und haben eine Aktivität von 20U/μl.

Ein typischer Ansatz für einen Doppelverdau wurde bei 37°C für 2h oder bei 37°C über Nacht inkubiert und hatte folgende Zusammensetzung: 500ng DNA, 1μl BSA (10x), 1μl Puffer (10x), je 0,1μl Enzym und ddH₂O ad 10μl. Für den Verdau von Vektoren wurde 5μg DNA und je 2μl Enzym in einem Volumen von 50μl eingesetzt.

2.2.2.6 Ligation

Bei einer Ligation werden zwei DNA-Moleküle kovalent miteinander verknüpft. Dabei wird enzymatisch eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Ende des einen und dem 5'-Ende des anderen Moleküls gebildet.

In dieser Arbeit wurde die Ligation genutzt, um ein Insert in einen Vektor einzufügen. Dafür wurden beide Moleküle zuvor mit den gleichen Enzymen verdaut (2.2.2.5), der Vektor wurde zusätzlich dephosphoryliert (2.2.2.9).

Für einen Ligationsansatz wurden 50ng Vektor-DNA, 150ng Insert-DNA, 2μl Quick Ligation Buffer und 1μl T4 Ligase in ein Gesamtvolumen von 10μl pipettiert und für 30-60min bei Raumtemperatur inkubiert.

Um die Effizienz einer Vektor-Dephosphorylierung (2.2.2.9) zu testen, wurde außerdem ein Religationstest durchgeführt. Dafür wurde eine Ligation ohne Insert angesetzt. Der

Vektor sollte sich nicht religieren und damit nicht in *E. coli* DH10b transformieren lassen. Damit erhalten die Bakterien nicht die auf dem Vektor kodierte Antibiotika-Resistenz und können auf einem selektiven Medium (z.B. LB-Amp-Agar) nicht wachsen.

2.2.2.7 Transformation von Plasmiden in *E. coli* DH10b

Unter Transformation versteht man die Aufnahme freier DNA durch kompetente Bakterien. Da *E. coli* nicht natürlich kompetent ist, wurden hitzekompetente, mit CaCl_2 behandelte Zellen verwendet. Diese standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung und wurden bei -80°C gelagert.

100 μl hitzekompetente Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und für 40min mit 5 μl Ligationsansatz (2.2.2.6) oder 500ng Plasmid-DNA auf Eis inkubiert. Dann erfolgte für 45s ein Hitzeschock bei 42°C . Anschließend wurde 1ml LB-Medium zu den Zellen gegeben und sie wurden für 30min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Amp-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.8 Transformation von Plasmiden in *E. coli* BL21 prare3 für die Expression von GST-Proteinen

E. coli BL21 prare3-Zellen wurden mit ca. 500 μg Plasmid-DNA (pGEX-3X-Vektor) transformiert. Die Transformation wurde wie unter 2.2.2.7 beschrieben durchgeführt, die Bakterien wurden auf LB-Amp/Cm-Agar ausplattiert.

2.2.2.9 Dephosphorylierung von verdauter Vektor-DNA

Vektoren, die mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden (2.2.2.5), wurden anschließend dephosphoryliert. Dies verhindert die Bildung einer Phosphodiesterbindung und damit die Religation des Vektors ohne ein Insert.

Für die Dephosphorylierung wurden 5,5 μl Antarktische Phosphatase Puffer und 1 μl Antarktische Phosphatase zu einem 50 μl -Ligationsansatz hinzugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert.

2.2.2.10 Plasmidpräparation aus *E. coli* DH10b

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde die Plasmidisolierung mit dem Plasmid Purification Midi Kit von QIAGEN durchgeführt. Es wurden je 100ml

Übernachtskulturen von *E. coli* DH10b (2.2.2.13) eingesetzt. Die Plasmidisolierung wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Nur die Filterung durch die QIAfilter Midi Cartridges wurde ersetzt durch eine einstündige Zentrifugation (3000g, 4°C) und anschließendes Filtern des Überstandes durch einen Faltenfilter. Je nach Größe des Pellets wurde die DNA in 100 bis 300µl TE-Buffer aufgenommen.

Um kleine Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen, z.B. um bei einer Klonierung verschiedene Klone auf ein Insert zu überprüfen, wurde das FastPlasmid Mini Kit von 5Prime verwendet. Die Plasmidisolierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, es wurden je 2ml Übernachtskulturen von *E. coli* DH10b (2.2.2.11) eingesetzt.

2.2.2.11 Übernachtskulturen von *E. coli* DH10b für die Analyse von Klonen

Für die Analyse von *E. coli* DH10b-Klonen nach Ligation (2.2.2.6) und Transformation (2.2.2.7) wurden von der selektiven Agar-Platte Übernachtskulturen in je 3ml LB-Amp-Medium angesetzt. Dafür wurde pro Kultur mit einer sterilen Pipettenspitze je ein Klon gepickt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert und anschließend für die Plasmidisolierung mit dem FastPlasmid Mini Kit (2.2.2.10) und das Anlegen von Glycerinstocks (2.2.2.17) verwendet.

2.2.2.12 Vorkulturen von *E. coli* DH10b für die Plasmidisolierung

Vorkulturen wurden in je 3ml LB-Amp-Medium angesetzt. Dieses wurde mit gefrorener Bakterienkultur aus einem Glycerin-Stock (2.2.2.17) angeimpft, die mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen wurde. Die Vorkulturen wurden ca. 3-4h bei 37°C im Schüttler inkubiert.

2.2.2.13 Übernachtskulturen von *E. coli* DH10b für die Plasmidisolierung

Die Vorkulturen (2.2.2.12) wurden zum Animpfen von Übernachtskulturen für die anschließende Plasmidisolierung mit dem Plasmid Purification Midi Kit verwendet (2.2.2.10). Für jede Präparation wurden je 100ml LB-Amp-Medium angeimpft, die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

2.2.2.14 Vorkulturen von *E. coli* BL21 prae3 für die Expression von GST-Proteinen

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden von einer Platte LB-Amp/Cm-Agar mehrere Kolonien transformierter *E. coli* BL21 prae3-Zellen (2.2.2.8) entnommen und zum Animpfen von je 10ml LB-Amp/Cm-Medium Kultur verwendet. Anschließend wurden die Kulturen über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

2.2.2.15 Hauptkulturen von *E. coli* BL21 prae3 für die Expression von GST-Proteinen

Die OD₆₀₀ der Vorkultur (2.2.2.14) wurde mit einem Photometer bestimmt (2.2.2.16). Mit folgender Formel wurde ermittelt, wie viel Vorkultur für die Hauptkultur eingesetzt werden sollte:

$$Vol_{aussäen} = \frac{\text{Endvolumen} \times 0,15}{OD_{600(\text{Vorkultur})}}$$

0,15 ist dabei die Start-OD₆₀₀ für die Hauptkultur. Von einer Vorkultur mit einer OD₆₀₀ von 1,5 müssen also für eine Hauptkultur mit 100ml Endvolumen 10ml Vorkultur ausgesät werden. Es wurden je 200ml Kultur in GST-LB-Medium angesetzt und bei 37°C im Schüttler inkubiert.

2.2.2.16 Bestimmung der OD₆₀₀ von Bakteriensuspensionen

Die Absorption bei 600nm ist ein Maß für die Dichte einer Bakteriensuspension und lässt sich mit einem Photometer bestimmen. Dafür wurden die Bakterienkulturen 1:10 mit LB-Medium verdünnt, dieser Verdünnungsfaktor wurde auch am Photometer eingegeben. Die Proben wurden gegen einen Blindwert gemessen.

2.2.2.17 Glycerin-Stocks von Bakterienkulturen

Von allen in dieser Arbeit klonierten Klonen wurden Glycerin-Stocks angelegt. Dafür wurden 500µl Bakterienkultur (in LB-Amp-Medium) mit 500µl 50%igem Glycerin vermischt, auf Trockeneis eingefroren und anschließend bei –80°C gelagert.

2.2.2.18 DNA-Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Es wurden 1125 ng Plasmid-DNA in 15µl Tris (5mM) eingesandt. Sequenzierprimer (2.1.8) wurden entweder von Eurofins MWG Operon zur Verfügung gestellt oder ebenfalls eingeschickt (Konzentration: 2µM). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm VektorNTI von InforMax.

2.2.3 Immunologische und proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21 prae3

Die *E. coli* BL21 prae3-Hauptkulturen (2.2.2.15) wurden bei 37°C inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatten. Anschließend erfolgte eine Induktion der Expression mit IPTG (Endkonzentration 1mM). Nach weiteren vier Stunden Wachstum bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert (3000g, 20min, 4°C) und bei -80°C eingefroren. Vor der Induktion und vor der Zentrifugation wurden je 50µl Bakterienkultur für die Überprüfung der Expression entnommen.

2.2.3.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Pellets von je 100ml Bakterienkultur (2.2.3.1) wurden auf Eis aufgetaut und in 5ml GST-Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen, indem sie dreimal für 20s mit Ultraschall behandelt wurden. Dazwischen wurde jeweils eine Pause von 20s eingehalten, um ein Überhitzen der Probe zu vermeiden. Nachdem Triton-X (Endkonzentration 0,1%) zu dem Bakterienlysate gegeben wurden, erfolgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis und schließlich eine Zentrifugation für 20min bei 14000g und 4°C. 200µl GST Sepharose Beads wurden mit 1ml PBS gewaschen (5min, Rotationsrad, 4°C) und danach abzentrifugiert (800g, 2min, 4°C). Der Überstand der Lysate wurde auf die GST Sepharose Beads gegeben und für 2h auf einem Rotationsrad bei 4°C inkubiert. Die Beads wurden dreimal für 10min in 10ml PBS gewaschen (auf Rotationsrad, 4°C) und schließlich in 500µl PBS resuspendiert. Die Effizienz der Bindung wurde mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) überprüft. Hierfür wurden der primäre Antikörper α-GST (Zymed 71-7500) und der sekundäre Antikörper α-rabbit-HRP (Sigma A2074) verwendet (2.1.7).

2.2.3.3 Gewinnung von Proteinextrakten aus HEK293T-Zellen für Pulldown-Assay

HEK293T-Zellen wurden mit Plasmid-DNA transfiziert (2.2.1.5) und 48h später geerntet. Vor der Ernte wurden die Zellen mit 10ml kaltem PBS gewaschen, anschließend wurden 2ml HEK-Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Nach 30min Inkubation bei 4°C wurde das Lysat in Eppendorf-Gefäße überführt und abzentrifugiert (18000g, 15min, 4°C). Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay (2.2.3.10) bestimmt.

2.2.3.4 *In vitro* Translation

Für die *in vitro* Translation von Flag-markierten Proteinen wurde das TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega verwendet. Das zu translatierende Protein muss dafür von einem Gen kodiert sein, das unter der Kontrolle des T7-Promoters steht. Das Kit wurde bei -80°C gelagert und alle Arbeiten fanden auf Eis statt. Da die Reaktion eine RNA-Zwischenstufe enthält, musste RNase-frei gearbeitet werden. Folgender Reaktionsmix wurde angesetzt und anschließend für 90min bei 30°C inkubiert: 40µl TNT Master Mix, 1µl Methionin (Endkonzentration 20µM), 1µg Plasmid-DNA, ad 50µl H₂O (Nuklease-frei).

Die Proteinlösung wurde aliquotiert (je 10µl) und bei -80°C gelagert. Die Expression des Proteins wurde mittels SDS-Page (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) überprüft, es wurden der primäre Antikörper α-Flag (Sigma F3165) und der sekundäre Antikörper α-mouse-HRP (Sigma A0168) genutzt (2.1.7).

2.2.3.5 GST-Pulldown-Assay

Der Pulldown-Assay ist eine biochemische Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro*. In dieser Arbeit wurden GST-markierte Zielproteine (bait) in *E. coli* BL21 prare3 exprimiert und auf einer Glutathion-Matrix gebunden (2.2.3.2). Flag-markierte Interaktionsproteine (prey) wurden in HEK293T-Zellen oder durch *in vitro* Translation exprimiert. Binden die Interaktionsproteine an die Zielproteine, so lassen sie sich mit einem Antikörper gegen den Flag-Tag nachweisen.

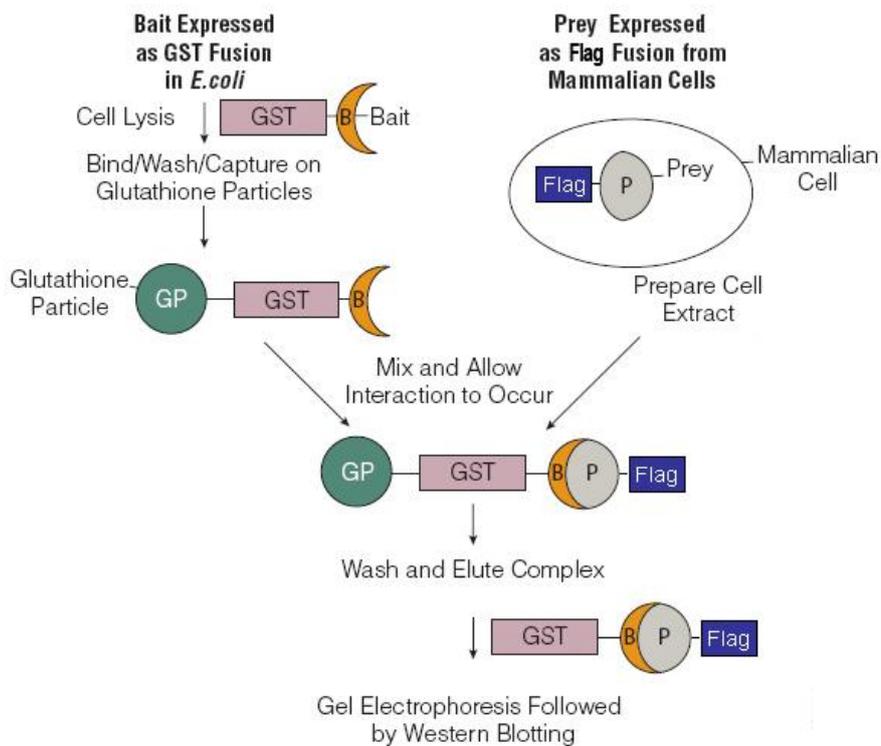


Abb. 2.3: Ablauf eines GST-Pulldown-Assays (modifiziert nach Promega, 2006)

Für einen GST-Pulldown-Assay wurden Glutathion Sepharose Beads mit aufgereinigtem GST-Fusionsprotein (2.2.3.2) für 1h bei 4°C auf einem Rotationsrad mit Flag-Proteinextrakt (2.2.3.3 und 2.2.3.4) inkubiert. Dafür wurde die Sepharose zuerst abzentrifugiert und der PBS-Überstand entfernt. Der GST-Tag alleine diente als Negativkontrolle, um unspezifische Bindungen der Flag-markierten Proteine an den Tag auszuschließen. Da er eine sehr starke Bindung an die Glutathion-Sepharose zeigte, wurden immer nur 37,5µl Beads für den Pulldown-Assay eingesetzt. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzungen der verschiedenen Assays:

	Flag-Protein in HEK293T-Zellen exprimiert		Flag-Protein <i>in vitro</i> exprimiert	
Flag-Proteinextrakt	250µg	250µg	20µg	20µg
Sepharose mit gebundenen GST-Fusionsproteinen	150µl	-	150µg	-
Sepharose mit gebundenem GST-Tag (Kontrolle)	-	37,5µl	-	37,5µg
CoIP-Puffer	ad 500µl	ad 500µl	ad 250µl	ad 250µl

Tab. 2.7: Zusammensetzung verschiedener GST-Pulldown-Assays

Nach der Inkubation wurden die Beads abzentrifugiert (400g, 2min, 4°C). Sie wurden dreimal für 10min in 1ml CoIP-Puffer gewaschen (auf Rotationsrad, 4°C) und schließlich in 15µl PBS und 5µl NuPage LDS 4x Sample Buffer + 100mM DTT aufgenommen. Um die gebundenen Proteine von der Sepharose zu eluieren und zu denaturieren, wurden die Proben für 5min bei 95°C gekocht. Für die Analyse mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) wurden jeweils folgende Proben aufgetragen:

	NuPage LDS 4x Sample Buffer + 100mM DTT	
Überstand von gekochten Beads	15µl	5µl
1% Input (HEK-Proteinextrakt)	2,5µg	1µl
5% Input (<i>in vitro</i> translatiertes Flag-Protein)	1µl	1µl

Tab. 2.8: Proben für die Western Blot-Analyse

Die Detektierung der Flag-markierten Proteine erfolgte mit dem primären Antikörper α -Flag (Sigma F3165) und dem sekundären Antikörper α -mouse-HRP (Sigma A0168) (2.1.7).

2.2.3.6 Die TAP-Methode

Die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung ist eine Methode zur Aufreinigung von Proteinen in zwei Schritten. Die erhaltenen Proteinkomplexe sind rein genug für eine anschließende massenspektrometrische Analyse (Tsai and Carstens, 2006; Gingras et al., 2005). Der in dieser Arbeit verwendete TAPtag (ca. 21 kDa) besteht aus Protein A, einer Schnittstelle für die TEV-Protease und einem Calmodulin-Bindepeptid (CBP). Der erste Schritt der Aufreinigung von TAPtag-Fusionsproteinen besteht aus einer Bindung des Protein A an IgG Sepharose. Protein A ist ein bakterielles Protein, das mit hoher Affinität an Immunglobuline bindet. Nach der Bindung erfolgt die Spaltung des Tags durch die TEV-Protease. Anschließend wird das markierte Protein an Calmodulin Sepharose gebunden, wodurch eine weitere Aufreinigung erzielt wird. Nach der Elution von der Calmodulin Sepharose lassen sich die erhaltenen Proteinkomplexe z.B. mittels Western Blot oder Massenspektrometrie untersuchen. Ein großer Vorteil der Methode besteht darin, dass ganze Proteinkomplexe aufgereinigt werden. Somit lassen sich komplexe Interaktionen zwischen Proteinen unter nativen Bedingungen untersuchen.

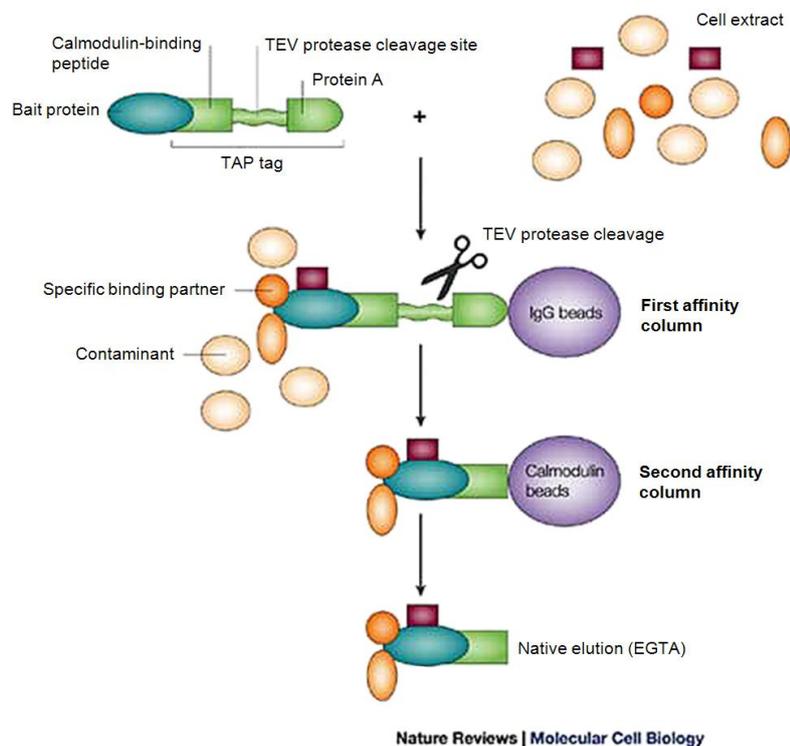


Abb. 2.4: Ablauf der Aufreinigung von Proteinkomplexen über den TAPtag (Huber, 2003)

In dieser Arbeit wurde die Methode verwendet, um die Bindung von DPF3-Deletionskonstrukten an Komponenten des BAF Chromatin-Remodeling-Komplexes zu untersuchen. HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für TAPtag- und Flag-markierte Proteine ko-transfiziert (2.2.1.5). Um eine ausreichende Menge an Protein zu erhalten, wurden je Konstrukt zehn P150-Zellkulturplatten benötigt. 48h nach der Transfektion wurden cytoplasmatische und nukleäre Extrakte gewonnen, dies erfolgte nach dem Protokoll „An optimised protocol for protein purification in cultured mammalian cells using a tandem affinity purification approach“ (Tsai and Carstens, 2006). Anschließend wurden die nukleären Extrakte nach dem Protokoll „Mammalian TAP-tagging technique – General protocols collection“ (Gingras, 2003) aufgereinigt, das unter www.proteomecenter.org/protocols/Mammalian%20TAP%20protocols.pdf verfügbar ist. Um die erfolgreiche Aufreinigung zu kontrollieren, wurden alle Analysefraktionen mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) untersucht. Hierfür wurden der primäre Antikörper α -CBP (Upstate 05-932) und der sekundäre Antikörper α -rabbit-HRP (Sigma A2074) verwendet (2.1.7). Eine Auflistung der Fraktionen und ihrer Bedeutung findet sich im Ergebnisteil unter 3.1.3. Die Eluate wurden mit Trichloressigsäure (Trichloroacetic acid, TCA) gefällt (2.2.3.7) und anschließend ebenfalls mittels SDS-Page (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) analysiert. Die Detektierung der Flag-markierten Proteine erfolgte mit dem primären Antikörper α -Flag (Sigma F3165) und dem sekundären Antikörper α -mouse-HRP (Sigma A0168) (2.1.7).

