

Untersuchung der Homo- und Heterodimerbildung des epigenetischen Transkriptionsfaktors DPF3

Diplomarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Biochemiker

Vorgelegt von

Michalina Mańkowska

angefertigt

am **Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik** in Berlin

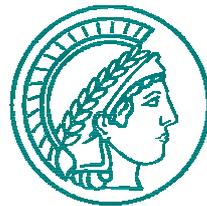
in der Arbeitsgruppe Cardiovascular Genetics von Priv. -Doz. Dr. Silke Sperling

während der Zeit von Mai bis Oktober 2009

eingereicht

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie,

Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin



MAX-PLANCK-GESellschaft

Die Diplomarbeit wurde in der Zeit vom 01.05.2009 bis 02.11.2009 angefertigt.

Erstgutachter:

Priv. –Doz. Dr. Silke Sperling, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Thomas Schmülling, Freie Universität Berlin

Für meinen Vater

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Priv. –Doz. Dr. Silke Sperling bedanken für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe.

Weiterhin geht ein besonderes Dankeschön an Dr. Martje Tönjes, meine Betreuerin, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich durch die gesamte Zeit unterstützt hat.

Jenny Schlesinger danke ich ganz herzlich für zahlreiche Ratschläge, ständige Unterstützung und vor allem die Korrektur meiner Arbeit.

Bei Ilona Dunkel will ich mich für die Unterstützung und viele praktische Ratschläge vor allem während der letzten Arbeitswochen bedanken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich herzlich für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.

Prof. Dr. Thomas Schmüling danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie immer für mich da waren.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. DPF3.....	1
1.2. DPF1 und DPF2	3
1.3. Chromatin-Struktur und Regulation der Genexpression	5
1.3.1. Histonmodifikationen	6
1.3.2. Plant Homeodomäne (PHD).....	8
1.3.3. Chromatin Remodeling Komplexe.....	10
1.4. Dimerisierung von Transkriptionsfaktoren	11
2. Zielstellung	13
3. Material und Methoden	15
3.1. Chemikalien und Reagenzien.....	15
3.2. DNA Größenmarker	16
3.3. Proteingrößenmarker	17
3.4. Lösungen und Puffer	17
3.5. Medien.....	20
3.6. Bakterienmedien	20
3.7. Zellkulturmedium und Lösungen zum Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	20
3.8. Enzyme.....	21
3.8.1. Restriktionsenzyme	21
3.9. Primer	22
3.10. Plasmide.....	22
3.11. Antikörper	23
3.12. Geräte und sonstige Materialien	23
3.13. Zellbiologische Methoden	25
3.13.1. HEK293T Zellen	25
3.13.2. Zellkulturarbeiten	25
3.13.3. Auftauen der HEK293T Zellen	25
3.13.4. Kultivierung von HEK293T Zellen.....	26
3.13.5. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer.....	26
3.13.6. Aussäen der HEK293T Zellen für die Transfektion.....	27

INHALTSVERZEICHNIS

3.13.7. Transfektion der HEK293T Zellen mit Plasmid-DNA.....	27
3.13.8. Ernte der transfizierten HEK293T Zellen	28
3.14. Molekularbiologische Methoden	28
3.14.1. <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>) Stamm DH10B	28
3.14.2. Transformation von hitzekompetenten <i>E.coli</i> (DH10B) mit Plasmid-DNA	28
3.14.3. Übernachtkulturen von <i>E.coli</i> (DH10B).....	29
3.14.4. Glycerinstocks von <i>E.coli</i> (DH10B).....	29
3.14.5. Plasmidisolierung von <i>E.coli</i> (DH10B)- Mini Preps.....	29
3.14.6. Plasmidisolierung von <i>E.coli</i> (DH10B)- Midi Preps.....	29
3.14.7. <i>E.coli</i> Stamm BL21prare3	29
3.14.8. Transformation von hitzekompetenten <i>E.coli</i> (BL21prare3) mit Plasmid-DNA	30
3.14.9. Vor- und Hauptkulturen von <i>E.coli</i> (BL21prare3)	30
3.14.10. Expression von GST-Fusionsproteinen.....	31
3.14.11. Bestimmung der optischen Dichte.....	31
3.14.12. PCR.....	31
3.14.13. Primerdesign.....	33
3.14.14. Restriktionsverdau	34
3.14.15. Dephosphorylierung der Vektor-DNA	34
3.14.16. Aufreinigung der DNA nach dem Restriktionsansatz.....	34
3.14.17. Ligation.....	35
3.14.18. Re-Ligationstest.....	35
3.14.19. Agarose-Gelelektrophorese	36
3.14.20. DNA Sequenzierung.....	36
3.15. Proteinbiochemische und immunologische Methoden	37
3.15.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
3.15.2. Western Blot.....	38
3.15.3. Immunofluoreszenzfärbung.....	39
3.15.4. Bestimmung der Proteinkonzentration	40
3.15.5. Aufreinigung der GST-Fusionsproteine	40
3.15.6. Elution der GST-Fusionsproteine.....	41
3.15.7. Pull-down.....	41
3.15.8. GST-Pull-down mit Sepharose.....	43

3.15.9. GST-Pull-down mit biotinylierten Histonpeptiden	43
4. Ergebnisse.....	45
4.1. Zusammenstellung der Proteinkonstrukte für den GST-Pull-down	45
4.2. Proteinaufreinigung und Überprüfung der Bindungseffizienz von GST-	
Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose	46
4.3. Überprüfung der Expression von Flag-Fusionsproteinen.....	48
4.3.1. Überprüfung der Expression von Flag-Fusionsproteinen mittels SDS-	
Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot.....	48
4.3.2. Überprüfung der Expression von Flag-Fusionsproteinen mittels	
Immunofluoreszenzfärbung.....	49
4.4. Untersuchung der Homo- und Heterodimerbildung von DPF3	52
4.5. Charakterisierung der Dimerisierungsdomäne von DPF3	54
4.6. Untersuchung der Interaktionen von DPF3 mit weiteren Mitglieder der	
d4-Proteinfamilie DPF1 und DPF2	60
4.7. Zusammenfassung aller Interaktionspartner von DPF3b	61
4.8. Charakterisierung der Isoform DPF1d	62
4.8.1. Untersuchung des Vorhandenseins eines Exon 1 in der mRNA Sequenz	
der DPF1 Isoform d.	64
4.8.2. Untersuchung des PHD-Finger von DPF1d auf seine Fähigkeit zur	
Bindung von modifizierten Histonpeptiden	66
5. Diskussion.....	69
5.1. Rekombinante Proteine für GST-Pull-down Versuche.....	69
5.2. Homo- und Heterodimerisierung von DPF3	70
5.3. Identifizierung der Dimerisierungsdomäne von DPF3	71
5.4. Interaktionen von DPF3 mit DPF1 und DPF2	76
5.5. GST-Pull-down – Limitierungen	77
5.6. Die Isoform DPF1d	78
6. Zusammenfassung	81
7. Literaturverzeichnis	83
8. Abkürzungsverzeichnis	87

INHALTSVERZEICHNIS

9. Anhang.....	89
9.1. Vergleich der Nukleotidsequenzen vier menschlichen DPF1 Isoformen	89
9.2. Vergleich der vier humanen DPF1 Isoformen auf Proteinebene	93
9.3. Sequenzen der Transkripte von DPF3a und DPF3b	94