2.2.3.7 TCA-Fällung von Proteinen

Die über den TAPtag aufgereinigten nukleären Extrakte wurden mit TCA gefällt. Dafür wurden die Eluate mit 1/10 TCA versetzt und für 30min auf Eis inkubiert. Nach 20min Zentrifugation bei 20000g wurde das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, ca. 5min an der Luft getrocknet und in 15µl Tris (4mM) aufgenommen.

2.2.3.8 SDS-PAGE

SDS-PAGE ist eine biochemische Methode zur Trennung von Proteingemischen im elektrischen Feld. Die Elektrophorese findet dabei in einem Polyacrylamidgel statt. Durch den Einsatz des anionischen Tensids SDS werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt, sodass eine Trennung allein nach der molekularen Masse erfolgt.

Zur Vorbereitung auf die Elektrophorese wurden die Proben mit NuPage LDS 4x Sample Buffer + 100mM DTT versetzt und für 5min bei 95°C erhitzt. Dadurch wurden Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine aufgebrochen. Anschließend wurden die Proteingemische für die Auftrennung auf ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel geladen (2.1.5), das senkrecht in das LDS-NuPage-Gelelektrophoresesystem (Invitrogen) mit SDS-Laufpuffer eingespannt wurde. Um die Masse der Proteine abschätzen zu können, wurde auch ein Proteinmarker (Precision Plus Protein Standard) geladen. Die verwendeten Gelkonzentrationen, Trennungszeiten und Spannungen richteten sich nach der Größe der zu detektierenden Proteine:

	kleine und mittlere Proteine (< 100 kDa)	große Proteine (> 100 kDa)
Konzentration Sammelgel	5%	5%
Konzentration Trenngel	10%	8%
Einlauf in Sammelgel	10min, 80V	10min, 80V
Auftrennung	50min, 200V	60min, 200V

Tab. 2.9: SDS-PAGE

2.2.3.9 Western Blot

Beim Western Blot werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen (Renart et al., 1979). Die Gesamtheit der Proteine lässt sich dann

z.B. mittels Coomassie-Färbung sichtbar machen oder einzelne Proteine können mit Hilfe von Antikörpern spezifisch nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurden primäre Antikörper gegen die verwendeten Protein-Tags genutzt. Diese wurden anschließend von spezies-spezifischen sekundären Antikörpern gebunden, die mit der Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase; HRP) konjugiert sind. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol, wobei Chemilumineszenz freigesetzt wird. Dieses Signal lässt sich mit einem Röntgenfilm detektieren.

Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran erfolgte im „Wet-Blot“-Verfahren. Hierfür wurde die X-Cell Sure Lock Blot-Kammer von Invitrogen verwendet. Zunächst wurden Schwämme und Whatman Papier in Blot-Puffer eingeweicht, die Membran wurde zusätzlich zuerst mit Methanol benetzt. Es wurde folgendes „Sandwich“ in der Kammer aufgebaut: 2x Schwamm, 2x Whatman Papier, Polyacrylamidgel, PVDF-Membran, 2x Whatman Papier, 2x Schwamm. Die innere Blotkammer wurde mit Blot-Puffer gefüllt, außen verhinderte ddH₂O ein Überhitzen. Das Gel wurde für 1h (für Proteine >100kDa: 90min) bei 30V geblottet. Im Anschluss wurde der Blot für eine Stunde in Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen für 10min in PBS-T wurde für 1h bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Die Antikörper wurden in je 2,5ml Blockierungslösung angesetzt (Verdünnungen siehe 2.1.7). Die Membran wurde nochmals gewaschen, danach folgte die Detektierung der Proteine mit Hilfe des Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Reagenz nach Herstellerangaben. Anschließend wurde ein Röntgenfilm für 1 bis 30min belichtet und entwickelt.

2.2.3.10 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung (Bradford, 1976). Der Test basiert auf der Komplexbildung zwischen dem Farbstoff Brilliant Blue G und den in der Lösung vorhandenen Proteinen. Die Komplexbildung verschiebt das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 zu 595nm, die Absorption bei 595nm ist also proportional zur Proteinkonzentration der Lösung.

Für den Bradford-Test wurden 5µl Proteinlösung in 495µl PBS verdünnt, dann wurden 500µl Bradford-Reagenz hinzugefügt. Nach 10min wurde die Absorption mit einem Photometer gegen einen Blindwert gemessen. Die Proteinkonzentration wurde unter

Verwendung des linearen Bereichs der Standardkurve für Bovines Serumalbumin (BSA) bestimmt.

2.2.3.11 Immunfluoreszenz-Färbung von HEK293T-Zellen

Um die Effizienz der Transfektion von HEK293T-Zellen (2.2.1.5) zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Vor dem Aussäen der Zellen wurden je drei Glasplättchen in die Zellkulturschale gegeben. Diese wurden vor der Ernte der Zellen (2.2.3.3 und 2.2.3.6) in eine 24-Well-Platte überführt und mit je 1ml eiskaltem Methanol fixiert. Die 24-Well-Platten wurden bei -20°C bis zur Färbung gelagert.

Für die Immunfärbung wurden die Glasplättchen 15min bei Raumtemperatur in 0,003% Triton X-100/PBS gewaschen um die Zellmembran permeabel zu machen. Anschließend wurden die Plättchen mit dem primären Antikörper verdünnt in je $30\mu\text{l}$ 0,003% Triton X-100/PBS inkubiert. Es wurden die Antikörper α -CBP (Upstate 05-932) und/oder α -Flag (Sigma F3165) verwendet (2.1.7). Die Inkubation erfolgte für 1h bei Raumtemperatur in einem mit feuchtem Zellstoff ausgelegten Histologiekasten, die Plättchen wurden dabei auf Parafilm gelagert. Nach viermaligem Waschen in 0,003% Triton X-100/PBS wurde für 45min mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Die genutzten Antikörper waren α -mouse-Alexa Flour 488 (Invitrogen A-11029) bzw. α -rabbit-Alexa Flour 594 (Invitrogen A-11037) (2.1.7). Es wurde viermal in PBS-T gewaschen.

Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) behandelt, der für die Anfärbung von DNA verwendet wird. Dafür wurden die Zellen für 30min in DAPI (Endkonzentration $0,1\text{ng}/\mu\text{l}$) verdünnt in je $30\mu\text{l}$ ddH₂O inkubiert. Danach wurden sie in ddH₂O geschwenkt und in je $4\mu\text{l}$ Mowiol 4-88 auf einem Objektträger eingebettet.

Die Aufnahme der gefärbten Zellen erfolgte mit dem Mikroskop LSM 510 Meta von Carl Zeiss. Ausgewertet wurden die Bilder mit dem Programm Carl Zeiss Axiovision.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Interaktion des epigenetischen Transkriptionsfaktors DPF3 mit dem BAF Chromatin-Remodeling-Komplex untersucht. Die für die Bindung verantwortliche DPF3-Domäne sollte mit Hilfe von verkürzten DPF3-Proteinkonstrukten ermittelt werden, die in TAP-Experimenten eingesetzt wurden. Darüber hinaus sollten zur Bestätigung der Ergebnisse GST-Pulldown-Assays durchgeführt werden. Eine zweite Frage war, an welche Untereinheit des BAF-Komplex DPF3 bindet. Auch hierfür wurden GST-Pulldown-Assays eingesetzt, wobei gezielt die Bindung an die Untereinheiten Brg1 und Baf60c untersucht wurde.

3.1 Analyse von DPF3-Deletionskonstrukten mit der TAP-Methode

DPF3 ist eine gewebespezifische Untereinheit des BAF Chromatin-Remodeling-Komplexes und kann über seine PHD-Finger an modifizierte Histone binden (Lange et al., 2008). Außerdem hat es einen C2H2-Zinkfinger und eine 2/3-Domäne, die nur in der d4-Proteinfamilie vorkommt. Die Funktion beider Domänen für das Protein ist noch ungeklärt. Um herauszufinden, welche Domäne die Bindung an den BAF-Komplex vermittelt, wurde die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung mit verkürzten DPF3-Proteinen durchgeführt. Dafür wurden sechs TAPtag-markierte DPF3-Konstrukte (Abb. 3.1) gemeinsam mit Flag-Baf60c in HEK293T-Zellen exprimiert und über den TAPtag aufgereinigt. Baf60c ist eine Untereinheit des BAF-Komplexes (1.2.2.1). Lässt es sich nach der Aufreinigung nachweisen (mittels Western Blot), hat das Konstrukt an den BAF-Komplex gebunden und die fehlende Domäne ist nicht für die Bindung nötig. Bei der Aufreinigung über den TAPtag erhält man den gesamten assoziierten Protein-Komplex, der direkte Interaktionspartner von DPF3 muss nicht bekannt sein.

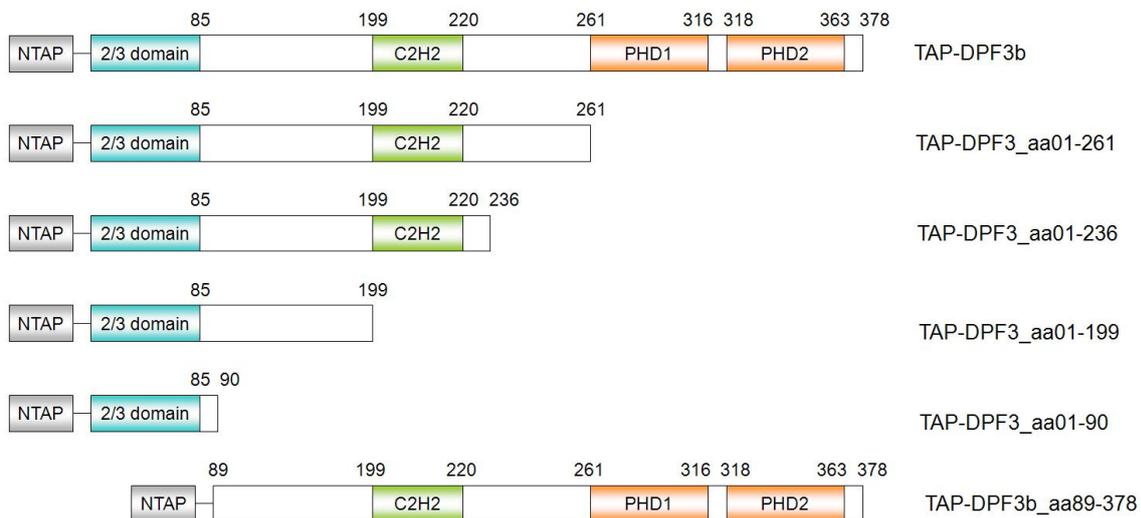


Abb. 3.1: DPF3-Konstrukte mit N-terminalem TAP-tag. Markiert sind die 2/3-Domäne (blau), der C2H2-Zinkfinger (grün) und die PHD-Finger (orange). Die Nummern stehen für die Anzahl der Aminosäuren. Die Darstellung ist nicht linear.

Die Kombination TAP-DPF3b + Flag-Baf60c diente als Positivkontrolle, da das intakte DPF3-Protein an den BAF-Komplex binden kann (1.3). Außerdem wurden drei Negativkontrollen verwendet (Tab. 3.1).

TAPtag-Fusionsprotein	Flag-Fusionsprotein
TAP-DPF3b	Flag-HEY1
TAP-HEY1	Flag-Baf60c
TAP-EGFP	Flag-Baf60c

Tab. 3.1: Negativkontrollen für TAP-Experimente. Erläuterungen siehe Text.

Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1 (HEY1) ist ein Transkriptionsfaktor, der in den Notch-Signalweg involviert ist und eine Rolle in der Embryonalentwicklung des Herzens spielt (Fischer et al., 2005). Bisher finden sich in der Literatur keine Hinweise auf eine Assoziation des Proteins mit dem BAF Chromatin-Remodeling-Komplex. Auch in TAP-MS-Experimenten mit DPF3 und Baf60c als Zielproteine wurde HEY1 nicht als Interaktionsprotein identifiziert (Lange et al., 2008). Die beiden Kombinationen TAP-DPF3 + Flag-HEY1 und TAP-HEY1 + Flag-Baf60c sollten also keine Interaktion zeigen. Das Enhanced green fluorescent protein (EGFP) ist eine Variante des ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* stammenden GFP, das für die Expression in eukaryotischen Zellen optimiert wurde und eine starke Fluoreszenz zeigt (Zhang et al., 1996). Da das Protein natürlicherweise nicht in Säugerzellen vorkommt, sollte auch die Kombination TAP-EGFP + Flag-Baf60c keine spezifische Bindung zeigen.

3.1.1 Klonierungen in den N-TAP-Vektor

Da nicht alle benötigten Plasmide in der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen, wurden folgende Klonierungen in den N-TAP-Vektor durchgeführt:

	Template	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
TAP-DPF3_aa01-261	TAP-DPF3b	h1_f1_start_bamhi	dpf3_h_aa261_stop_ecori_r
TAP-DPF3_aa01-90	TAP-DPF3b	h1_f1_start_bamhi	dpf3_h_aa90_stop_ecori_r
TAP-DPF3b_aa89-378	TAP-DPF3b	dpf3_h_xaa91_bamhi_f	h1_r2_stop_ecori
TAP-HEY1	Flag-HEY1	hey1_h_xaa2_bamhi_f	hey1_h_stop_ecori_r
TAP-EGFP	IRES-EGFP	egfp_xaa2_bamhi_f	egfp_stop_ecori_r

Tab. 3.2: Klonierungen in den N-TAP-Vektor. Angegeben sind die für die PCR genutzten Templates und Primer (2.1.8).

Für eine Klonierung wurde zunächst eine PCR durchgeführt (2.2.2.1), um den gewünschten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. Mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.2) wurde überprüft, ob die PCR erfolgreich war und das DNA-Fragment die richtige Größe hat. Der PCR-Ansatz wurde aufgereinigt, um die Polymerase und störende Pufferbestandteile zu entfernen (2.2.2.4). Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau der DNA mit den Enzymen BamHI und EcoRI (2.2.2.5). Nach dem Verdau wurde die DNA erneut aufgereinigt und für eine Ligation in den leeren N-TAP-Vektor eingesetzt (2.2.2.6). Der Vektor stand bereits mit BamHI und EcoRI geschnitten und dephosphoryliert zur Verfügung. Die Plasmide wurden in *E. coli* DH10b transformiert und auf Selektivmedium ausplattiert (2.2.2.7). Am nächsten Tag wurden von mehreren Klonen Übernachtskulturen angesetzt (2.2.2.11), die für die Plasmidisolierung (2.2.2.10) genutzt wurden. Die isolierten Plasmide wurden mit BamHI und EcoRI verdaut. Durch Agarose-Gelelektrophorese wurde überprüft, ob sie das gewünschte Insert enthalten oder ob sich der Vektor religiert hat. Abb. 3.2 zeigt die Überprüfung der Klone am Beispiel von TAP-DPF3b_aa89-378. Es wurde die Plasmid-DNA von drei Klonen untersucht, ein Plasmid enthält das gewünschte Insert mit einer Größe von ca. 800bp.

Die Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde zur Sequenzierung an Eurofins MWG Operon eingesandt, um Mutationen auszuschließen. Außerdem ließ sich so überprüfen, ob sich das Insert im richtigen Leserahmen befindet. Dies ist eine zusätzliche Kontrolle für die korrekte Gestaltung der Primer. War die Sequenz fehlerfrei, wurde das Plasmid für die Transfektion von HEK293T-Zellen eingesetzt (2.2.1.5).

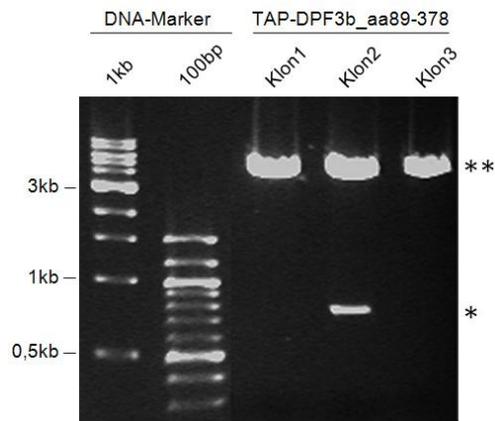


Abb. 3.2: Agarose-Gelelektrophorese für die Klonierung von TAP-DPF3b_aa89-378. Es wurde die Plasmid-DNA von drei Klonen isoliert und analysiert. Klon2 enthält das gewünschte Insert von ca. 800bp (*), während Klon1 und Klon3 lediglich den leeren Vektor aufweisen (**). Es wurden 500ng verdaute Vektor-DNA aufgetragen.

3.1.2 Expression von Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen

TAPtag- und Flag-markierte Proteine wurden in HEK293T-Zellen exprimiert. Dafür wurden die entsprechenden Plasmide in die Zellen ko-transfiziert (2.2.1.5). Um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen der Zellen mit den Antikörpern α -CBP und α -Flag durchgeführt (2.2.3.11). Abb. 3.3 zeigt die Färbung am Beispiel der TAP-Positivkontrolle Flag-Baf60c + TAP-DPF3b.

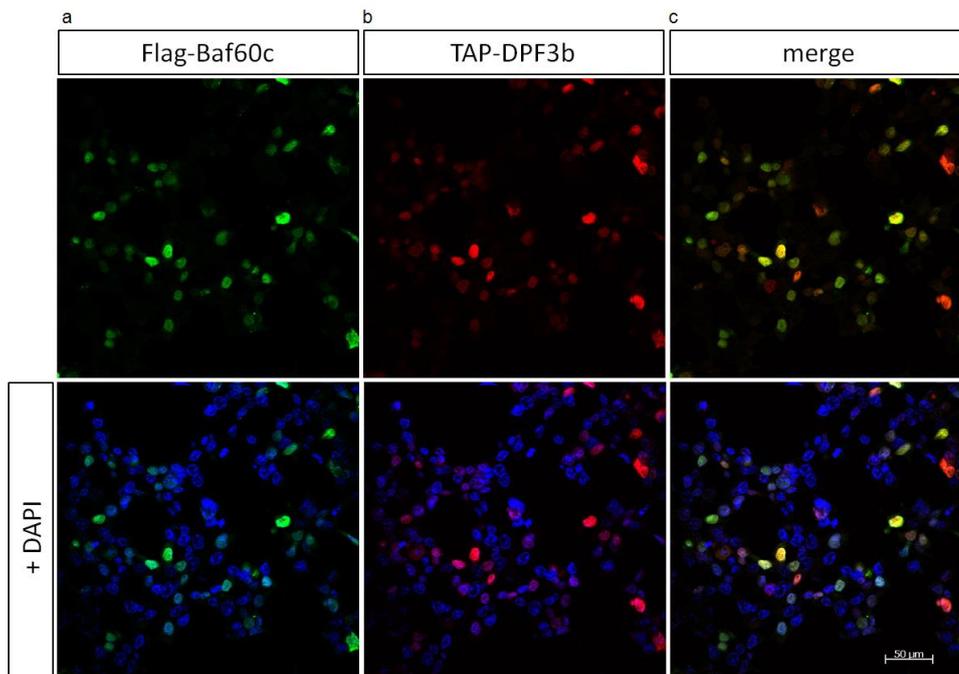


Abb. 3.3: Immunfluoreszenz-Färbung von HEK293T-Zellen am Beispiel der TAP-Positivkontrolle Flag-Baf60c + TAP-DPF3b. (a) Färbung von Flag-Baf60c mit den Antikörpern α -Flag und α -mouse-Alexa Flour 488. (b) Färbung von TAP-DPF3b mit den Antikörpern α -CBP und α -rabbit-Alexa Flour 594. (c) Überlagerung von (a) und (b). Die DNA in den Zellkernen wurde mit DAPI angefärbt.