1. Einleitung

1.1. DPF3

Der Transkriptionsfaktor DPF3, auch als CERD4 bezeichnet, gehört zu der d4 Genfamilie, die erstmals im Menschen im Jahr 1996 identifiziert wurde (Chestkov *et al.* 1996). Neben DPF3 gehören zu der Familie zwei weitere Transkriptionsfaktoren DPF1 (Neuro-d4) und DPF2 (Requem/Ubi-d4). Die Familie ist von Nematoden zu Vertebraten hoch konserviert, was auf allgemein wichtige Funktionen der Proteine schließen lässt (Chestkov *et al.* 1996). Strukturell zeigen die Vertreter der d4 Genfamilie eine ähnliche Domänenorganisation. Im N-Terminus befindet sich eine für diese Proteinfamilie charakteristische 2/3-Domäne, die meistens ein Kernlokalisierungssignal beinhaltet. Die Funktion dieser Domäne ist unbekannt. Im mittleren Bereich befindet sich eine C2H2 Zinkfingerdomäne, die für Interaktionen mit DNA-, RNA- und Proteinen bekannt ist (Iuchi 2001; Brown 2005; Brayer and Segal 2008). Diese Domäne ist charakterisiert durch je zwei hoch konservierte Cystein- und Histidin Reste, die in der Lage sind unter Ausbildung einer dreidimensionalen Schleifenstruktur („eines Fingers“) ein Zinkion zu koordinieren. Im C-terminalen Bereich des Proteins befindet sich die d4-Domäne, die aus zwei aufeinander folgenden PHD-Finger (PHD, plant homeodomain) besteht. Auf die Funktion und Struktur der PHD Finger wird später in der Einleitung im Kapitel 1.3.2 eingegangen.

Die Identifikation des Transkriptionsfaktors DPF3 erfolgte bei der Durchsuchung einer menschlichen Cosmidbibliothek mit einer Sonde, die gegen das Familienmitglied DPF1 (Neuro-d4) gerichtet war (Chestkov *et al.* 1996). Während der Expressionsanalysen in Maus und Huhn wurden zwei Spleißvarianten von DPF3 identifiziert (Ninkina *et al.* 2001). Die Isoformen DPF3a und DPF3b besitzen beide die hoch konservierte 2/3 Domäne und einen C2H2 Zinkfinger. Sie unterscheiden sich nur im C-terminalen Bereich. Die DPF3b Spleißform enthält die zwei nacheinander angeordneten PHD Finger. DPF3a hingegen ist kürzer und enthält nur die Sequenz des ersten halben PHD-Fingers, dafür aber einen spezifischen C-Terminus (Abbildung 1-1). Die Funktion des C-Terminus von DPF3a ist unbekannt.

EINLEITUNG

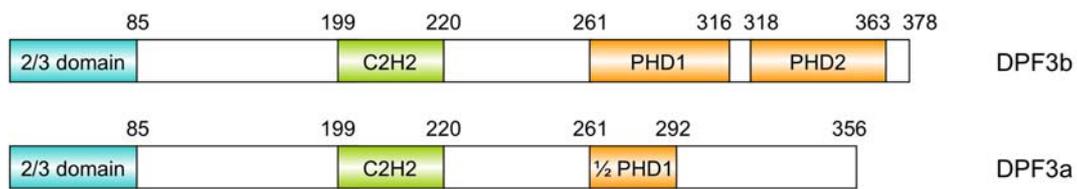


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von DPF3a und DPF3b. In Blau- 2/3 Domäne, in Grün- C2H2 Zinkfinger, in Orange- Plant Homeodomäne.

DPF3 wird gewebespezifisch im Herzen, Skelettmuskel und neuronalem Gewebe während der Embryonalentwicklung von Maus, Huhn und Zebrafisch exprimiert (Lange *et al.* 2008). Die Expression von DPF3 während der Entwicklung des Herzens ist bereits sehr früh detektierbar (Embryonalstadium E9.5) und beschränkt sich nur auf das Myokard. Bei einer genaueren Untersuchung konnte DPF3 im Ventrikel, im Atrium und im Einfluss- und Ausflusstrakt des Herzens von Mäusen und Hühnerembryos nachgewiesen werden.