In Abb. 3.3 ist zu erkennen, dass ein relativ geringer Anteil der Zellen positiv für die Fusionsproteine ist. Etwa 23% der Zellen sind positiv für Flag-Baf60c, ca. 19% für TAP-DPF3b. Beide Proteine werden nahezu ausschließlich im Zellkern exprimiert. Die Überlagerung der beiden Färbungen zeigt, dass oft die gleichen Zellen mit beiden Plasmiden transzifiziert wurden, dies ergibt eine gelbliche Färbung. Die Mehrheit der Zellen ist dagegen negativ für beide Fusionsproteine.

Für alle Transfektionen wurde die Effizienz anhand des Verhältnisses der gefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl ermittelt (Tab. 3.3). Die Transfektionseffizienzen reichen von ca. 13 bis 30%, dabei ist das Flag-Fusionsprotein meist in etwas mehr Zellen exprimiert als das TAPtag-markierte Protein.

Transfektion		Transfektionseffizienz TAP-Protein	Transfektionseffizienz Flag-Protein
TAP-DPF3b	Flag-Baf60c	19%	23%
TAP-DPF3_aa01-261	Flag-Baf60c	18%	29%
TAP-DPF3_aa01-236	Flag-Baf60c	20%	29%
TAP-DPF3_aa01-199	Flag-Baf60c	19%	26%
TAP-DPF3_aa01-90	Flag-Baf60c	13%	19%
TAP-DPF3b_aa89-378	Flag-Baf60c	21%	15%
TAP-DPF3b	Flag-HEY1	21%	13%
TAP-HEY1	Flag-Baf60c	29%	30%
TAP-EGFP	Flag-Baf60c	17%	27%

Tab. 3.3: Effizienz von Ko-Transfektionen in HEK293T-Zellen für TAP-Experimente

Neben der Immunfluoreszenz-Färbung wurde die Expression der markierten Proteine auch mittels Western Blot überprüft. Dafür wurden 15µg der aus den Zellen gewonnenen nukleären Extrakte eingesetzt. Die Ergebnisse finden sich unter 3.1.4 als Input.

3.1.3 Aufreinigung von TAP-Fusionsproteinen

Aus den transfizierten HEK293T-Zellen wurden nukleäre Extrakte gewonnen und über den TAPtag aufgereinigt (2.2.3.6). Die Volumina der eingesetzten nukleären Extrakte variierten um ca. 10%, da die Ausbeute an Zellen nicht völlig konstant war. Während der Aufreinigung wurden Analysefraktionen entnommen um die einzelnen Schritte zu überprüfen (Tab. 3.4).

Nr.	Fraktion	Funktion	Entnommene Menge [μ l]	Erwartete Bande
1	nukleärer Extrakt	Input (Expressionseffizienz)	50	stark
2	Überstand nach Inkubation mit IgG-Beads	Bindungseffizienz an IgG-Beads	50	keine
3	IgG-Beads vor TEV-Verdau	Effizienz des TEV-Verdau	20 (1/50)	sehr stark
4	TEV-Eluat	Effizienz des TEV-Verdau	10 (1/30)	schwach
5	IgG-Beads nach TEV-Verdau	Effizienz des TEV-Verdau	20 (1/50)	sehr schwach
6	Überstand nach Inkubation mit Calmodulin-Beads	Bindungseffizienz an Calmodulin-Beads	40 (1/30)	keine
7	Calmodulin-Beads vor Elution	Bindungseffizienz an Calmodulin-Beads	20 (1/50)	schwach
8	Eluat	Elutionseffizienz	10 (1/20)	schwach

Tab. 3.4: Analysefraktionen zur Kontrolle der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung. Angegeben sind die Fraktionen, die jeweils entnommenen Mengen und die im Western Blot erwartete Bandenintensität. Für die Fraktionen 1 und 2 ist die entnommene Menge nur absolut angegeben, da sich die Volumina der eingesetzten nukleären Extrakte leicht voneinander unterscheiden (um ca. 10%).

Die entnommenen Fraktionen wurden mit NuPage LDS 4x Sample Buffer + 100mM DTT versetzt und mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) analysiert.

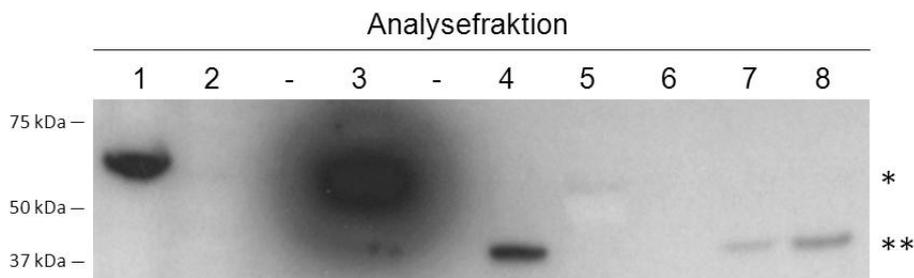


Abb. 3.4: Analysefraktionen am Beispiel der Aufreinigung von TAP-DPF3b_aa89-378. Für den Western Blot wurden die Antikörper α -CBP und α -rabbit-HRP verwendet. TAP-DPF3b_aa89-378 (*) vor TEV-Verdau und (**) nach TEV-Verdau. Erklärungen siehe Text.

Abb. 3.4 zeigt die bei der Aufreinigung von TAP-DPF3b_aa89-378 entnommenen Analysefraktionen. Der nukleäre Extrakt (1. Fraktion) zeigt wie erwartet eine starke Bande, die Expression in den HEK293T-Zellen war effektiv. Die 2. Fraktion (Überstand nach Inkubation mit der IgG Sepharose) zeigt keine Bande. Das bedeutet, dass das TAP-Fusionsprotein vollständig an die IgG-Beads gebunden hat. Die Beads selbst (3. Fraktion) geben daher wie erwartet ein sehr starkes Signal. Anhand der 4. Fraktion (Eluat nach dem TEV-Verdau) lässt sich erkennen, dass das Fusionsprotein deutlich verkürzt ist, da der Protein A-Teil des TAPtags entfernt wurde. Die IgG-Beads zeigen

nach dem TEV-Verdau eine sehr schwache Bande (5. Fraktion), der TEV-Verdau war fast vollständig und es ist kaum Protein an den Beads zurückgeblieben. Die 6. Fraktion (Überstand nach Inkubation mit Calmodulin-Beads) ergibt keine Bande, was die effektive Bindung an die Calmodulin-Beads bestätigt. Die Beads zeigen vor der Elution eine relativ schwache Bande (7. Fraktion), in der 8. Fraktion erkennt man das eluierte Protein.

3.1.4 Bindungsverhalten von aufgereinigten TAP-Fusionsproteinen

Die über den TAPtag aufgereinigten Proteine wurden mit TCA gefällt (2.2.3.7) und mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) auf die Bindung von Flag-Baf60c bzw. Flag-HEY1 untersucht. Es wurde jeweils die gesamte gewonnene Proteinmenge eingesetzt. Außerdem wurde die Expression von TAPtag- und Flag-Fusionsproteinen in den nukleären Extrakten überprüft (Input). Dafür wurden je 15µg des nukleären Extraktes auf das Polyacrylamidgel geladen.

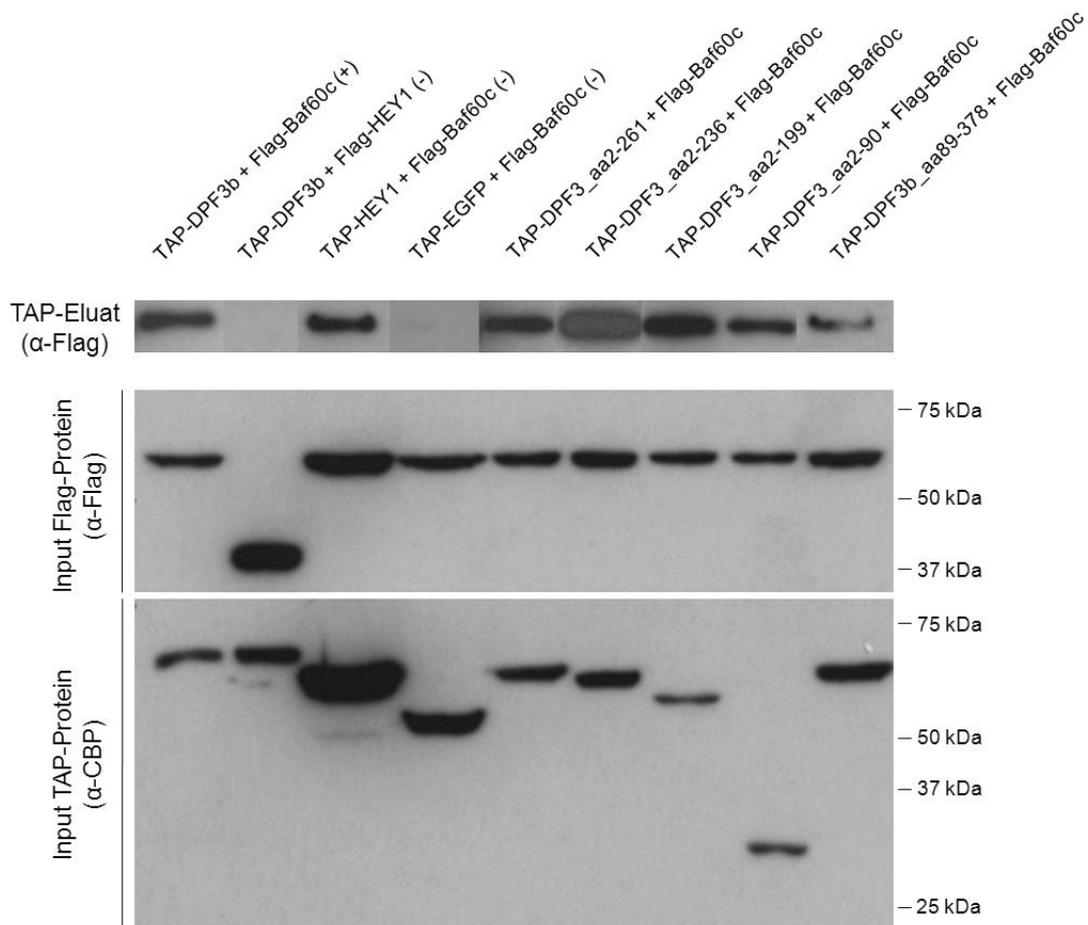


Abb. 3.5: Ergebnis der TAP-Experimente. Die oberste Reihe zeigt das über den TAPtag aufgereinigte Protein, der Western Blot erfolgte mit α -Flag und α -mouse-HRP. Die Ergebnisse mehrerer Western Blots wurden zusammengefasst, die Proteine haben nicht die gleiche Größe. Die Reihen 2 und 3 zeigen die Expression der Flag- bzw. TAPtag-Fusionsproteinen in den nukleären Extrakten, der Western Blot erfolgte mit α -Flag und α -mouse-HRP bzw. α -CBP und α -rabbit-HRP. (+) Positivkontrolle. (-) Negativkontrolle. Erklärungen siehe Text.

Abb. 3.5 fasst die Ergebnisse zusammen. Wie erwartet, bindet das vollständige TAP-DPF3b-Protein an Flag-Baf60c. TAP-DPF3b bindet nicht an Flag-HEY1, auch die dritte Negativkontrolle (TAP-EGFP + Flag-Baf60c) zeigt keine Bande im Western Blot. Dies stellt sicher, dass TAP-DPF3b keine unspezifische Bindung an den Flag-Tag und Flag-Baf60c keine Bindung an den TAPtag vermittelt. Die zweite Negativkontrolle (TAP-HEY1 + Flag-Baf60c) zeigt eine deutliche Bande. Diese Kontrolle wurde gewählt, da sich bisher in der Literatur keine Hinweise auf eine Bindung von HEY1 an den BAF-Komplex finden (3.1). Unter 4.3 wird in der Diskussion auf diese Interaktion eingegangen.

Alle DPF3-Deletionskonstrukte binden an Flag-Baf60c. Dies widerspricht der Erwartung, dass mindestens ein Konstrukt keine Bindung zeigen sollte. Damit ist keine Aussage zu der Frage möglich, mit welcher Domäne DPF3 an dem BAF Chromatin-Remodeling-Komplex bindet. Mögliche Ursachen werden unter 4.2 diskutiert.

Die Reihen 2 und 3 (Inputs) zeigen, dass in allen nukleären Extrakten das TAPtag- und das Flag-Fusionsprotein enthalten war, was die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt. Die z.T. unterschiedlich starke Expression der Proteine ist nicht relevant, da nur eine qualitative Aussage über die Bindung getroffen werden sollte.

3.2 Untersuchung der direkten Bindung von DPF3 an den BAF-Komplex

Der BAF Chromatin-Remodeling-Komplex ist ein Multiproteinkomplex mit ca. 10 Untereinheiten. Um zu ermitteln, an welche der Untereinheiten DPF3 bindet, wurden GST-Pulldown-Assays durchgeführt (2.2.3.5). Es wurden die Untereinheiten Brg1 und Baf60c untersucht, da sie potentielle Bindungspartner darstellen (1.4). Die TAP-Methode ist für diese Fragestellung nicht geeignet, da mit ihr der gesamte BAF-Komplex isoliert wird. Der GST-Pulldown findet unter stringenteren Bedingungen statt, sodass sich einzelne Protein-Protein-Interaktionen besser untersuchen lassen. Bei der Verwendung von Zellextrakten lassen sich indirekte Bindungen jedoch nicht völlig ausschließen, da sie alle zellulären Proteine enthalten. Deswegen sollten zur Bestätigung zusätzlich Pulldowns mit *in vitro* translatierten Proteinen durchgeführt werden.

GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21 prare3 exprimiert (2.2.3.1). Flag-markierte Proteine wurden in HEK293T-Zellen (2.2.3.3) und durch *in vitro* Translation exprimiert (2.2.3.4). Nach dem GST-Pulldown wurde die Bindung von Flag-Proteinen mittels Western Blot nachgewiesen. Folgende Proben wurden untersucht:

GST-Fusionsprotein	Flag-Fusionsprotein	
DPF3b	Brg1	
DPF3b	Baf60c	
HEY1	GATA4	Positivkontrolle
DPF3b	HEY1	Negativkontrolle

Tab. 3.5: Proben für durchgeführte GST-Pulldown-Experimente

Die Positivkontrolle (HEY1 + GATA4) wurde gewählt, da HEY1 an den Transkriptionsfaktor GATA4 bindet und seine Aktivität unterdrückt (Fischer et al., 2005). Als Negativkontrollen wurden die gleichen Proben wie für die TAP-Experimente verwendet (DPF3b + HEY1). Zusätzlich wurde der pGEX-3X-Leervektor (GST) verwendet, um die Bindung der Flag-Fusionsproteine an den 25kDa großen GST-Tag auszuschließen.

3.2.1 Expression von Flag-Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen

Flag-markierte Proteine wurden in HEK293T-Zellen exprimiert. Dafür wurden die entsprechenden Plasmide in die Zellen transfiziert (2.2.1.5). Es wurden Immunfluoreszenz-Färbungen der Zellen durchgeführt, um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen (2.2.3.11).

Transfektion	Transfektionseffizienz
Flag-Brg1	18%
Flag-Baf60c	24%
Flag-GATA4	19%
Flag-HEY1	6%

Tab. 3.6: Effizienz von Transfektionen in HEK293T-Zellen für GST-Pulldown-Assays

Die Effizienz der Transfektionen lag zwischen 6% und 24%. Die Proteinkonzentration der aus den Zellen gewonnenen Extrakte wurde mittels Bradford-Assay bestimmt (2.2.3.10). Für den Pulldown wurden 250µg Proteinextrakt eingesetzt. 2,5µg des Extrakts (1%) wurden bei der anschließenden Analyse mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) als Input aufgetragen (3.2.4). Damit erfolgte eine weitere Kontrolle der Proteinexpression.

3.2.2 *In vitro* Translation von Flag-Fusionsproteinen

Zusätzlich zur zellulären Expression wurden Flag-Fusionsproteine mit dem TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega exprimiert (2.2.3.4). Mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) wurde die Expression überprüft, die Ergebnisse finden sich als unter 3.2.5 (Input-Probe). Dafür wurden 5% der für den Pulldown eingesetzten Proteinmenge auf das Gel geladen. Flag-Brg1 war mit einer Größe von 250kDa zu groß für die *in vitro* Translation und konnte nur in HEK293T-Zellen exprimiert werden.

3.2.3 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21 prare3

GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21 prare3 exprimiert (2.2.3.1). Vor der Induktion mit IPTG und 4h nach der Induktion wurde der Bakterienkultur eine Probe von je 50µl entnommen, die mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) untersucht wurde.

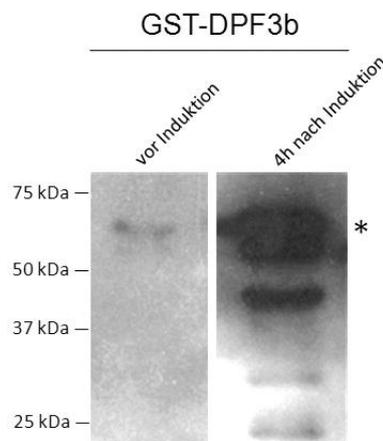


Abb. 3.6: Induktion der Expression von GST-DPF3b. Western Blot mit α -GST und α -rabbit-HRP. Es wurden je 10µl Bakterienkultur eingesetzt. (*) GST-DPF3b hat eine Größe von etwa 60kDa.

Abb. 3.6. zeigt die Induktion der Proteinexpression am Beispiel von GST-DPF3b, das eine Größe von ca. 60kDa hat. Vor der Induktion wird das Protein nur schwach exprimiert. 4h nach der Induktion zeigt sich im Western Blot eine deutlich stärkere Bande. Neben dem vollständigen Fusionsprotein zeigen sich auch mehrere kleinere Produkte. Dabei handelt es sich um unvollständig translatierte oder bereits wieder abgebaute GST-Fusionsproteine. Da der GST-Tag N-terminal an DPF3b fusioniert ist, wird er als Erstes translatiert. Dadurch werden auch verkürzte Fusionsproteine vom spezifischen α -GST-Antikörper erkannt. Die GST-Proteine wurden über eine Glutathionhaltige Sepharose aufgereingt (2.2.3.2) und für den Pulldown eingesetzt. Die Bindung der Proteine an die Sepharose wurde mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot

(2.2.3.9) überprüft, die Ergebnisse finden sich unter 3.2.4 und 3.2.5 als GST-Input. Für den Input wurden je 10µl Sepharose mit gebundenem GST-Protein eingesetzt. Der GST-Tag alleine bindet sehr stark an die Sepharose, deswegen wurde für den Input dieser Kontrolle nur 1µl eingesetzt.

3.2.4 GST-Pulldown mit HEK293T-Proteinextrakten

Der GST-Pulldown wurde wie unter 2.2.3.5 beschrieben durchgeführt, es wurden die in HEK293T-Zellen exprimierten Flag-Fusionsproteine verwendet. Die Bindung von Flag-markierten Proteinen wurde mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) überprüft. Abb. 3.7 fasst die Ergebnisse zusammen.

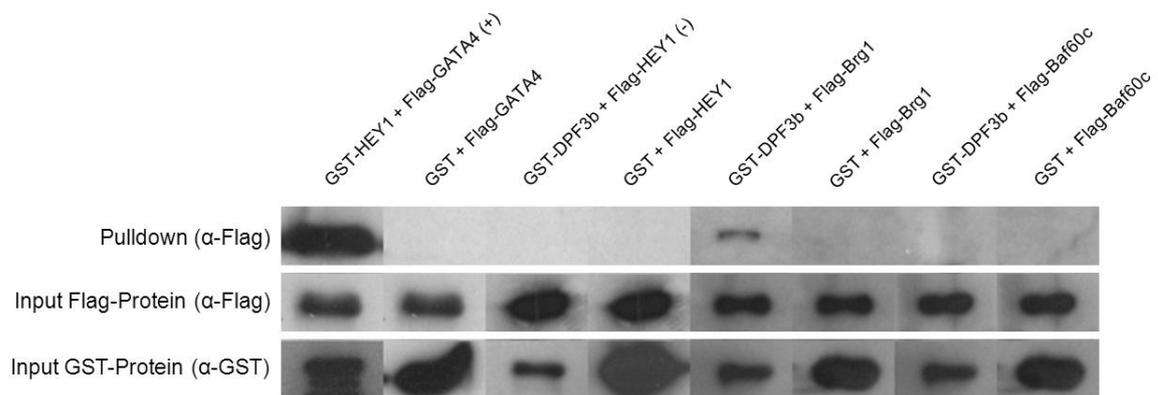


Abb. 3.7: Ergebnisse der GST-Pulldowns mit HEK293T-Extrakten. Für eine bessere Übersicht wurden die Ergebnisse mehrerer Western Blots zusammengestellt, Proteine in einer Reihe haben nicht die gleichen Größen. Zeilen 1 und 2: Western Blot mit α -Flag und α -mouse-HRP. Reihe 3: α -GST und α -rabbit-HRP. (+) Positivkontrolle. (-) Negativkontrolle. Proteingrößen (ca.): GST-HEY1: 62kDa, GST-DPF3: 60kDa, GST: 25kDa, Flag-GATA4: 50kDa, Flag-HEY1: 37kDa, Flag-Brg1: 250kDa, Flag-Baf60c: 60kDa. Erläuterungen siehe Text.

Die Ergebnisse des GST-Pulldowns zeigen, dass GST-DPF3b an Flag-Brg1 bindet. Eine Bindung an Flag-Baf60c konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Wie erwartet, zeigt die Positivkontrolle eine starke Bindung, GST-DPF3b bindet dagegen nicht an Flag-HEY1 (Negativkontrolle). Der GST-Tag allein zeigt keine unspezifische Bindung an eines der Flag-Proteine. Diese Kontrollen zeigen, dass der Assay gut funktioniert hat. Die Inputs der Flag-Proteine sind für alle Proben etwa gleich stark (Abb. 3.7, Zeile 2). Die Inputs der GST-Fusionsproteine variieren in ihrer Stärke, wobei der GST-Tag allein die stärksten Banden zeigt. Da nur eine qualitative Aussage über die Bindung getroffen werden sollte, sind diese Unterschiede jedoch nicht relevant.

3.2.5 GST-Pulldown mit *in vitro* translatierten Flag-Proteinen

Um die Ergebnisse aus 3.2.4 zu bestätigen, wurde der GST-Pulldown mit *in vitro* translatierten Flag-Proteinen durchgeführt. Flag-Brg1 ließ sich aufgrund seiner Größe nicht exprimieren und konnte deswegen nicht in den GST-Pulldown einbezogen werden. Der GST-Pulldown wurde wie unter 2.2.3.5 beschrieben durchgeführt, es wurden die mittels *in vitro* Translation exprimierten Flag-Proteine verwendet. Die Bindung von Flag-markierten Proteinen wurde mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) überprüft. Die Ergebnisse werden in Abb. 3.8 zusammengefasst. Die Pulldowns mit dem GST-Tag alleine werden nicht erneut gezeigt. Unter 3.2.4 wurde bereits demonstriert, dass der Tag nicht unspezifisch an die Flag-Proteine bindet.

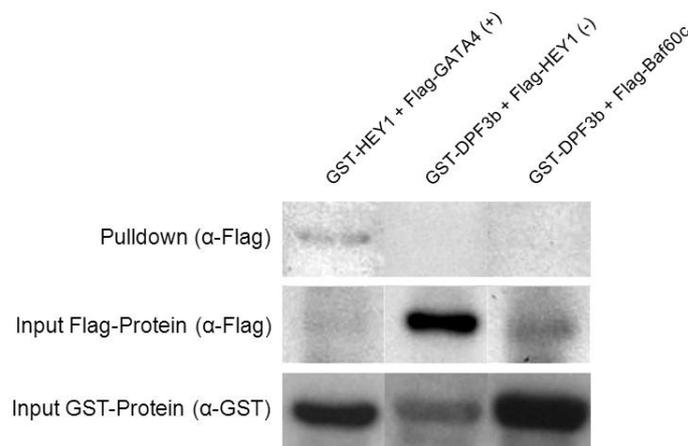


Abb. 3.8: Ergebnisse des GST-Pulldowns mit *in vitro* translatierten Flag-Proteinen. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse mehrerer Western Blots zusammengestellt, Proteine in einer Reihe haben nicht die gleichen Größen. Reihen 1 und 2: Western Blot mit α -Flag und α -mouse-HRP. Reihe 3: α -GST und α -rabbit-HRP. (+) Positivkontrolle. (-) Negativkontrolle. Proteingrößen siehe Abb. 3.7. Erklärungen siehe Text.

Der GST-Pulldown mit *in vitro* translatierten Flag-Fusionsproteinen bestätigt teilweise die Ergebnisse aus 3.2.4. GST-DPF3b zeigt keine Bindung an Flag-Baf60c. Die Bindung von Flag-Brg1 an GST-DPF3b konnte nicht erneut demonstriert werden, da Brg1 zu groß für die *in vitro* Translation war. Die Inputs für Flag-GATA4 und Flag-Baf60c zeigen nur eine niedrige Intensität der Proteine, entsprechend ist bei der Positivkontrolle Flag-GATA4 + GST-HEY1 im Pulldown nur eine schwache Bande erkennbar.

3.3 Analyse von DPF3-Deletionskonstrukten mittels GST-Pulldown

Die Frage, mit welcher Domäne DPF3 an den BAF Chromatin-Remodeling-Komplex bindet, konnte mit der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung nicht geklärt werden (3.1.4). Da die Untereinheit Brg1 als Interaktionspartner von DPF3 identifiziert werden konnte (3.2.4), wurden GST-Pulldown-Assays mit GST-markierten DPF3-Deletionskonstrukten und Flag-Brg1 durchgeführt, um die für die Bindung verantwortliche Domäne zu finden. Abb. 3.9 zeigt alle untersuchten DPF3-Deletionskonstrukte. Es wurden die gleichen Kontrollen wie in 3.2 verwendet. Zusätzlich diente die Probe GST-DPF3b + Flag-Brg1 als Positivkontrolle, da die Bindung des vollständigen DPF3-Proteins an Brg1 bereits gezeigt werden konnte (3.2.4). Flag-Fusionsproteine wurden in HEK293T-Zellen exprimiert (2.2.3.3), GST-Fusionsproteine in *E. coli* BL21 prare3 (2.2.3.1).

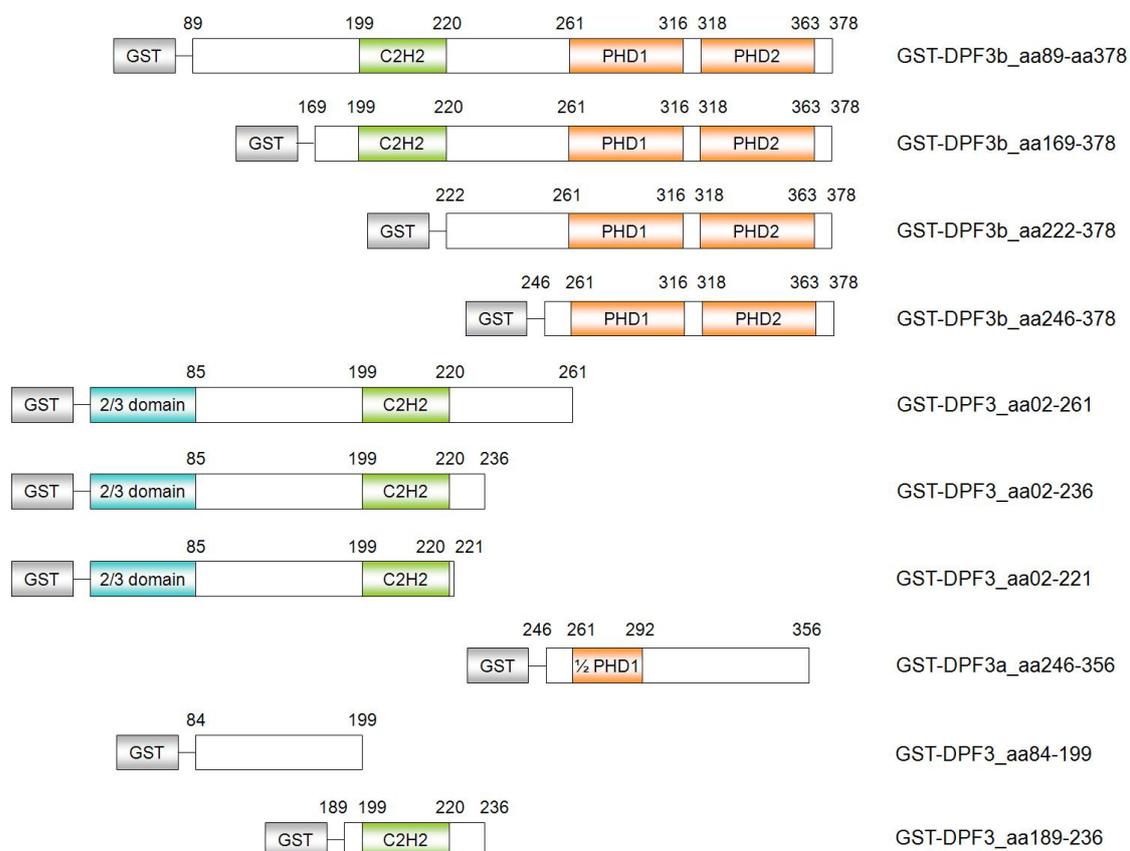


Abb. 3.9: DPF3-Deletionskonstrukte mit N-terminalem GST-Tag. Markiert sind die 2/3-Domäne (blau), der C2H2-Zinkfinger (grün) und die PHD-Finger (orange). Die Nummern stehen für die Anzahl der Aminosäuren. Die Darstellung ist nicht linear.

3.3.1 Klonierungen in den pGEX-3X-Vektor

Da noch nicht alle benötigten Plasmide zur Verfügung standen, wurden folgende Klonierungen in den pGEX-3X-Vektor durchgeführt:

	Template	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
GST-DPF3b_aa89-aa378	TAP-DPF3b	dpf3b_h_xxaa91_bamhi_f	h1_r2_stop_ecori
GST-DPF3_aa02-236	TAP-DPF3b	h1_f2_xxstart_bamhi	dpf3_h_aa236_ecori_r
GST-DPF3_aa02-221	TAP-DPF3b	h1_f2_xxstart_bamhi	dpf3b_h_aa221_stop_ecori_r

Tab. 3.7: Klonierungen in den pGEX-3X-Vektor. Angegeben sind die für die PCR genutzten Templates und Primer (2.1.8).

Die Klonierungen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben durchgeführt. Der leere pGEX-3X-Vektor wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten (2.2.2.5). Es wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (2.2.2.2) und die Vektor-DNA wurde aus dem Gel aufgereinigt (2.2.2.4). Anschließend erfolgte die Dephosphorylierung mit der Antarktischen Phosphatase (2.2.2.9) und anschließend wurde der Vektor für die Ligation eingesetzt (2.2.2.6).

3.3.2 Expression von Flag- und GST-Fusionsproteinen

Flag-Fusionsproteine wurden in HEK293T-Zellen exprimiert. Für den Pulldown wurden die gleichen Zellextrakte wie in 3.2.4 verwendet (Transfektionseffizienzen siehe 3.2.1). GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21 prae3 exprimiert und über den GST-Tag aufgereinigt. Die Expression aller Proteine wurde mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) kontrolliert und findet sich unter 3.3.3 als Input. Für den Flag-Input wurden 2,5µg des Zellextrakts (1%) aufgetragen. Für den GST-Input wurden je 10µl Sepharose mit gebundenem GST-Protein eingesetzt. Da der GST-Tag alleine sehr stark an die Sepharose bindet, wurde für den Input dieser Kontrolle nur 1µl eingesetzt.

3.3.3 GST-Pulldown mit DPF3-Deletionskonstrukten

Der Pulldown wurde wie unter 2.2.3.5 beschrieben durchgeführt. Die Bindung von Flag-markierten Proteinen wurde mittels SDS-PAGE (2.2.3.8) und Western Blot (2.2.3.9) mit einem spezifischen α -Flag-Antikörper überprüft. Abb. 3.10 fasst die Ergebnisse zusammen. Die Pulldowns mit dem GST-Tag alleine werden nicht erneut gezeigt, da bereits demonstriert wurde, dass der Tag nicht unspezifisch an die Flag-Proteine bindet (3.2.4).

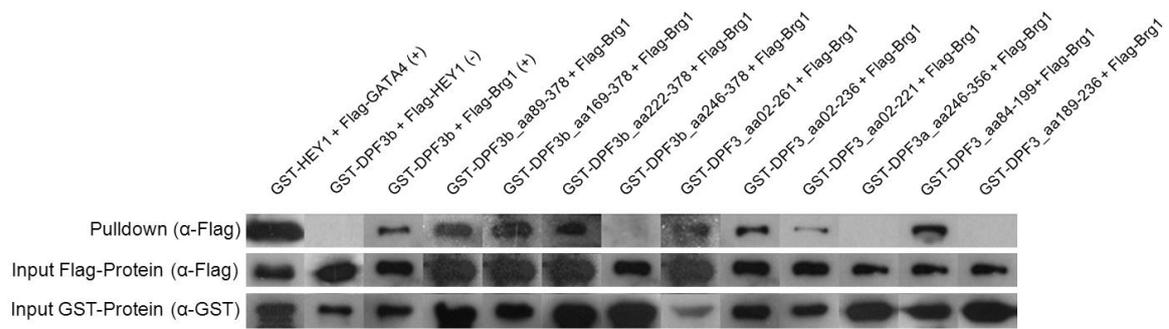


Abb. 3.10: Ergebnisse der GST-Pulldowns mit DPF3-Deletionskonstrukten. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse mehrerer Western Blots zusammengestellt, Proteine in einer Reihe haben nicht die gleichen Größen. Reihen 1 und 2: Western Blot mit α-Flag und α-mouse-HRP. Reihe 3: α-GST und α-rabbit-HRP. (+) Positivkontrolle. (-) Negativkontrolle. Proteingrößen (ca.): GST-DPF3-Deletionskonstrukte: 30-57kDa, weitere siehe Abb. 3.7. Erklärungen siehe Text.

Der GST-Pulldown zeigt, dass die drei Deletionskonstrukte GST-DPF3b_aa246-378, GST-DPF3a_246-356 und GST-DPF3_aa189-236 nicht an Flag-Brg1 binden. Alle anderen Konstrukte zeigen eine deutliche Bindung (Abb. 3.10, erste Zeile). Die Banden der Flag- und GST-Inputs sind bis auf einige Ausnahmen (z.B. GST-DPF3_aa02-236) in etwa gleich stark. Wieder sollte nur eine qualitative Aussage getroffen werden, sodass die Abweichungen nicht relevant sind. In Abb. 3.11 sind die Bindungseigenschaften ausgewählter Konstrukte zusammengefasst, die für das Verständnis der Brg1-Bindung wichtig sind.

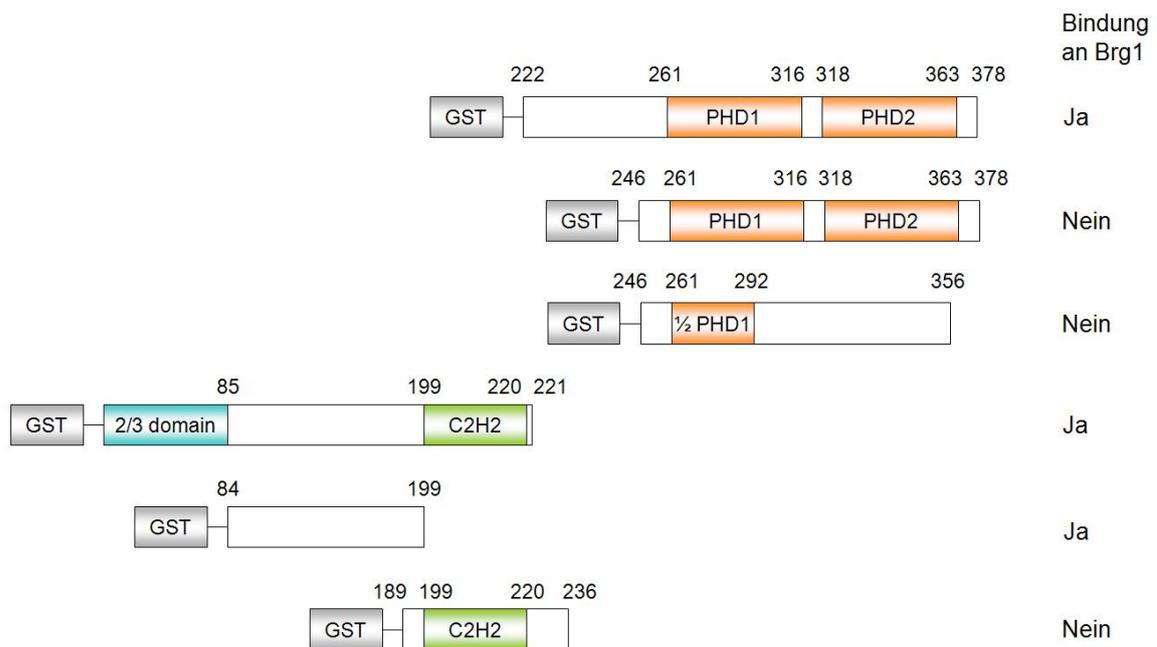


Abb. 3.11: Bindungseigenschaften der wichtigsten DPF3-Deletionskonstrukte. Markiert sind die 2/3-Domäne (blau), der C2H2-Zinkfinger (grün) und die PHD-Finger (orange). Die Nummern stehen für die Anzahl der Aminosäuren. Die Darstellung ist nicht linear.

Aus den Abb. 3.10 und 3.11 lässt sich schließen, dass für die Bindung an Brg1 zwei Bereiche von DPF3 von Bedeutung sein müssen, die jeweils alleine die Interaktion mit

Brg1 vermitteln können. Ob die Bereiche allein schwächer binden als gemeinsam, ist anhand der Ergebnisse nicht erkennbar, da es sich nur um eine qualitative Betrachtung handelt. Ein Bindungsbereich umfasst die Aminosäuren 236-246. Dies wird dadurch gezeigt, dass GST-DPF3b_aa222-378 an Brg1 binden kann, die Konstrukte GST-DPF3b_aa246-378, GST-DPF3a_246-356 und GST-DPF3_aa189-236 jedoch nicht. Damit kann der für die Bindung nötige Bereich auf 10 Aminosäuren eingegrenzt werden. Die Bindung der Aminosäuren 236-246 an Brg1 konnte noch nicht direkt gezeigt werden, da im Rahmen dieser Diplomarbeit die Klonierung dieses sehr kleinen Fragments nicht gelungen ist.

Auch GST-DPF3_02-221 kann an Brg1 binden, was auf eine weitere, N-terminale Bindung hinweist. Die genauere Analyse mit kleineren Konstrukten zeigt, dass die Aminosäuren 84-189 die Bindung an Brg1 vermitteln. Der C2H2-Zinkfinger kann dagegen nicht binden. Aus den Ergebnissen lässt sich auch schließen, dass DPF3a und DPF3b das gleiche Bindungsverhalten zeigen müssen, da die für die Proteine spezifischen C-Termini nicht die Bindung an Brg1 vermitteln. In Abb. 3.12 werden die beiden für die Bindung verantwortlichen Bereiche am Beispiel von DPF3b gezeigt.

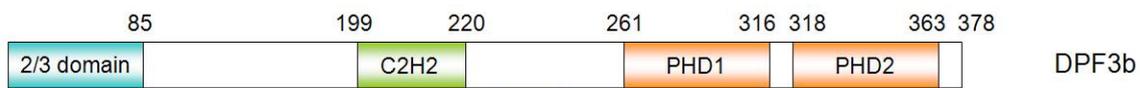


Abb. 3.12: Proteinbereiche, die die Bindung von DPF3 an Brg1 vermitteln, am Beispiel von DPF3b. Die Bereiche sind rot unterstrichen. Weiterhin sind die 2/3-Domäne (blau), der C2H2-Zinkfinger (grün) und die PHD-Finger (orange) markiert. Die Nummern stehen für die Anzahl der Aminosäuren. Die Darstellung ist nicht linear.

3.4 Sequenzanalyse

Die für die Bindung an Brg1 identifizierten Aminosäure-Bereiche von DPF3 liegen außerhalb der bereits annotierten Domänen. Daher wurde die Konservierung der Bereiche analysiert und es wurde nach möglichen Motiven gesucht, um die Bindebereiche besser zu charakterisieren.

3.4.1 Konservierung der Brg1-Bindebereiche

Die Konservierung zwischen unterschiedlichen Spezies, Genen oder Proteinen gibt eine Aussage darüber, wie identisch Aminosäuren oder Nukleotide verschiedener Sequenzen sind. Aus einer starken Konservierung lässt sich z.B. auf eine wichtige Funktion der entsprechenden Sequenz schließen. Mutationen könnten hier zu einem Funktionsverlust führen und stehen damit unter einem hohen Selektionsdruck.