Morpholino Knockdown Experimente von *dpf3* in Zebrafisch zeigten Fehlbildungen von Herz- und Muskelfasern und eine verminderte Herzkontraktion (Lange *et al.* 2008), was auf eine essentielle Rolle des Transkriptionsfaktors während der Herzentwicklung schließen lässt. Diese Vermutung wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass die Promotorregion von DPF3 Bindestellen von MEF2a, einen ebenfalls für die Herzentwicklung wichtigen Transkriptionsfaktor, enthält.

Wichtige Hinweise auf die Rolle von DPF3 in der Herzentwicklung bei Menschen haben die Expressionsanalysen von gesunden und malformierten Herzen geliefert (Kaynak *et al.* 2003). Beide DPF3 Isoformen sind im rechten ventrikulären Myokard von Patienten mit Fallot-Tetralogie (TOF, *Tetralogy of Fallot*) signifikant hochreguliert. TOF ist eine angeborene Herzfehlbildung, die etwa 10% der angeborenen Herzfehler beim Menschen ausmacht. Der Krankheitsphänotyp weist vier charakteristische Merkmale auf: eine Verengung des Ausflusstraktes vom rechten Ventrikel, einen ventrikulären Septumdefekt, eine über der Herzscheidewand reitende Aorta und eine Hypertrophie des rechten Ventrikels.

Die oben beschriebenen Beobachtungen lassen eindeutig auf eine wichtige Rolle von DPF3 in der Herz- und Muskelentwicklung schließen, auch wenn der Transkriptionsfaktor bisher wenig untersucht wurde. Weitere Studien haben gezeigt, dass Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphism*) in

der 5' Region von DPF3b mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs und Lymphknotenmetastasen assoziiert sind (Hoyal *et al.* 2005). Es konnte auch gezeigt werden, dass DPF3a (mit DPF1) eine Rolle bei der Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu Neuronen spielt (Lessard *et al.* 2007).

Eine interessante Entdeckung wurde im Jahr 2008 bei Lange *et al.* gemacht. Mithilfe von Tandem Affinity Purification (TAP) und Massenspektrometrie wurden unter den möglichen Interaktionspartnern von DPF3a und DPF3b fast alle Komponenten des BAF Chromatin Remodeling Komplexes identifiziert. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die PHD Finger von DPF3b mit modifizierten Histonresten von Histon 3 (H3) und Histon 4 (H4) interagieren (Lange *et al.* 2008). Dabei konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der PHD Finger von DPF3b sowohl an methylierte als auch acetylierte Histonreste binden kann. Bis jetzt war für die Interaktion mit acetylierten Histonen nur die Bromodomäne bekannt (Mujtaba *et al.* 2007).

Dies alles weist auf wichtige Funktionen von DPF3 im Chromatin Remodeling Prozeß hin. Die genauere Beschreibung der DPF3-Histon Interaktion, des BAF Chromatin Remodeling Komplexes und der PHD Finger Domäne wird noch folgen.

1.2. DPF1 und DPF2

Bei Säugern sind bisher drei Proteinvertreter der d4 Genfamilie bekannt (Chestkov *et al.* 1996). Neben dem bereits vorgestellten DPF3 gehören zu dieser Genfamilie auch DPF1 (Neuro-d4, BAF45b) und DPF2 (Ubi-d4/Requiem). Alle Vertreter besitzen die schon in Kapitel 1.1 erwähnte Domänenstruktur. Zuerst wurde DPF1 als neurospezifisches Gen in der Ratte identifiziert (Buchman *et al.* 1992). Bei der Durchsichtung einer Ratten cDNA Bibliothek zeigte sich die Diversität der DPF1 Spleißvarianten. Das Auftreten mehrerer Transkriptvarianten wurde sowohl im Mausgenom (Mertsalov *et al.* 2000) als auch im Humangenom (Chestkov *et al.* 1996) nachgewiesen.

Für das humane DPF1 Gen sind zur Zeit drei Spleißformen bekannt und annotiert (Chestkov *et al.* 1996). Die drei Proteinisoformen sind schematisch in der Abbildung 1-2 dargestellt.