Mit Hilfe von ClustalW2 (verfügbar auf <http://www.ebi.ac.uk/>) (Thompson et al., 2002) wurde ein multiples Alignment der DPF3-Proteinsequenzen von Mensch, Maus, Huhn und Zebrafisch erstellt (Abb. 3.13). Der erste Bereich, der mittels GST-Pulldown für die Brg1-Bindung identifiziert werden konnte, umfasst die Aminosäuren 84-189. Die Konservierung zwischen den vier Spezies ist geringer als in den bereits annotierten Domänen (z.B. 2/3-Domäne). Es gibt aber einzelne kurze Sequenzen, die stark konserviert sind. Dazu zählen die Aminosäuren 117-127, die eine Interaktionsdomäne für nukleäre Rezeptoren (NID) enthalten. Weitere stark konservierte Sequenzen umfassen die Aminosäuren 141-151 und 166-171. Der zweite Bereich, der für eine Bindung von DPF3 an Brg1 verantwortlich ist, umfasst die Aminosäuren 236-246. Von diesen zehn Aminosäuren sind nur drei in allen betrachteten Spezies identisch, zwei weitere sind funktional konserviert. Funktional konservierte Aminosäuren haben gleiche Eigenschaften, so sind z.B. Arginin (R) und Lysin (K) basisch. Wenn sie gegeneinander ausgetauscht werden, kann die Funktion eines Proteins eher erhalten bleiben, als wenn z.B. eine basische gegen eine saure Aminosäure ausgetauscht wird.

Auch von den verschiedenen Mitgliedern der d4-Proteinfamilie (1.3) wurde ein multiples Alignment erstellt (Abb. 3.14). Die annotierten Domänen sind zwischen DPF1, DPF2 und DPF3 stark konserviert. Ab der zweiten Hälfte des ersten PHD-Fingers zeigt das Alignment nur noch eine schwach Konservierung. Dies liegt daran, dass DPF3a einen verkürzten C-Terminus hat. Die Aminosäuren 84-189 sind zwischen den Mitgliedern der Proteinfamilie schwächer konserviert als zwischen den Spezies (Abb. 3.13). In diesem Bereich zeigt nur die NID eine starke Konservierung. Von den Aminosäuren 236-246 ist lediglich eine Aminosäure zwischen den Proteinen identisch, vier weitere sind funktional konserviert.

Die für die Bindung von DPF3 an Brg1 identifizierten Aminosäure-Abschnitte sind damit eher schwach konserviert, wobei die Konservierung zwischen verschiedenen Spezies stärker ist als zwischen den Mitgliedern der d4-Proteinfamilie.

	<u>2/3 Domain</u>	
Mensch	MATVIHNPALKALGDQFYKEAIEHCRSYNSRLCAERSVRLPFLDSQTGVAQNNCYIWMEKR	60
Maus	MATVIHNPALKALGDQFYKEAIEHCRSYNSRLCAERSVRLPFLDSQTGVAQNNCYIWMEKR	60
Huhn	MATVIHNPALKALGDQFYKEAIEHCRSYNSRLCAERSVRLPFLDSQTGVAQNNCYIWMEKR	60
Zebrafärbling	MATVIQNPLKALGDQFYREAIEHCRSYNARLCAERSVRMPFLDSQTGVAQNNCYIWMEKR	60
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Mensch	HRGPGLAPGQLYTYPARCWRKKRRLHPPEDPKLRLEIKP-----	100
Maus	HRGPGLAPGQLYTYPARCWRKKRRLHPPEDPKLRLEIKP-----	100
Huhn	HRGPGLAPGQLYTYPARCWRKKRRLHPPEDSRLKLEIKPETSHPGKTELITETEFITK	120
Zebrafärbling	HRGPGMAAGQMYTYPARCWRKKRRLHPTPLDPQLRLCELRL-----	100
	*****:*	
	<u>NID</u>	
Mensch	-----EVELPLKKGFTSESTTLEALLRGEVGEKKVD--AREEESIQEI	142
Maus	-----EVELPLKKGFTSESTTLEALLRGEVGEKKVD--AREEESIQEI	142
Huhn	MSVDLRRFLSCKLYTSEVDLPLKKGFTSESTTLEALLRGEVGEKKMD--TKEEDPIQEI	178
Zebrafärbling	-----EAELEMAKREAPQTEATALEALLRGGDILDKRNNNAKEEETLLEI	144
	::* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:	
Mensch	QRVLENDENVEEGNEEDLEEDI PKRKNRTRGR-----ARGSAGGRRRHDA	189
Maus	QRVLENDENVEEGNEEDLEEDV PKRKNRTRGR-----ARGSAGGRRRHDA	189
Huhn	QRVLENDENADEVNEEDLEEDI PKRKNRPRGRPKPTWKKIFQKNARGSGGRRRNDAA	238
Zebrafärbling	QRVLEADENGDFHDDDEFVDT PKRKHNRNKR-----GRGS--GRRRTEAV	189
	***** ** : :*:*: * * ***: * * : ** . ** * ** : *	
	<u>C2H2</u>	
Mensch	SQEDHDKPYVCD-----ICGKRYKNRPGLSYHYAHTHLASEEGDEAQDQET	235
Maus	SQEDHDKPYVCD-----ICGKRYKNRPGLSYHYAHTHLASEEGDEAQDQET	235
Huhn	SQDDHDKPYVCD-----ICGKRYKNRPGLSYHYAHTHLASEEGDEAREQET	284
Zebrafärbling	ANDDQDKPYVCDNRYKQKHNSKTADSVCGKRYKNRPGLSYHYAHTHLAEEEGEEREI	249
	:*:*:***** :*****:*****:*****:*****:*****:*****	
	<u>PHD1</u>	
Mensch	RSPPNHRNENHRPQKGPDPGTVIPNNYCDFCLGGSNMNKKSGRPEELVSCADCGRSGHPTC	295
Maus	RSPPNHRNENHRPQKGPDPGTVIPNNYCDFCLGGSNMNKKSGRPEELVSCADCGRSGHPTC	295
Huhn	RSSPVHRNENHKPQKGPDGVIIPNNYCDFCLGGSNMNKKSGRPEELVSCDCGRSGHPTC	344
Zebrafärbling	PQSPPVHHENHKPQKAPDGSIIIPNDYCDFCLGDSGSNRKTGQAEELVSCSDCGRSGHPSC	309
	..* :*:*:*:*: * * :*:*:*: * * :*:*:*: * * :*:*:*: * * :*:*:*: * *	
	<u>PHD2</u>	
Mensch	LQFTLNMTAEAVKTYKWQCIECKSCILCGTSENDDQLLFCDDCDRGYHMYCLNPPVAEPPE	355
Maus	LQFTLNMTAEAVKTYKWQCIECKSCILCGTSENDDQLLFCDDCDRGYHMYCLNPPVAEPPE	355
Huhn	LQFTTNMTAEAVKTYQWQCIECKSCSLCGTSENDDQLLFCDDCDRGYHMYCLNPPVFEPPE	404
Zebrafärbling	LQFTDNMMQAVRITYQWQCIECKSCSLCGTSENDDQLLFCDDCDRGYHMYCLKPPMTQPPE	369
	**** ** :*:*:*:***** *****:*****:*****:*****:*****:*****	
Mensch	GSWSCHLCWELLKEKASAFGCQA	378
Maus	GSWSCHLCWELLKEKASAFGCQA	378
Huhn	GSWSCHLCRELLRERASAFGFQA	427
Zebrafärbling	GSWSCHLCQNLLKDKASGVEDP-	391
	***** :*:*:*:*. .	

Abb. 3.13: Multiples Alignment von DPF3 aus Mensch (AAX20019), Maus (CAX15346), Huhn (NP_989970) und Zebrafärbling (NP_001104639). Markiert sind die 2/3-Domäne, die Interaktionsdomäne für nukleäre Rezeptoren (NID), der C2H2-Zinkfinger und die PHD-Finger. Gelb unterlegt sind die Bereiche, die die Bindung an Brg1 vermitteln. * identische Aminosäuren, : funktional konservierte Aminosäuren, . funktional semi-konservierte Aminosäuren.

	2/3 Domain	
DPF3a	-----MATVIHNP-----LKALGDQFYKEAIEHCRSYNSRLCAE	34
DPF3b	-----MATVIHNP-----LKALGDQFYKEAIEHCRSYNSRLCAE	34
DPF1	QSGRRRPGWARARRQRRPGPEAAQPSGWPPPPFRTRSSREDFYREAIEHCRSYNARLCAE	60
DPF2	-----MAAVVENV-----VKLLGEQYYKDAMEQCHNYNARLCAE	34
	* . . : : : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
DPF3a	RSVRLPFLDSQTGVAQNNCYIWMKRRHRGPGGLAPGQLYTYPARCWRKKRRLHPPEDPKLR	94
DPF3b	RSVRLPFLDSQTGVAQNNCYIWMKRRHRGPGGLAPGQLYTYPARCWRKKRRLHPPEDPKLR	94
DPF1	RSRLPFLDSQTGVAQNNCYIWMKTRHRGPGGLAPGQIYTYPARCWRKKRLNILEDPRLR	120
DPF2	RSVRLPFLDSQTGVAQSNNCYIWMKRRHRGPGGLASGQLYSYPARWRKKRRAHPPEDPRLS	94
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	NID	
DPF3a	LLEIKPEVELPLKKGFTS-ESTTLEALLRGEVGEKK--VDAREEE-----SIQEIQR-	144
DPF3b	LLEIKPEVELPLKKGFTS-ESTTLEALLRGEVGEKK--VDAREEE-----SIQEIQR-	144
DPF1	PCEYKIDCEAPLKKEGGLP-EGVPLEALLCAETGEKK--IELKEE-----TIMDCQKQ	171
DPF2	FPSIKPDTDQTLKKEGLISQDGSSEALLRTPLEKRGAPDPRVDDDSLGEFFVTNSRAR	154
	. * : : * : * : * * : * : * : * : * : * : * : *	
DPF3a	-VLENDENVEEGNEEEDLEEDI PKRKNRTRGRAHGSAGGRRRHDAASQEDHDKPYVCDIC	203
DPF3b	-VLENDENVEEGNEEEDLEEDI PKRKNRTRGRARGSAGGRRRHDAASQEDHDKPYVCDIC	203
DPF1	QLLEFPFDL----EVEDLEDDIPKRKNRAKGA YGIGGLRKRQDTASLEDRDKPYVCDIC	227
DPF2	KRILEPDDFLDDLEDEYEDTPKRRGKGSKGGVGSARKKLDASILEDRDKPYVCDIC	214
	: . . . : * * * : * : * : * : * . . * : * : * : * : * : * : * : *	
	C2H2	
DPF3a	GKRYKNRPGLSYHYAHTHLASEEGDEAQDQETRSPPNHRNENHR-----	247
DPF3b	GKRYKNRPGLSYHYAHTHLASEEGDEAQDQETRSPPNHRNENHR-----	247
DPF1	GKRYKNRPGLSYHYTHTHLAE EGEEN--AERHALPFHRKNNHKQFYKELAWVPEAQRKH	285
DPF2	GKRYKNRPGLSYHYAHSHLAE EGEDKEDSQPPTPVSQRSEEQK-----	258
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	PHD1	
DPF3a	-PQKGPDGTVIPNNYCDFCLGGSNMNKKSGRPEELVSCADCGRSAHLG-----GEGR	298
DPF3b	-PQKGPDGTVIPNNYCDFCLGGSNMNKKSGRPEELVSCADCGRSGHPTCLQFTLNMTEAV	306
DPF1	TAKKAPDGTVIPNGYCDFCLGGS---KKTGCPEDLISCADCGRSGHPSCLQFTVNMATAV	342
DPF2	-SKKGPDLALPNNYCDFCLGDSKINKKTGQPEELVSCSDCGRSGHPSCLQFTVPMMAAV	317
	. : * : * * . : * : * : * : * : * * * * * * * * * * * * *	
	PHD2	
DPF3a	KEKEAAAAARTTEDLFGSTSESSTF----RGFDEDDLEEPS--CRGRRSGRGSPTA	351
DPF3b	KTYKWQCIECKSCILCGTSENDDQLLFCDDCDRQYHMYCLNPPVAEPPPEGWSCHLWEL	366
DPF1	RTYRWQCIECKSCSLCGTSENDDQLLFCDDCDRQYHMYCLSPMAEPPPEGWSCHLCLRH	402
DPF2	KTYRWQCIECKCCNICGTSENDDQLLFCDDCDRQYHMYCLTPMSEPPEGWSCHLCLDL	377
	: . . . : * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
DPF3a	DKKGC----- 357	
DPF3b	LKEKASAFGCQA-- 378	
DPF1	LKEKASAYITLT-- 414	
DPF2	LKEKASIYQNQNSS 391	
	* : . .	

Abb. 3.14: Multiples Alignment der humanen d4-Proteinfamilie mit DPF3a (AAH60801), DPF3b (AAX20019), DPF1 (AAH21191) und DPF2 (Q92785). Markiert sind die 2/3-Domäne, die Interaktionsdomäne für nukleäre Rezeptoren (NID), der C2H2-Zinkfinger und die PHD-Finger. Gelb unterlegt sind die Bereiche, die die Bindung an Brg1 vermitteln. * identische Aminosäuren, : funktional konservierte Aminosäuren, . funktional semi-konservierte Aminosäuren.

Um zu überprüfen, ob die beiden Aminosäure-Abschnitte in anderen Proteinen konserviert sind, wurde eine BLAST-Suche (zugänglich auf <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1990) durchgeführt. Dafür wurde der Algorithmus blastp (Protein-Protein BLAST) und die Datenbank der nicht-redundanten Proteinsequenzen (non-redundant protein sequences, nr) verwendet. Die Suche wurde nicht auf bestimmte Organismen eingeschränkt. Es ließen sich keine signifikanten Übereinstimmungen mit Proteinen außerhalb der d4-Proteinfamilie finden. Dies zeigt, dass die für die Interaktion mit Brg1 identifizierten Proteinabschnitte nicht konserviert in anderen Proteinen vorkommen.

Die Signifikanz von BLAST-Ergebnissen lässt sich anhand des E-Wertes abschätzen. Dieser Wert gibt an, wie oft man die gefundene Übereinstimmung mit einer zufälligen Sequenz erhalten würde, die die gleiche Länge wie die verwendete Suchanfrage hat. Da kurze Sequenzen mehr zufällige Übereinstimmungen liefern als lange, lässt sich kein genereller Grenzwert für den E-Wert festlegen. Als Orientierung kann der bei der BLAST-Suche standardmäßig als Grenzwert eingestellte E-Wert von 10 dienen.

3.4.2 Suche nach konservierten Domänen und Motiven

Die mittels GST-Pulldown für die Brg1-Bindung identifizierten Aminosäure-Bereiche wurden auf konservierte Domänen und Motive untersucht. Hierfür wurde der ELM-Server verwendet (verfügbar unter <http://elm.eu.org/>), der funktionale Stellen in eukaryotischen Proteinen sucht (Puntervoll et al., 2003).

Abb. 3.15 zeigt die vorhergesagten Domänen und Motive für das gesamte DPF3b-Protein. In der ersten Zeile sind die Übereinstimmungen mit der SMART- und der Pfam-Datenbank dargestellt. Diese Datenbanken enthalten Sammlungen von annotierten Domänen und Proteinfamilien. Der C2H2-Zinkfinger und die PHD-Finger wurden korrekt vorhergesagt (dunkelgrün), darüber hinaus finden sich zwei Regionen von geringer Komplexität im Bereich der Aminosäuren 145-189 (pink). Die zweite Zeile zeigt die Vorhersage eines globulären Bereichs (Aminosäuren 72-171, hellgrün). Ab Zeile 4 werden die Vorhersagen für verschiedene Motive dargestellt (blau). Darunter befinden sich z.B. Erkennungssequenzen für spaltende, bindende und modifizierende Proteine oder Domänen.

Ein Beispiel für ein Bindemotiv stellt die Prolin-reiche Erkennungssequenz für die SH3-Domäne dar, die innerhalb des ersten Brg1-Bindebereichs zweimal vorkommt (Zeile 19, roter Kreis). SH3 ist eine kleine Proteindomäne, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Ein weiteres Beispiel ist das Bindemotiv für die WW4-Domäne, das im zweiten Brg1-Bindebereich vorhergesagt wurde (Zeile 25, roter Kreis). Die kleine WW4-Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus.

Auch die Aminosäure-Sequenz von BRG1 wurde mit Hilfe des ELM-Servers untersucht. Für das Protein wurde jedoch keine der Domänen vorhergesagt, deren Bindemotive für DPF3b gefunden wurden.

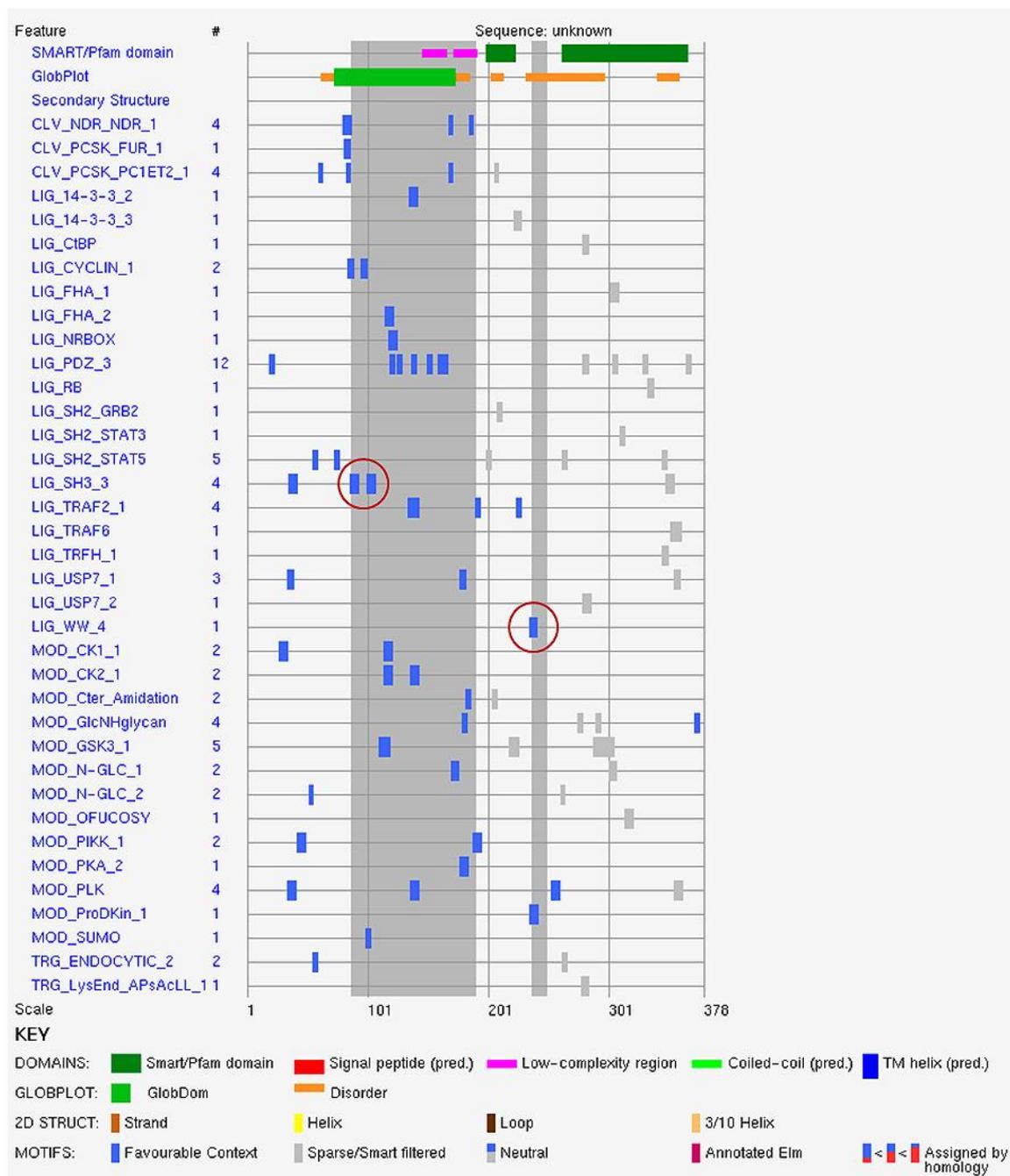


Abb. 3.15: Ergebnisse der Motiv- und Domänen-Suche für DPF3b. Die Markierungen sind in der Legende (Key) erklärt. Zusätzlich wurden die Brg1-Bindebereiche dunkelgrau hinterlegt und die Lage der SH3- und WW4-Bindemotive hervorgehoben (rote Kreise). Erläuterungen siehe Text. Modifizierte Darstellung der Ergebnisse des ELM-Servers.

Motive für die Bindung von Proteindomänen bestehen oft nur aus wenigen Aminosäuren. So hat das Motiv für die Bindung der WW4-Domäne das Muster ...[ST]P. Dies bedeutet, dass nach drei beliebigen Aminosäuren ein Serin oder Threonin und danach ein Prolin folgen (Kato et al., 2002). Um zu überprüfen, ob die beiden Brg1-Bindebereiche möglicherweise ein gemeinsames Motiv besitzen, das nicht vorhergesagt wurde, wurden die beiden Sequenzen in einem Alignment miteinander verglichen. Wie in Abb. 3.16 zu erkennen ist, besitzen die beiden Sequenzen einen kleinen Bereich, in dem drei

Aminosäuren konserviert sind. Dabei handelt es sich um ein Arginin (R), dem eine bzw. zwei nicht-konservierte Aminosäuren folgen. Dann schließen sich zwei Proline (P) an.

```

DPF3_aa236-246      R-SPPNH-----RNEN----- 10
DPF3_aa84-189      RLHPPEDPKLRLLEIKPEVELPLKKGFTSESTLEALLRGEVVEKKVDAREEESIQEIQ 60
                    *  **:.                :.:.
DPF3_aa236-246      -----
DPF3_aa84-189      RVLENDENVVEEGNEEDLEEDI PKRKNRTRGRARGSAGGRRRHDA 106

```

Abb. 3.16: Alignment der beiden Brg1-Bindereiche von DPF3

4 Diskussion

4.1 Untersuchung der direkten Bindung von DPF3 an den BAF-Komplex

Der epigenetische Transkriptionsfaktor DPF3 ist eine gewebespezifische Untereinheit des BAF Chromatin-Remodeling-Komplexes und kann den Komplex zu modifizierten Histonen rekrutieren (Lange et al., 2008). Bisher war ungeklärt, an welche Untereinheit des Komplexes DPF3 bindet. Um diese Frage zu beantworten, wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit GST-Pulldownassays durchgeführt. Dabei wurde gezielt die Bindung von DPF3 an Brg1 und Baf60c untersucht. Diese Untereinheiten des BAF-Komplexes stellen potentielle Interaktionspartner dar, da sie im Komplex für viele Interaktionen mit anderen Proteinen verantwortlich sind (1.2.2.1). Baf60c ist darüber hinaus eine gewebespezifische Untereinheit und wird ähnlich wie DPF3 im Herzen und in den Somiten exprimiert (Lickert et al., 2004). Für DPF3 wurde das humane Protein verwendet, während für Brg1 und Baf60c nur die murinen Proteine zur Verfügung standen. Da die Aminosäuresequenzen zwischen Mensch und Maus sehr stark konserviert sind (8.2), kann man aber von einem identischen Bindungsverhalten ausgehen.

Für die Pulldown-Versuche wurden GST-markierte Fusionsproteine in *E. coli* BL21 prae3 exprimiert. Sowohl die Induktion der Proteinexpression als auch die Aufreinigung der Fusionsproteine über eine Glutathion-haltige Matrix wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Es wurde eine ausreichend große Ausbeute an GST-Fusionsproteinen für den Pulldown erzielt. Flag-markierte Fusionsproteine wurden in HEK293T-Zellen oder durch *in vitro* Translation exprimiert. Um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen der HEK293T-Zellen durchgeführt. Die ermittelten Transfektionseffizienzen lagen zwischen 6 und 24%. Diese Werte stellen nur eine grobe Orientierung dar, weil die Zellen auf den für die Färbung verwendeten Glasplättchen oft etwas schlechter wuchsen als auf der normalen Oberfläche der Zellkulturplatte. Es lässt sich also auch nicht sicher sagen, ob sich diese Zellen bei der Transfektion anders verhalten haben als die Zellen in der restlichen Platte. Zusätzlich wurde die Expression der Flag-Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Die zelluläre Expression lieferte ausreichende Mengen an Fusionsproteinen, während die *in vitro* Translation für einige Proteine nur geringe Ausbeuten ergab (3.2.5). Flag-Brg1 ließ sich aufgrund seiner Größe von 250kDa nicht mittels *in vitro* Translation herstellen.

Die GST-Pulldown-Versuche mit Extrakten aus HEK293T-Zellen zeigten eine Bindung von GST-markiertem DPF3b an Flag-markiertes Brg1. GST-DPF3b interagiert jedoch nicht mit Flag-Baf60c. Alle Kontrollen lieferten die erwarteten Ergebnisse, was auf ein gutes Funktionieren des Assays schließen lässt. Da sich bei Pulldown-Experimenten mit zellulären Extrakten eine indirekte Interaktion von Proteinen nicht völlig ausschließen lässt, sollten diese Ergebnisse mit *in vitro* translatierten Flag-Fusionsproteinen bestätigt werden. Flag-Brg1 ließ sich jedoch aufgrund seiner Größe nicht mittels *in vitro* Translation exprimieren. Im Pulldown mit *in vitro* translatiertem Flag-Protein ließ sich damit nur bestätigen, dass GST-DPF3 nicht an Flag-Baf60c bindet. Trotzdem lässt sich annehmen, dass Brg1 der direkte Interaktionspartner von DPF3 ist. Die Tatsache, dass der GST-Pulldown mit zellulären Extrakten keine Bindung von Flag-Baf60c an GST-DPF3b gezeigt hat, lässt auf sehr stringente Pulldown-Bedingungen schließen. Damit ist eine indirekte Interaktion sehr unwahrscheinlich. Anderenfalls hätten sowohl Flag-Brg1 als auch Flag-Baf60c eine Bindung an GST-DPF3b gezeigt, da sie Bestandteile des gleichen Proteinkomplexes sind. Um eine *in vitro* Translation von Flag-Brg1 möglich zu machen, könnten kleinere Deletionskonstrukte genutzt werden. Mit diesen ließe sich zusätzlich ermitteln, welche BRG1-Domäne für die Bindung an DPF3 benötigt wird.

BAF Chromatin-Remodeling-Komplexe enthalten entweder BRG1 oder BRM als katalytische ATPase-Untereinheit. Eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren, HATs und HDACs können an den Komplex binden und damit die Aktivität von Zielgenen aktivieren oder unterdrücken (Kadam and Emerson, 2003; Peterson and Logie, 2000). BRG1 selbst kann direkte Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren eingehen. Es bindet z.B. an Zinkfingerproteine wie Sp1, EKLF und GATA1 (Kadam and Emerson, 2003). Ein weiteres Beispiel für die Bindung von Transkriptionsfaktoren ist die Interaktion von Brg1 mit NeuroD und Ngnr-1, die mittels Co-Immunopräzipitation in HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte. Die Transkriptionsfaktoren rekrutieren damit möglicherweise den Remodeling-Komplex zu ihren Zielgenen, sodass die Chromatinstruktur aufgelockert und die Transkription aktiviert werden kann. Andererseits könnte die Aktivität des Chromatin-Remodeling-Komplexes aber auch eine Voraussetzung für die Bindung der Transkriptionsfaktoren an ihren Zielsequenzen darstellen (Seo et al., 2005). Diese Beispiele zeigen, dass BRG1 ein Bindungspartner für viele Transkriptionsfaktoren ist. Mit dem epigenetischen Transkriptionsfaktor DPF3 konnte in dieser Arbeit ein weiteres Protein identifiziert werden, das eine direkte Interaktion mit BRG1 eingeht.

4.2 Charakterisierung der BRG1/DPF3-Bindung

DPF3 besitzt neben den PHD-Fingern, die an acetylierte und methylierte Histone binden können, einen C2H2-Zinkfinger und eine 2/3-Domäne, die nur in Mitgliedern der d4-Familie vorkommt (Lange et al., 2008). Alle diese Domänen zeigen eine starke Konservierung sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch innerhalb der d4-Proteinfamilie (3.4.1). Die Funktion des C2H2-Zinkfingers und der 2/3-Domäne für das Protein sind noch ungeklärt. C2H2-Zinkfinger kommen in vielen Proteinen vor und wurden ursprünglich als DNA-Bindedomänen betrachtet. Sie können aber auch Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Es wurden sogar Zinkfinger entdeckt, die beide Funktionen ausüben können (Brayer and Segal, 2008). In Gel-Shift-Assays konnte bisher keine Bindung von DPF3 an DNA gezeigt werden (Sperling, unveröffentlicht). Die Funktion der 2/3-Domäne ist noch nicht bekannt. Sie wird aus den Exons zwei und drei gebildet und wurde bisher nur aufgrund ihrer hohen Konservierung annotiert. Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte die Frage untersucht werden, welche der DPF3-Domänen für die Bindung an den BAF Chromatin-Remodeling-Komplex verantwortlich ist. Dafür wurden TAP-Experimente und GST-Pulldown-Assays mit DPF3-Deletionskonstrukten durchgeführt.

Für die TAP-Experimente mussten zunächst fünf Klonierungen in den N-TAP-Vektor durchgeführt werden (3.1.1). Anschließend wurden TAPtag- und Flag-markierte Fusionsproteine gemeinsam in HEK293T-Zellen exprimiert. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen ermittelt. Die Effizienz lag zwischen 13 und 30%, wobei sie für das Flag-Protein oft etwas höher war als für das TAPtag-markierte Protein (3.1.2). Aus den Zellen wurden nukleäre Extrakte gewonnen, in denen die Expression der Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft wurde. Alle Fusionsproteine wurden ausreichend stark exprimiert. Fünf TAPtag-markierte DPF3-Deletionskonstrukte wurden aufgereinigt und auf ihre Bindung an den BAF-Komplex untersucht. Alle verkürzten Proteine zeigten eine Bindung an den Komplex (3.1.4). Dies widerspricht der Erwartung, dass mindestens ein Deletionskonstrukt nicht binden sollte. Damit zeigte DPF3 immer eine Bindung an den BAF-Komplex, unabhängig davon welche Domäne entfernt wurde. Möglicherweise liegt der Grund dafür in der verwendeten Methode, mit der auch indirekte Interaktionen gezeigt werden. Sowohl DPF3a als auch DPF3b zeigen eine Bindung an den BAF-Komplex (Lange et al., 2008), außerdem gibt es erste Hinweise auf eine Dimerbildung der Proteine (Sperling, unveröffentlicht). Ein verkürztes Protein, dem die Bindedomäne für den Komplex fehlt, könnte also über eine andere Domäne immer noch ein Dimer mit einem intakten, endogen in der Zelle exprimierten DPF3-Protein bilden. Bindet dieses dann an den BAF-Komplex, ist die Probe im TAP-Experiment positiv, obwohl dem TAPtag-Fusionsprotein

die entscheidende Domäne fehlt (Abb. 4.1). Dass die Methode grundsätzlich gut funktioniert, zeigten die Positivkontrolle TAP-DPF3b + Flag-Baf60c und die beiden Negativkontrollen TAP-DPF3b + Flag-HEY1 und TAP-EGFP + Flag-Baf60c. Die ebenfalls als Negativkontrolle gewählte Probe TAP-HEY1 + Flag-Baf60c zeigte eine deutliche Bindung. Auf diese Interaktion wird unter 4.3 gesondert eingegangen.

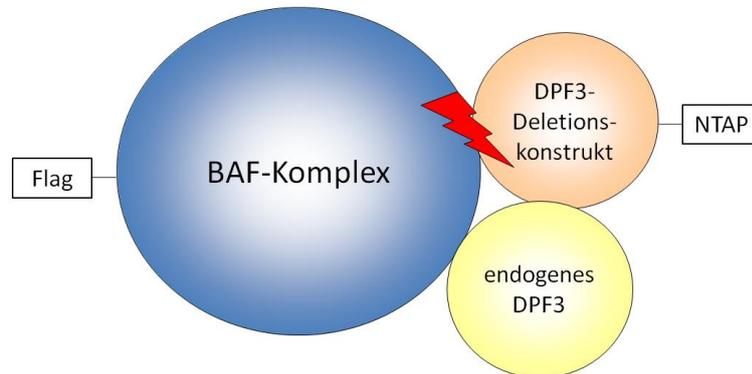


Abb. 4.1: Hypothese zur TAP-Methode. Obwohl dem DPF3-Deletionskonstrukt (rosa) die für die Bindung an den BAF-Komplex (blau) benötigte Domäne fehlt, kann eine Bindung noch über endogenes DPF3 (gelb) stattfinden, mit dem möglicherweise Homo- oder Heterodimere gebildet werden. Der rote Pfeil stellt die gestörte direkte Bindung an den Komplex dar.

GST-Pulldown-Assays stellen eine stringenterere Methode als die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung dar und wurden deshalb für die Analyse von GST-markierten DPF3-Deletionskonstrukten verwendet. Dafür wurden drei Klonierungen in den pGEX-3X-Vektor durchgeführt (3.3.1). GST- und Flag-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21 prare3 bzw. in HEK293T-Zellen exprimiert (3.3.2), was mittels Western Blot und Immunfluoreszenzfärbungen überprüft wurde. Der Pulldown zeigte, dass die drei Deletionskonstrukte GST-DPF3b_aa246-378, GST-DPF3a_246-356 und GST-DPF3_aa189-236 nicht an Flag-Brg1 binden können. Dies deutet darauf hin, dass keine der bereits annotierten Domänen die Bindung an Brg1 vermittelt. Stattdessen sind zwei Aminosäurebereiche, die vor und hinter dem C2H2-Zinkfinger liegen, für die Interaktion verantwortlich. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren 84-189 und 236-246 (3.3.3). Jeder der Bereiche kann offenbar allein an Brg1 binden, aus den Ergebnissen lässt sich aber nicht schließen, ob beide Bereiche zusammen eine stärkere Interaktion ermöglichen. Beide Bereiche sind nicht sehr stark konserviert, wobei die Konservierung zwischen verschiedenen Spezies etwas größer ist als zwischen den Mitgliedern der d4-Proteinfamilie. Eine BLAST-Suche ergab keine Konservierung in anderen Proteinen (3.4.1).

Die Bindung verschiedener Proteine an BRG1 ist bereits charakterisiert worden. Kadam und Emerson haben z.B. die Interaktion der Zinkfingerproteine Sp1, EKLF und GATA1 mit BRG1 untersucht. Sp1 und EKLF enthalten je drei C2H2-Zinkfinger, von denen der

erste und dritte die DNA-Bindung vermitteln. GATA1 besitzt dagegen zwei Zinkfinger innerhalb eines C4-Motivs, von denen der C-Finger, nicht aber der N-Finger, an DNA bindet. Die Bindung von BRG1 erfolgt an den gleichen Zinkfingern wie die DNA-Bindung. Auf der Seite von BRG1 ist ein N-terminaler Bereich von 282 Aminosäuren für die Interaktion verantwortlich, der sich deutlich vom ansonsten homologen BRM unterscheidet. Dadurch wird eine Unterscheidung von BRG1- und BRM-enthaltenden BAF-Komplexen möglich, die jeweils unterschiedliche Transkriptionsfaktoren binden können (Kadam and Emerson, 2003).

Auch der Östrogen-Rezeptor bindet an BRG1. Dabei interagiert nicht der DNA-bindende Zinkfinger, sondern die C-terminale AF-2-Domäne des Rezeptors mit dem N-Terminus von BRG1. AF-2 enthält die Liganden-Bindestelle und die Aktivierungsfunktion des Östrogen-Rezeptors. Die Bindung an BRG1 wird durch die Zugabe des Liganden Östrogen verstärkt (Ichinose et al., 1997; Kuiper et al., 1996).

Die Bindung der Acetyltransferase CBP wird von einer für BRG1 einzigartigen Prolinreichen Region vermittelt, die die Aminosäuren 70-340 umfasst. Auf Seiten von CBP ist die C/H3-Region für die Interaktion nötig. Diese enthält einen Zinkfinger vom ZZ-Typ und einen TAZ-Zinkfinger (Naidu et al., 2009).

Für viele andere Proteine, die mit BRG1 interagieren, ist die Bindung noch nicht genau charakterisiert. Darüber hinaus ist bei vielen mit dem BAF-Komplex assoziierten Proteinen sogar noch unklar, an welche Untereinheit sie binden. Die hier aufgeführten Beispiele zeigen keine offensichtlichen Gemeinsamkeiten mit der Bindung von DPF3 an BRG1, sodass sich keine Schlussfolgerungen ziehen lassen.

Mit Hilfe des ELM-Servers wurde DPF3b auf konservierte Domänen und Motive untersucht (3.4.2). Die C2H2- und PHD-Domänen wurden korrekt vorhergesagt. Die 2/3-Domäne wurde nicht gefunden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Domäne bisher nur bei der d4-Proteinfamilie bekannt ist und noch nicht in den SMART- und Pfam-Datenbanken erfasst ist. Im ersten BRG1-Bindebereich, der die Aminosäuren 84-189 umfasst, wurden mehrere Bindemotive für verschiedene Domänen vorhergesagt. Auch im zweiten Bereich (Aminosäuren 236-246) wurde ein Bindemotiv gefunden. Die Untersuchung von BRG1 zeigte jedoch keine der Domänen, für die im DPF3-Protein Bindemotive vorhergesagt wurden (Abb. 4.1).

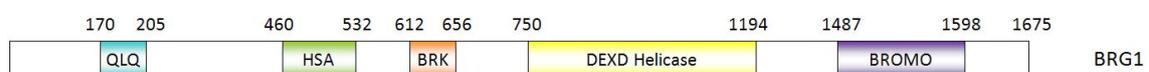


Abb. 4.2: Domänenstruktur von BRG1 nach Vorhersage mit dem ELM-Server. Markiert sind die QLQ-, die HSA-, die BRK-, die Helicase- und die Bromodomäne. Zur Vereinfachung wurden die DEXD-Helicase (aa750-942) und ihre C-terminale Domäne (aa1110-1194) zusammengefasst. Die Zahlen stehen für die Nummern der Aminosäuren. Die Darstellung ist nicht linear.

Die QLQ-Domäne wurde bisher im N-Terminus von SWI2/SNF2-Proteinen wie z.B. BRG1 und BRM und in der GRF-Familie von *Arabidopsis thaliana* gefunden (Kim et al., 2003). Sie wird durch die konservierten Aminosäuren Glutamin (Q) – Leucin (L) – Glutamin (Q) gekennzeichnet und ist an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. So konnte für die Hefe *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass die QLQ-Domäne des BRG1-Homologs SWI2 die Bindung an die Untereinheit SNF11 vermittelt. An welchen Aminosäuren von SNF11 die Interaktion stattfindet, wurde jedoch noch nicht geklärt (Treich et al., 1995). Die QLQ-Domäne liegt in einem Prolin-reichen Bereich, der die Aminosäuren 70-340 umfasst (Naidu et al., 2009).

Die Helicase/SANT-associated (HSA)-Domäne kommt in Helicasen und anderen DNA-bindenden Proteinen von Eukaryoten vor und wurde bei einer systematischen Suche nach unbekanntem Protein-Domänen gefunden (Doerks et al., 2002). Die HSA-Domäne von BRG1 vermittelt die Bindung an den C-Terminus von BAF250a, was für die Glucocorticoid-Rezeptor-abhängige Aktivierung des Chromatin-Remodeling-Komplexes nötig ist. (Trotter et al., 2008).

Eine weitere in BRG1 gefundene Domäne ist die BRM and KIS (BRK)-Domäne. Sie wurde bisher nur in Metazoen identifiziert und kommt in Verbindung mit Chromodomänen und DEAD/DEAH-Box-Helicasen vor. Ihre Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Für das SNF2-ähnliche Protein CHD8 konnte allerdings eine Interaktion seines BRK-enthaltenen C-Terminus mit der Zinkfinger-Region des CTCF-Proteins gezeigt werden. CTCF bindet an Grenzelemente zwischen verschiedenen Chromatinregionen und ist besonders wichtig für die Blockierung von Enhancern (Ishihara et al., 2006).

Die DEXD-Domäne ist gut charakterisiert und kommt in DEAD- und DEAH-Box-Helicasen vor. Helicasen entwinden Nukleinsäuren und sind an einer ganzen Reihe von zellulären Prozessen beteiligt. Dazu zählen z.B. Transkription, Translation und das Splicing von mRNAs (Fuller-Pace, 2006; Cordin et al., 2006). Am C-Terminus von BRG1 befindet sich eine Bromodomäne. Diese Domäne kommt in einer Reihe von eukaryotischen DNA-Bindeproteinen vor und kann an acetylierte Histone und andere Proteine binden (Zeng and Zhou, 2002). Die Bromodomäne von BRG1 hat die Funktion, den BAF-Komplex an Promotoren mit modifizierten Histonen zu rekrutieren (Hassan et al., 2002).