EINLEITUNG

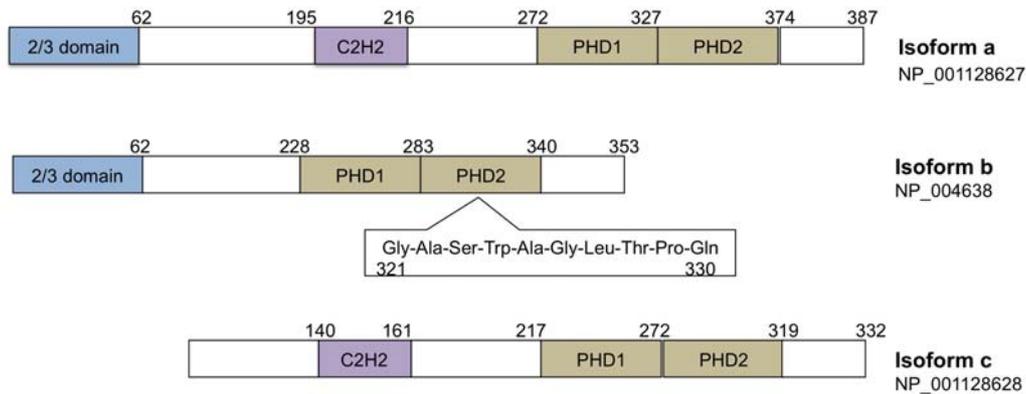


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Proteinstrukturen der humanen DPF1 Isoformen a, b und c. In Blau- 2/3 Domäne, in Violett- C2H2 Zinkfinger, in Braun- Plant Homeodomäne.

Die längste Isoform a enthält die 2/3 Domäne, den C2H2 Zinkfinger und zwei tandemartig angeordnete PHD-Finger. Die Isoform b ist kürzer und besitzt keinen C2H2 Zinkfinger. Dafür ist der zweite PHD Finger um 10 Aminosäuren länger (siehe Abbildung 1-2). Welchen Einfluss diese Aminosäuren auf die Struktur und Funktion der PHD Finger haben, ist unbekannt. Sie verursachen wahrscheinlich eine Verlängerung der ersten Schleife (Loop 1) die in dem PHD Finger durch Koordinierung der Zinkionen ausgebildet wird (Abbildung 1-5). Welche Auswirkung das auf die dreidimensionale Struktur des Proteins und schließlich dessen Funktion hat, bleibt unbekannt.

Isoform c unterscheidet sich erheblich durch einen verkürzten N-Terminus ohne 2/3-Domäne. Die Aminosäuresequenz des zweiten PHD-Fingers entspricht bei dieser Spleißform der von Isoform a.

Expressionsanalysen zeigten im Zentralnervensystem der Ratte in späteren Entwicklungsstadien einen höheren Expressionsgrad von DPF1 als nach der Geburt (Buchman *et al.* 1992). Dies war der erste Hinweis auf die Rolle von DPF1 in der Neuronalentwicklung gewesen. Spätere Studien haben DPF1 als Mitglied des BAF Chromatin Remodeling Komplexes identifiziert (Lessard *et al.* 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass während der Differenzierung von Neuronen aus Vorläuferzellen im Zentralnervensystem der Maus ein Austausch der BAF Chromatin Remodeling Komplex Untereinheiten stattfindet. Dabei wird unter anderem BAF45a (PHF) gegen DPF1 (oder DPF3a) ausgetauscht.

DPF2, das dritte Mitglied der d4-Genfamilie wird ubiquitär exprimiert (Gabig *et al.* 1994). Das Protein wurde als ein pro-apoptotischer Faktor in Myeloidzellen identifiziert (Gabig *et al.* 1994). Lokalisationsstudien haben gezeigt, dass das Protein sowohl in cytoplasmatischen als auch nuklearen Fraktionen von Maus Myeloidzellen und humanen K568 Leukämiezellen nachgewiesen werden konnte, was eine zusätzliche Funktion neben der Transkriptionsregulation vermuten lässt (Gabig *et al.* 1998). Bis jetzt wurde nur ein Transkript für dieses Protein im Menschen gefunden (Gabig *et al.* 1994; Chestkov *et al.* 1996).