Bei den drei N-terminalen Domänen von BRG1 (QLQ, HSA und BRK) handelt es sich im Gegensatz zur Helicase- und zur Bromodomäne um wenig charakterisierte Domänen. Meist konnte nur an einzelnen Beispielen eine Rolle in der Protein-Protein-Interaktion gezeigt werden. Es wurden keine allgemein gültigen Bindemotive oder Interaktionsdomänen ermittelt, an die die Domänen binden. Damit ist es auch noch nicht möglich, eine Bindung nur aufgrund der Aminosäuresequenz von DPF3 vorherzusagen. Die Bindung von BRG1 an DPF3 könnte von einer oder mehreren BRG1-Domänen

vermittelt werden. Wenn nur eine Domäne für die Interaktion verantwortlich wäre, sollte sich in den beiden für die Bindung ermittelten DPF3-Bereichen (Aminosäuren 84-189 und 236-246) ein gemeinsames Motiv finden. Das Alignment der beiden Sequenzen zeigt ein konserviertes Arginin, dem sich ein bzw. zwei nicht-konservierte Aminosäuren und zwei Proline anschließen (3.4.2). Dies könnte ein möglicher Anhaltspunkt für ein gemeinsames Motiv sein, das aber noch experimentell untersucht werden müsste. Bindemotive bestehen oft nur aus sehr wenigen Aminosäuren und oft können bestimmte Positionen von mehreren verschiedenen Aminosäuren eingenommen werden. Die Untersuchung der Sequenz allein lässt also keine klare Schlussfolgerung zu. Die Bindung der beiden Bereiche von DPF3 könnte auch durch verschiedene Domänen von BRG1 erfolgen, in diesem Fall könnten völlig verschiedene Motive für die Interaktion nötig sein. Die Konservierung der BRG1-Bindebereiche von DPF3 ist verglichen mit den bereits annotierten Domänen relativ gering. Dies weist darauf hin, dass für die Bindung tatsächlich nur kleine Motive von wenigen konservierten Aminosäuren verantwortlich sind.

Beide im GST-Pulldown ermittelten BRG1-Bindebereiche von DPF3 können die Interaktion jeweils alleine vermitteln. Solch eine Redundanz findet sich auch in anderen Proteinen. So besitzt z.B. das Transmembran-Protein Dystroglycan zwei C-terminale Bindemotive für die WW-Domäne von Dystrophin. Ist jeweils nur ein Motiv mutiert, kann Dystroglycan noch an Dystrophin binden. Erst wenn beide Motive mutiert sind, ist das Protein nicht mehr funktional. Die Redundanz ist möglicherweise ein Schutz vor Mutationen in dem essentiellen Dystrophin-Glycoprotein-Komplex. Die Motive könnten aber auch spezifische Funktionen ausüben, z.B. in verschiedenen Geweben und/oder Entwicklungsstadien (Yatsenko et al., 2009). Diese beiden Möglichkeiten könnten auch bei der Bindung von DPF3 an BRG1 eine wichtige Rolle spielen.

Für die genaue Charakterisierung der Bindung von DPF3 an BRG1 sind noch viele weitere experimentelle Untersuchungen nötig. Als Erstes sollte die Bindung der DPF3-Aminosäuren 236-246 an Brg1 direkt gezeigt werden. Dies ist im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, da das sehr kleine Fragment noch nicht kloniert werden konnte. Der größere der beiden Bindebereiche (Aminosäuren 84-189) sollte mit kleineren Deletionskonstrukten weiter eingeschränkt werden. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse mit einer weiteren Methode bestätigt werden. Dafür wäre z.B. das Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H) geeignet. Mit dieser Methode können Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* in der Hefe nachgewiesen werden. Dabei wird ein Protein mit der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 fusioniert, das andere Protein mit der Aktivierungsdomäne von GAL4. Nur wenn die beiden Proteine aneinander binden, wird der Transkriptionsfaktor funktionell rekonstituiert, sodass ein unter der Kontrolle des

GAL4-Promotors stehendes Reporter gen exprimiert werden kann (Fields and Song, 1989).

Wenn beide Bindebereiche auf wenige Aminosäuren eingeschränkt und bestätigt sind, könnten Mutationsanalysen dabei helfen, ein mögliches konserviertes Bindemotiv zu ermitteln. Dafür könnten während der Klonierung bei der PCR gezielte Mutationen eingeführt werden, die zur Veränderung einzelner Aminosäuren führen. Für die Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren wäre eine hoch auflösende Tertiärstruktur des DPF3-Proteins hilfreich. Diese würde es möglich machen, die Lage einzelner Aminosäuren zu erkennen. Dabei kommen z.B. Aminosäuren, die auf der Oberfläche des Proteins liegen, eher für eine Protein-Protein-Interaktion in Frage als innen liegende. Bisher existiert keine Kristallstruktur von DPF3. Da auch die Struktur der anderen Mitglieder der d4-Proteinfamilie noch nicht aufgeklärt ist, lässt sich DPF3 nicht vollständig über die Homologie modellieren. Lediglich die Struktur bekannter Domänen (C2H2-Zinkfinger, PHD-Finger) lässt sich über den Vergleich mit anderen Proteinen vorhersagen.

Eine weitere Frage besteht darin, welche Domäne von BRG1 für die Bindung an DPF3 verantwortlich ist, und ob möglicherweise mehrere Domänen an der Interaktion beteiligt sind. Um dies zu beantworten, könnten BRG1-Deletionskonstrukte generiert werden, die dann auf ihre Bindung an DPF3 untersucht werden. Diese kürzeren Konstrukte könnten auch über die *in vitro* Translation exprimiert werden, um eine indirekte Bindung auszuschließen.

4.3 Assoziation von HEY1 mit dem BAF-Komplex

Für die TAP-Experimente mit DPF3-Deletionskonstrukten wurden die Proteine TAP-HEY1 + Flag-Baf60c als Negativkontrolle gewählt. Der Transkriptionsfaktor HEY1 gehört zur Hairy and Enhancer of Split-Related (HESR)-Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren, die vorwiegend als Repressoren wirken. Er ist ein Ziel des Notch-Signalweges und spielt u.a. eine Rolle in der Embryonalentwicklung des Herzens (Fischer et al., 2005). In der Literatur finden sich bisher keine Hinweise auf eine Assoziation des Proteins mit dem BAF-Komplex. Auch in TAP-MS-Experimenten mit DPF3 und Baf60c als Zielproteinen wurde HEY1 nicht als Interaktionsprotein identifiziert (Lange et al., 2008). Es wurde also erwartet, dass die beiden Kombinationen TAP-DPF3 + Flag-HEY1 und TAP-HEY1 + Flag-Baf60c keine Interaktion zeigen.

Die Probe TAP-HEY1 + Flag-Baf60c zeigte im Experiment entgegen der Erwartung eine deutliche Bindung. Dies weist darauf hin, dass HEY1 mit dem BAF Chromatin-Remodeling-Komplex assoziiert ist. Möglicherweise verläuft diese Interaktion indirekt über den Transkriptionsfaktor GATA4. Dieser ist ein Mitglied der GATA-Familie von

Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die in Promotoren das Bindemotiv GATA erkennen. GATA4 spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und in der Funktion und Differenzierung des Herzens. Darüber hinaus ist der Transkriptionsfaktor an der Entstehung von Herz-Hypertrophie beteiligt (Pikkarainen et al., 2004). HEY1 kann an GATA4 binden und damit dessen Transkriptionsaktivität inhibieren (Fischer et al., 2005). Für HEY2, das ebenfalls an GATA4 binden kann, konnte gezeigt werden, dass die Interaktion nicht die DNA-Bindeeigenschaften von GATA4 beeinflusst. Möglicherweise werden aber Ko-Repressoren wie z.B. HDACs rekrutiert (Kathiriya et al., 2004). GATA4 selbst bindet an BAF60c, eine Untereinheit des BAF Chromatin-Remodeling-Komplexes. Dies führt zu einer Rekrutierung des Komplexes und damit wahrscheinlich zu einer Aktivierung von herzspezifischen Genen (Lickert et al., 2004). Wenn die beobachtete Interaktion von HEY1 mit dem BAF-Komplex indirekt durch GATA4 vermittelt wird, müssten die beiden beschriebenen Bindungen (HEY1-GATA4 und GATA4-BAF60c) gleichzeitig stattfinden. Dies würde man zunächst nicht erwarten, da die Bindung von HEY1 an GATA4 eine inhibitorische Wirkung hat, während die Interaktion von GATA4 mit BAF60c aktivierend für die Transkription ist. Eventuell besteht aber auch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den beiden Bindungen, welches je nach Gewebe, Entwicklungsstadium und möglichen weiteren Faktoren beeinflusst wird und über die Aktivierung oder Inhibierung der Transkription von Zielgenen entscheidet.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass HEY1 direkt an den BAF-Komplex bindet. HEY1 ist ein Transkriptionsrepressor und inhibiert z.B. die Expression der Gene *GATA4* und *GATA6* (Fischer et al., 2005). Die Rekrutierung des BAF-Komplexes müsste in diesem Fall ebenfalls eine inhibitorische Wirkung haben. Obwohl der Komplex hauptsächlich als Transkriptionsaktivator gilt, gibt es auch Hinweise auf eine Rolle als Repressor (Sudarsanam and Winston, 2000; Hassan et al., 2001). In der Hefe *S. cerevisiae* inhibiert der SWI/SNF-Komplex z.B. die Expression des Gens *ser3* (Martens and Winston, 2002).

Eine weitere Frage ist, warum die Interaktion von HEY1 mit dem BAF-Komplex in den TAP-Experimenten gezeigt werden konnte, aber nicht mit TAP-MS identifiziert wurde. Für diesen Versuch wurde TAP-Baf60c in HEK293T-Zellen exprimiert und über den Tag aufgereinigt. Der erhaltene Proteinkomplex wurde mittels Massenspektrometrie analysiert, um interagierende Proteine zu identifizieren. Bei allen Interaktionspartnern handelt es sich um endogen in der Zelle vorhandene Proteine (Lange et al., 2008). Für die in dieser Arbeit durchgeführten TAP-Experimente wurden dagegen TAP-HEY1 und Flag-Baf60c in HEK293T-Zellen exprimiert und der Flag-Tag wurde nach der Aufreinigung gezielt im Western Blot nachgewiesen. Möglicherweise handelt es sich bei der Bindung von HEY1 an den BAF-Komplex um eine relativ schwache Interaktion oder sie tritt nur in bestimmten Zellzuständen auf. Eine Überexpression der beiden Proteine könnte dann dazu führen, dass die Bindung sich leichter nachweisen lässt.

Um die Assoziation von HEY1 an den BAF-Komplex weiter zu charakterisieren, sollte zunächst untersucht werden, ob es sich um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt. Dafür könnten z.B. GST-Pulldown-Assays oder das Yeast-Two-Hybrid-System eingesetzt werden. Bei einer direkten Interaktion sollte geklärt werden, an welche Untereinheit des Komplexes HEY1 bindet. Wenn es sich um eine indirekte Bindung handelt, muss untersucht werden ob diese über GATA4 oder möglicherweise über ein anderes Protein vermittelt wird. Ähnlich wie für die Bindung von DPF3 an BRG1 könnten in einem nächsten Schritt die Domänen oder Motive ermittelt werden, die für die Interaktion entscheidend sind. Von großem Interesse wären außerdem die Zielgene, die von HEY1 und dem BAF-Komplex reguliert werden. Um diese zu finden, könnten z.B. Chromatin-Immunopräzipitations (ChIP)-Experimente durchgeführt werden. Bei dieser Technik wird die DNA mit den an sie gebundenen Proteinen quervernetzt und anschließend in Stücke von wenigen hundert Basenpaaren zerteilt. Dann folgt eine Immunopräzipitation mit einem spezifischen Antikörper. Dadurch werden die DNA-Stücke angereichert, an die das untersuchte Protein gebunden hat (Orlando, 2000). Die Analyse der DNA kann z.B. mit einem Microarray (ChIP-chip) oder mittels Sequenzierung (ChIP-seq) erfolgen. DNA-Sequenzen, die sowohl bei der Präzipitation von HEY1 als auch von Komponenten des BAF-Komplexes angereichert werden, stellen damit wahrscheinliche Ziele einer gemeinsamen Regulation dar.

5 Zusammenfassung

Chromatin-Remodeling-Komplexe und Histonmodifikationen können einen großen Einfluss auf die Genregulation und damit z.B. auf die Funktion und Entwicklung des Herzens haben. Beide steuern die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren und andere Enzyme, indem die Stabilität von Histon-DNA-Interaktionen beeinflusst wird. Die Rekrutierung von Chromatin-Remodeling-Komplexen wird stark von Histon-Acetylierungen beeinflusst, die von Bromodomänen erkannt werden. Der epigenetische Transkriptionsfaktor DPF3 enthält die ersten bekannten PHD-Finger, die neben methylierten auch acetylierte Histone binden. DPF3 spielt eine wichtige Rolle in der Herz- und Muskelentwicklung und konnte außerdem als Interaktionspartner des BAF Chromatin-Remodeling-Komplexes identifiziert werden. DPF3 rekrutiert den Komplex vermutlich zu spezifischen Histonmodifikationen.

In dieser Arbeit sollte die Interaktion von DPF3 mit dem BAF Chromatin-Remodeling-Komplex charakterisiert werden. Mit Hilfe von GST-Pulldown-Assays konnte eine Bindung von DPF3 an BRG1, die katalytische Untereinheit des Komplexes, gezeigt werden. DPF3 bindet dagegen nicht an die Herz- und Muskel-spezifische Untereinheit BAF60c. Um die Domäne zu bestimmen, welche die Bindung an BRG1 vermittelt, wurden DPF3-Deletionskonstrukte analysiert. Zunächst wurde dafür die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung angewandt, die sich jedoch als ungeeignet erwies. Alle Deletionskonstrukte zeigten eine Bindung an den BAF-Komplex, was sich möglicherweise auf eine indirekte Bindung zurückführen lässt, die durch Dimerisierung mit endogenem DPF3 vermittelt wird. Die Untersuchung von DPF3-Deletionskonstrukten mittels GST-Pulldown zeigte, dass zwei Bereiche die Bindung an BRG1 vermitteln. Diese liegen außerhalb der bereits annotierten Domänen des Proteins vor und hinter dem C2H2-Zinkfinger. Sie umfassen die Aminosäuren 84-189 und 236-246 und können jeweils alleine an BRG1 binden. Beide Bereiche sind weniger stark konserviert als die annotierten Domänen. Sie wiesen in einer BLAST-Suche keine Konservierung in anderen Proteinen außerhalb der d4-Familie auf, zu der DPF3 gehört. Die Untersuchung der DPF3-Sequenz mit Hilfe des ELM-Servers zeigte, dass beide Bereiche konservierte Bindemotive für verschiedene Proteindomänen enthalten, von denen jedoch keine im BRG1-Protein vorkommt. Das Alignment der beiden BRG1-Bindbereiche zeigte ein mögliches gemeinsames Motiv von drei konservierten Aminosäuren, das aber noch experimentell bestätigt werden müsste. Ebenso sollte die für die Interaktion mit DPF3 verantwortliche Domäne von BRG1 ermittelt werden, um die Bindung der beiden Proteine weiter zu charakterisieren.

Neben der Untersuchung der DPF3-BRG1-Bindung wurde eine bisher noch nicht beschriebene Proteininteraktion entdeckt. Der als Kontrolle für die TAP-Experimente

verwendete Transkriptionsfaktor HEY1 zeigte eine Bindung an den BAF-Komplex. Diese Interaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht eingehender untersucht. Sie könnte von dem Transkriptionsfaktor GATA4 vermittelt sein oder eine direkte Bindung darstellen.

6 Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid (Aminosäure)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BAF	BRG1/hBRM-associated factors
bp	Basenpaar(e)
BLAST	basic local alignment search tool (Suchmaschine für lokale Alignments)
BRG1	Brahma-related gene 1
BRM	Brahma
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
CBP	Calmodulin-Bindepeptid
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Cm	Chloramphenicol
CoIP	Co-Immunopräzipitation
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cdNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
DPF3	d4, zink and double PHD fingers, family 3
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein (verbessertes grün fluoreszierendes Protein)
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ELM	eukaryotic linear motif (eukaryotische lineare Motive)
E-Wert	erwarteter Wert
FBS	fetal bovine serum (fetales Kälberserum)
GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase

HEK	human embryonic kidney (humane embryonale Niere)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HEY1	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	lysogeny broth (Lysogenie-Nährmedium)
LDS	Lithium-Dodecylsulfat
LSM	Laserscanning-Mikroskop
MPI-MG	Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MS	Massenspektrometrie
NID	nuclear receptor interaction domain
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NP-40	Nonidet P-40 IGEPAL
N-Terminus	Amino-Terminus
OD ₂₆₀	optische Dichte, gemessen bei 260nm
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen bei 600nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEI	Polyethylenimin
Pfam	protein families database (Datenbank für Proteinfamilien)
PHD	plant homeodomain
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SMART	simple modular architecture research tool (Suchmaschine für modulare Architekturen)
SWI/SNF	mating type switch/sucrose non fermenting
TAP	tandem affinity purification (Tandem-Affinitäts-Aufreinigung)
<i>T. aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA (Puffer)
TCA	trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)

TE	Tris-EDTA (Puffer)
Temed	Tetramethylethyldiamin
TEV	tobacco etch virus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Vol	Volumen
WB	Western Blot
Y2H	yeast two hybrid (Hefe-Zwei-Hybrid-System)
ZnAc	Zinkacetat

7 Referenzen

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Backs, J. and Olson, E.N. (2006). Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ. Res.* 98, 15–24.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407–412.
- Bhaumik, S.R., Smith, E. and Shilatifard, A. (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1008–1016.
- Bienz, M. (2006). The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem. Sci.* 31, 35–40.
- Boer, H.A. de, Comstock, L.J. and Vasser, M. (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 21–25.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–254.
- Brayer, K.J. and Segal, D.J. (2008). Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains. *Cell Biochem. Biophys.* 50, 111–131.
- Chestkov, A.V., Baka, I.D., Kost, M.V., Georgiev, G.P. and Buchman, V.L. (1996). The d4 gene family in the human genome. *Genomics* 36, 174–177.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K. and Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17–37.
- Doerks, T., Copley, R.R., Schultz, J., Ponting, C.P. and Bork, P. (2002). Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome Res.* 12, 47–56.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G.3., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J.F., Qin, X., Muzny, D.M. and Ayele, M., et al. (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *Journal of bacteriology* 190, 2597–2606.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.
- Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245–246.
- Fingerman, I.M., Du, H.-N. and Briggs, S.D. (2008). Controlling histone methylation via trans-histone pathways. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 3, 237–242.

- Fischer, A., Klattig, J., Kneitz, B., Diez, H., Maier, M., Holtmann, B., Englert, C. and Gessler, M. (2005). Hey basic helix-loop-helix transcription factors are repressors of GATA4 and GATA6 and restrict expression of the GATA target gene ANF in fetal hearts. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8960–8970.
- Fuller-Pace, F.V. (2006). DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 34, 4206–4215.
- Gabig, T.G., Mantel, P.L., Rosli, R. and Crean, C.D. (1994). Requiem: a novel zinc finger gene essential for apoptosis in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 269, 29515–29519.
- Gangaraju, V.K. and Bartholomew, B. (2007). Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutation research* 618, 3–17.
- Gingras, A.C. (2003). Mammalian TAP-tagging technique - General protocols collection.
- Gingras, A.C., Aebersold, R. and Raught, B. (2005). Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. *The Journal of physiology* 563, 11–21.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 59–74.
- Greagg, M.A., Fogg, M.J., Panayotou, G., Evans, S.J., Connolly, B.A. and Pearl, L.H. (1999). A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-strand uracil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9045–9050.
- Hassan, A.H., Neely, K.E., Vignali, M., Reese, J.C. and Workman, J.L. (2001). Promoter targeting of chromatin-modifying complexes. *Front. Biosci.* 6, D1054–64.
- Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J. and Workman, J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111, 369–379.
- Hennig, W. (2002). *Genetik* (Springer-Verlag).
- Heyer, W.-D., Li, X., Rolfsmeier, M. and Zhang, X.-P. (2006). Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res.* 34, 4115–4125.
- Hopp, T.P.e.a. (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology*, Vol. 6, pp. 1204–1210.
- Hoyal, C.R., Kammerer, S., Roth, R.B., Reneland, R., Marnellos, G., Kiechle, M., Schwarz-Boeger, U., Griffiths, L.R., Ebner, F. and Rehbock, J., et al. (2005). Genetic polymorphisms in DPF3 associated with risk of breast cancer and lymph node metastases. *Journal of carcinogenesis* 4, 13.
- Huber, L.A. (2003). Is proteomics heading in the wrong direction? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 74–80.
- Ichinose, H., Garnier, J.M., Chambon, P. and Losson, R. (1997). Ligand-dependent interaction between the estrogen receptor and the human homologues of SWI2/SNF2. *Gene* 188, 95–100.
- Ishihara, K., Oshimura, M. and Nakao, M. (2006). CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Mol. Cell* 23, 733–742.

- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Kadam, S. and Emerson, B.M. (2003). Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell* 11, 377–389.
- Kathiriya, I.S., King, I.N., Murakami, M., Nakagawa, M., Astle, J.M., Gardner, K.A., Gerard, R.D., Olson, E.N., Srivastava, D. and Nakagawa, O. (2004). Hairy-related transcription factors inhibit GATA-dependent cardiac gene expression through a signal-responsive mechanism. *J. Biol. Chem.* 279, 54937–54943.
- Kato, Y., Ito, M., Kawai, K., Nagata, K. and Tanokura, M. (2002). Determinants of ligand specificity in groups I and IV WW domains as studied by surface plasmon resonance and model building. *J. Biol. Chem.* 277, 10173–10177.
- Kaynak, B., Heydebreck, A. von, Mebus, S., Seelow, D., Hennig, S., Vogel, J., Sperling, H.P., Pregla, R., Alexi-Meskishvili, V. and Hetzer, R., et al. (2003). Genome-wide array analysis of normal and malformed human hearts. *Circulation* 107, 2467–2474.
- Kim, J.H., Choi, D. and Kende, H. (2003). The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. *Plant J.* 36, 94–104.
- Kornberg, R.D. (1977). Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 931–954.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Krogan, N.J., Keogh, M.-C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A. and Canadien, V., et al. (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol. Cell* 12, 1565–1576.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5925–5930.
- LabLife (2009). Vector Database. heruntergeladen am 6.10.2009. <https://www.lablife.org/ct?a=listvecinfo>.
- Lange, M., Kaynak, B., Forster, U.B., Tonjes, M., Fischer, J.J., Grimm, C., Schlesinger, J., Just, S., Dunkel, I. and Krueger, T., et al. (2008). Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes & development* 22, 2370–2384.
- Längst, G., Bonte, E.J., Corona, D.F. and Becker, P.B. (1999). Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell* 97, 843–852.
- Larsen, W.J. (1997). *Human Embryology, Chapter 7* (Churchill Livingstone).
- Lebkowski, J.S., Clancy, S. and Calos, M.P. (1985). Simian virus 40 replication in adenovirus-transformed human cells antagonizes gene expression. *Nature* 317, 169–171.
- Lessard, J., Wu, J.I., Ranish, J.A., Wan, M., Winslow, M.M., Staahl, B.T., Wu, H., Aebersold, R., Graef, I.A. and Crabtree, G.R. (2007). An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* 55, 201–215.

- Lickert, H., Takeuchi, J.K., Both, I. von, Walls, J.R., McAuliffe, F., Lee Adamson, S., Mark Henkelman, R., Wrana, J.L., Rossant, J. and Bruneau, B.G. (2004). Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature* 432, 107–112.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Lyon, M.F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372–373.
- Martens, J.A. and Winston, F. (2002). Evidence that Swi/Snf directly represses transcription in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* 16, 2231–2236.
- Mellor, J. (2006). It takes a PHD to read the histone code. *Cell* 126, 22–24.
- Mohrmann, L. and Verrijzer, C.P. (2005). Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1681, 59–73.
- Mujtaba, S., Zeng, L. and Zhou, M.-M. (2007). Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* 26, 5521–5527.
- Naidu, S.R., Love, I.M., Imbalzano, A.N., Grossman, S.R. and Androphy, E.J. (2009). The SWI/SNF chromatin remodeling subunit BRG1 is a critical regulator of p53 necessary for proliferation of malignant cells. *Oncogene* 28, 2492–2501.
- Naya, F.J., Black, B.L., Wu, H., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Hill, J.A. and Olson, E.N. (2002). Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nat. Med.* 8, 1303–1309.
- Ninkina, N.N., Mertsalov, I.B., Kulikova, D.A., Alimova-Kost, M.V., Simonova, O.B., Korochkin, L.I., Kiselev, S.L. and Buchman, V.L. (2001). *Cerd4*, third member of the d4 gene family: expression and organization of genomic locus. *Mamm Genome* 12, 862–866.
- Orlando, V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem. Sci.* 25, 99–104.
- Park, J., Wood, M.A. and Cole, M.D. (2002). BAF53 forms distinct nuclear complexes and functions as a critical c-Myc-interacting nuclear cofactor for oncogenic transformation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1307–1316.
- Peterson, C.L. and Herskowitz, I. (1992). Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* 68, 573–583.
- Peterson, C.L. and Logie, C. (2000). Recruitment of chromatin remodeling machines. *J. Cell. Biochem.* 78, 179–185.
- Peterson, C.L. and Workman, J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 187–192.
- Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkelä, R. and Ruskoaho, H. (2004). GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc. Res.* 63, 196–207.
- Promega (2006). Protein Interaction Guide. heruntergeladen am 6.10.2009. http://www.promega.com/guides/protein.interactions_guide/Default.htm.

- Punternvoll, P., Linding, R., Gemünd, C., Chabanis-Davidson, S., Mattingsdal, M., Cameron, S., Martin, D.M.A., Ausiello, G., Brannetti, B. and Costantini, A., et al. (2003). ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res.* 31, 3625–3630.
- Renart, J., Reiser, J. and Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 3116–3120.
- Rudolph, C., Lausier, J., Naundorf, S., Müller, R.H. and Rosenecker, J. (2000). In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. *The journal of gene medicine* 2, 269–278.
- Ruiz, M. (2006). A diagram showing a healthy heart and one suffering from the tetralogy of Fallot, which constitutes four different malformations. heruntergeladen am 6.10.2009.
http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Tetralogy_of_Fallot.svg&filetimestamp=20070716043526.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* 239, 487–491.
- Seo, S., Richardson, G.A. and Kroll, K.L. (2005). The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of *Ngn* and *NeuroD*. *Development* 132, 105–115.
- Simone, C. (2006). SWI/SNF: the crossroads where extracellular signaling pathways meet chromatin. *J. Cell. Physiol.* 207, 309–314.
- Sudarsanam, P. and Winston, F. (2000). The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet.* 16, 345–351.
- Taussig, H.B. (1947). Diagnosis of the Tetralogy of Fallot and Medical Aspects of the Surgical Treatment. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 23, 705–718.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Des Higgins, G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.] Chapter 2, Unit 2.3.*
- Treich, I., Cairns, B.R., los Santos, T. de, Brewster, E. and Carlson, M. (1995). SNF11, a new component of the yeast SNF-SWI complex that interacts with a conserved region of SNF2. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4240–4248.
- Trotter, K.W., Fan, H.-Y., Ivey, M.L., Kingston, R.E. and Archer, T.K. (2008). The HSA domain of BRG1 mediates critical interactions required for glucocorticoid receptor-dependent transcriptional activation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1413–1426.
- Tsai, A. and Carstens, R.P. (2006). An optimized protocol for protein purification in cultured mammalian cells using a tandem affinity purification approach. *Nature protocols* 1, 2820–2827.
- Vieira, A.R., McHenry, T.G., Daack-Hirsch, S., Murray, J.C. and Marazita, M.L. (2008). Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts. *Genet. Med.* 10, 668–674.

- Wang, W. (2003). The SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers: similar mechanisms for diverse functions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 274, 143–169.
- Yatsenko, A.S., Kucherenko, M.M., Pantoja, M., Fischer, K.A., Madeoy, J., Deng, W.-M., Schneider, M., Baumgartner, S., Akey, J. and Shcherbata, H.R., et al. (2009). The conserved WW-domain binding sites in Dystroglycan C-terminus are essential but partially redundant for Dystroglycan function. *BMC Dev. Biol.* 9, 18.
- Zeng, L. and Zhou, M.M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.* 513, 124–128.
- Zhang, G., Gurtu, V. and Kain, S.R. (1996). An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 707–711.
- Zhang, Z., Fan, H.-Y., Goldman, J.A. and Kingston, R.E. (2007). Homology-driven chromatin remodeling by human RAD54. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 397–405.

8 Anhang

8.1 Aminosäuresequenzen von DPF3

DPF3a, Homo sapiens, Accession: AAH60801

```

1 matvihnpk algdqfykea iehcrsynsr lcaersvrlp fldsqtgvaq nncyiwmeqr
61 hrgpglapgq lytyparcwr kkrllhpped pkrlrleikp evelplkkdg ftsesttlea
121 llrgegvekk vdareeesiq eiqrvlende nveegneeed leedipkrkn rtrgrahgsa
181 ggrrrhdaas qedhdkpyvc dicgkryknr pglshyaht hlaseegdea qdgetrsppn
241 hrnenhrpqk gpdgtvipnn ycdfclggsn mnkksgrpee lvscadcgrs ahlggegrke
301 keaaaaartt edlfgstses dtstfrgfde ddleeprscr grrsgrgspt adkkgsc

```

DPF3b, Homo sapiens, Accession: AAX20019

```

1 matvihnpk algdqfykea iehcrsynsr lcaersvrlp fldsqtgvaq nncyiwmeqr
61 hrgpglapgq lytyparcwr kkrllhpped pkrlrleikp evelplkkdg ftsesttlea
121 llrgegvekk vdareeesiq eiqrvlende nveegneeed leedipkrkn rtrgrahgsa
181 ggrrrhdaas qedhdkpyvc dicgkryknr pglshyaht hlaseegdea qdgetrsppn
241 hrnenhrpqk gpdgtvipnn ycdfclggsn mnkksgrpee lvscadcgrs ghptclqftl
301 nmteavktyk wqciecksci lcgtsenddq llfcddcdrg yhmyclnppv aepegswsc
361 hlcwellkek asafgcqa

```

8.2 Alignment von humanem und murinem BRG1 und BAF60c

BRG1, Homo sapiens, Accession: NP_001122321

Brg1, Mus musculus, Accession: NP_035547

Das Alignment wurde mit ClustalW erstellt (Thompson et al., 2002).

Die Domänen wurden entsprechend der Vorhersage mit dem ELM-Server markiert (4.2).

```

Mensch      MSTPDPPLGGTTPRPGPSPGPGSPGAMLGPSPGSPGSAHSMMGPSPGPPSAGHPIPTQG 60
Maus        MSTPDPPLGGTTPRPGPSPGPGSPGAMLGPSPGSPGSAHSMMGPSPGPPSAGHPMPTQG 60
*****:****

Mensch      PGGYPQDNMNHQMHKPMESMHEKGMDDPRYNQMKGMGMRSGGHAGMGPPSPMDQHSQGY 120
Maus        PGGYPQDNMNHQMHKPMESMHEKGMDDPRYNQMKGMGMRSGAHTGMAPPSPMDQHSQGY 120
*****.*****.*.*.*****

Mensch      PSPLGGSEHASSPVPASGPSSGPMSSGPGGAPLDGADPQALGQQNRGPTPFNQQLHQL 180
Maus        PSPLGGSEHASSPVPASGPSSGPMSSGPGGAPLDGSDPQALGQQNRGPTPFNQQLHQL 180
*****:*****

          QLQ
Mensch      RAQIMAYKMLARGQPLPDHLQMAVQGKRPMQMGQMPQLPPPSVSATGPGPGPGPGPGP 240
Maus        RAQIMAYKMLARGQPLPDHLQMAVQGKRPMQMGQMPQLPPPSVSATGPGPGPGPGPGP 240
*****

Mensch      GPGFAPPNYSRPHGMGGPNMPPPGPSGVPFGMPGQPPGGPPKPWPEGPMANAAAPTSTPQ 300
Maus        GPGFAPPNYSRPHGMGGPNMPPPGPSGVPFGMPGQPPGGPPKPWPEGPMANAAAPTSTPQ 300
*****

Mensch      KLIPPQPTGRPSAPPVAVPPAASVPMPPQTQSPGQPAQPAPMVLPHQKQSRITPIQKPRG 360
Maus        KLIPPQPTGRPSAPPVAVPPAASVPMPPQTQSPGQPAQPAPLVLPHQKQSRITPIQKPRG 360
*****:*****

```

Mensch	LDPVEILQEREYRLQARIAHRIQELENLPGSLAGDLRTKATIELKALRLLNFQRQLRQEV	420
Maus	LDPVEILQEREYRLQARIAHRIQELENLPGSLAGDLRTKATIELKALRLLNFQRQLRQEV *****	420
Mensch	VVCMRRDTALETALNAKAYKRSKRQSLREARITEKLEKQKQIEQERKRRQKHQEYLNLSIL	480
Maus	VVCMRRDTALETALNAKAYKRSKRQSLREARITEKLEKQKQIEQERKRRQKHQEYLNLSIL *****	480
HSA		
Mensch	QHAKDFKEYHRSVTGKIQLTKAVATYHANTEREQKKENERIEKERMRLMAEDEEGYRK	540
Maus	QHAKDFREYHRSVTGKQLTKAVATYHANTEREQKKENERIEKERMRLMAEDEEGYRK *****:*****:*****	540
Mensch	LIDQKKDKRLAYLLQQTDEYVANLTELVRQHKAQVAKEKKKKKKKKAENAEGQTPAIG	600
Maus	LIDQKKDKRLAYLLQQTDEYVANLTELVRQHKAQVAKEKKKKKKKKAENAEGQTPAIG *****	600
BRK		
Mensch	PDGEPLDETSQMSDLPVKVIHVESGKILTGTDAKAGQLEAWLEMNPGYEVAPRSDSEES	660
Maus	PDGEPLDETSQMSDLPVKVIHVESGKILTGTDAKAGQLEAWLEMNPGYEVAPRSDSEES *****	660
Mensch	GSEEEEEEEEEQPQAAQPPTLPVEEKKKIPDPDSDVSEVDARHIENAKQDVDEYGV	720
Maus	GSEEEEEEEEEQPQPAQPPTLPVEEKKKIPDPDSDVSEVDARHIENAKQDVDEYGV *****	720
Mensch	SQALARGLSYYAVAHAVTERVDKQSALMVNGVLKQYQIKGLEWLVSLYNNLNGILADE	780
Maus	SQALARGLSYYAVAHAVTERVDKQSALMVNGVLKQYQIKGLEWLVSLYNNLNGILADE *****	780
DEXD Helicase		
Mensch	MGLGKTIQTIALITYLMEHKRINGPFLIIVPLSTLSNWAYEFDKWAPSVVKVSYKSPAA	840
Maus	MGLGKTIQTIALITYLMEHKRINGPFLIIVPLSTLSNWAYEFDKWAPSVVKVSYKSPAA *****	840
Mensch	RRAFVQQLRSGKFNVLTTTYEYI IKDKHILAKIRWKYMIVDEGHRMKNHHCKLTQVLNTH	900
Maus	RRAFVQQLRSGKFNVLTTTYEYI IKDKHILAKIRWKYMIVDEGHRMKNHHCKLTQVLNTH *****	900
Mensch	YVAPRLLLTGTPLQNKLPWALLNFFLLPTIFKSCSTFEQWFNAPFAMTGEKVDLNEEE	960
Maus	YVAPRLLLTGTPLQNKLPWALLNFFLLPTIFKSCSTFEQWFNAPFAMTGEKVDLNEEE *****	960
Mensch	TILIIRRLHKVLRPFLRLRLKKEVEAQLPEKVEYVIKCDMSALQRVLYRHMQAQGVLLTD	1020
Maus	TILIIRRLHKVLRPFLRLRLKKEVEAQLPEKVEYVIKCDMSALQRVLYRHMQAQGVLLTD *****	1020
Mensch	GSEKDKKGGTKTLMNTIMQLRKCINHPYMFQHIIEESFSEHLGFTGGIVQGLDLYRASG	1080
Maus	GSEKDKKGGTKTLMNTIMQLRKCINHPYMFQHIIEESFSEHLGFTGGIVQGLDLYRASG *****	1080
Mensch	KFELLDRI LPKLRATNHNKVLVFCQMTSLMTIMEDYFAYRGFKYLRLDGTTKAEDRGMLLK	1140
Maus	KFELLDRI LPKLRATNHNKVLVFCQMTSLMTIMEDYFAYRGFKYLRLDGTTKAEDRGMLLK *****	1140
Mensch	TFNEPGSEYFIFLLSTRAGGLGMLNLSADTVIIFDSDWNPHQDLQAQDRAHRIGQONEVR	1200
Maus	TFNEPGSEYFIFLLSTRAGGLGMLNLSADTVIIFDSDWNPHQDLQAQDRAHRIGQONEVR *****	1200
Mensch	VLRCTVNSVEEKILAAAKYKLNVDQKVIQAGMFDQKSSSHERRAFLQAILEHEEQDESR	1260
Maus	VLRCTVNSVEEKILAAAKYKLNVDQKVIQAGMFDQKSSSHERRAFLQAILEHEEQDESR *****	1260
Mensch	HCSTGSGSASFAHTAPPAGVNPDLPEPLKEEDEVPPDETQVNMIAHHEEEFDLFMRMD	1320
Maus	-----EEDEVPPDETQVNMIAHHEEEFDLFMRMD *****	1287
Mensch	LDRRREEARNPKRKPRLMEEDELPSWIIKDDAEVERLTCEEEEEKMFGRGSRHRKEVDYS	1380
Maus	LDRRREEARNPKRKPRLMEEDELPSWIIKDDAEVERLTCEEEEEKMFGRGSRHRKEVDYS *****	1347
Mensch	DSLTEKQWLKKITGKDIHDTASSVARGLQFQRGLQFCTRASKAIEEGTLEEIEEEVRQKK	1440
Maus	DSLTEKQWLK-----AIEEGTLEEIEEEVRQKK *****	1375
Mensch	SSRKRKRDSAGSSTPTTSTRSRDKDEESKQKQRGRPPAEKLSFNPPNLTKKMKKIVDA	1500
Maus	SSRKRKRDSAGSSTPTTSTRSRDKDEESKQKQRGRPPAEKLSFNPPNLTKKMKKIVDA *****:*****:*****	1435
BROMO		
Mensch	VIKYKDSSSGRQLSEVFIQLPSRKELPEYYELIRKPVDFKKIKERIRNHKYRSLNDLEKD	1560
Maus	VIKYKDSSSGRQLSEVFIQLPSRKELPEYYELIRKPVDFKKIKERIRNHKYRSLNDLEKD *****	1495

```

Mensch      VMLLCQNAQTFNLEGS LIYEDSIVLQSVFTSVRQKIEKEDDSEGESEEEEEEGEEGSES 1620
Maus        VMLLCQNAQTFNLEGS LIYEDSIVLQSVFTSVRQKIEKEDDSEGESEEEEEEGEEGSES 1555
*****
Mensch      ERSRVKVKIKLGRKEKAQDR LKGGRRRPSRGSRAKPVVSDDDSEEEQEEDRSGSGSEED 1679
Maus        ERSRVKVKIKLGRKEKAQDR LKGGRRRPSRGSRAKPVVSDDDSEEEQEEDRSGSGSEED 1614
*****

```

BAF60c, Homo sapiens, Accession: NP_001003801

Baf60c, Mus musculus, Accession: NP_080167

Das Alignment wurde mit ClustalW erstellt (Thompson et al., 2002).

```

Mensch      MADEVAGGARKATKSKLFEFLVHGVRPGMPSGARMPHQGAPMGPPGSPYMGSPA VRPGL 60
Maus        MADEVAGGARKATKSKLFEFLVHGVRPGMPSGARMPHQGAPMGPPGSPYMGSPA VRPGL 60
*****
Mensch      APAGMEPARKRAAPP PGQSQAQSQGQPVPTAPARSRS AKRRKMADKILPQRIR ELVPESQ 120
Maus        APAGMEPARKRAAPP PGQSQAQSQGQPVPTAPARSRS AKRRKMADKILPQRIR ELVPESQ 120
*****
Mensch      AYMDLLAFERKLDQTIMRKRVDIQEALKRPMKQKRKLRLYISNTFNPAKPD AEDSDGSIA 180
Maus        AYMDLLAFERKLDQTIMRKRVDIQEALKRPMKQKRKLRLYISNTFNPAKPD AEDSDGSIA 180
*****
Mensch      SWELRVEGKLLDDPSKQKRKFSFFKSLVIELDKDLYGPDNHLVEWHRTPTTQ ETDFGFV 240
Maus        SWELRVEGKLLDDPSKQKRKFSFFKSLVIELDKDLYGPDNHLVEWHRTPTTQ ETDFGFV 240
*****
Mensch      KRPGDLSVRCTLLMLLDYQPPQFKLDPRLARLLGLHTQSRSAIVQALWQYVK TNRLQDSH 300
Maus        KRPGDLSVRCTLLMLLDYQPPQFKLDPRLARLLGLHTQSRSAIVQALWQYVK TNRLQDSH 300
*****
Mensch      DKEYINGDKYFQQIFDCPRLKFSEIQRLTALLPPDPPIVINHVISVDP SDQKKTACYDI 360
Maus        DKEYINGDKYFQQIFDCPRLKFSEIQRLTALLPPDPPIVINHVISVDP SDQKKTACYDI 360
*****
Mensch      DVEVEEPLKGQMS SFLSTANQQEISALDSKI HETIESINQLKIQ RDFMLSFSRDPKGYV 420
Maus        DVEVEEPLKGQMS SFLSTANQQEISALDSKI HETIESINQLKIQ RDFMLSFSRDPKGYV 420
*****
Mensch      QDLLRSQSRDLKVM TDVAGNPEEERRAEFYHQPWSQEAVSRYFYCKIQ RRQELEQSLV 480
Maus        QDLLRSQSRDLKVM TDVAGNPEEERRAEFYHQPWSQEAVSRYFYCKIQ RRQELEQSLV 480
*****
Mensch      RNT 483
Maus        RNT 483
*****

```


9 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 10.11.2009

Cornelia Dorn