1.3. Chromatin-Struktur und Regulation der Genexpression

Um die Gesamtheit des Genoms von Eukaryoten im Zellkern unterbringen zu können, ist eine besondere Verpackung der DNA nötig. Deswegen liegt die DNA in der eukaryotischen Zelle in Form des Chromatins vor. Chromatin ist ein makromolekularer Komplex, der aus DNA und Histon-Proteinen besteht. Die Basiseinheit des Chromatins, das Nukleosom, setzt sich zusammen aus einem Histonoktamer, um das eine 146bp lange DNA-Doppelhelix in 1,65 Windungen gewickelt ist (Luger *et al.* 1997). Das Histonoktamer („core particle“) enthält jeweils zwei H2A, H2B, H3 und H4 Histonproteine (Luger *et al.* 1997). Der Bereich zwischen zwei Nukleosomen, die Linker-DNA, wird durch ein weiteres Histon H1 besetzt, welches die Nukleosomen zusätzlich stabilisiert und an der Ausbildung höherer Struktur (der sog. 30nm-Fasern) beteiligt ist (Thoma *et al.* 1979). Insgesamt kann die DNA im Chromatin um den Faktor von etwa 10^4 aufkondensiert werden.

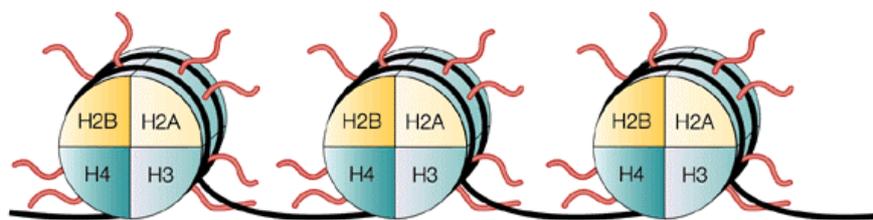


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Nukleosome. Die Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 sind in dem Nukleosom farblich dargestellt. Um jedes Nukleosom ist die DNA gewickelt (in schwarz markiert). Mit rot sind die Histonschwänze, die aus dem Nukleosomenverband herausragen dargestellt (Marks *et al.* 2001).

Die Chromatinstruktur ermöglicht die Verpackung der langen DNA im Zellkern, jedoch wird durch die resultierende Kondensation, die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren und regulatorische Proteine erschwert. Um die Genexpression zu ermöglichen darf Chromatin kein starrer Komplex sein.

Im Zellkern kann man zwischen kondensierten (Heterochromatin) und weniger kondensierten (Euchromatin) Chromatinbereichen unterscheiden. Das Heterochromatin wird mit der Repression der Transkription und Euchromatin mit einem aktivierenden Effekt auf die Genexpression assoziiert. Der Übergang von Heterochromatin zu Euchromatin ist sehr dynamisch. Er wird durch Änderungen in der Chromatinstruktur ermöglicht, die von verschiedenen Mechanismen gesteuert werden. Zwei davon; das ATP-anhängige Chromatin Remodeling und post-translationale Modifikationen der Histone werden später noch detaillierter beschrieben.

1.3.1. Histonmodifikationen

Histone sind kleine, hoch konservierte, basische Proteine, die eine globuläre Struktur aufweisen. Unstrukturiert sind nur ihre N-terminalen Bereiche, die sogenannten Histonschwänze, die aus dem Nukleosomenverband herausragen und verschiedene post-translationale Modifikationen aufweisen können (Abbildung 1-3). Zu den verschiedenen Modifizierungen gehören Acetylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen, Ubiquitinierungen, Sumoylierungen oder ADP-Ribosylierungen. Die Histonschwänze enthalten Aminosäurenreste wie Arginin und Lysin die reversibel modifiziert werden können.

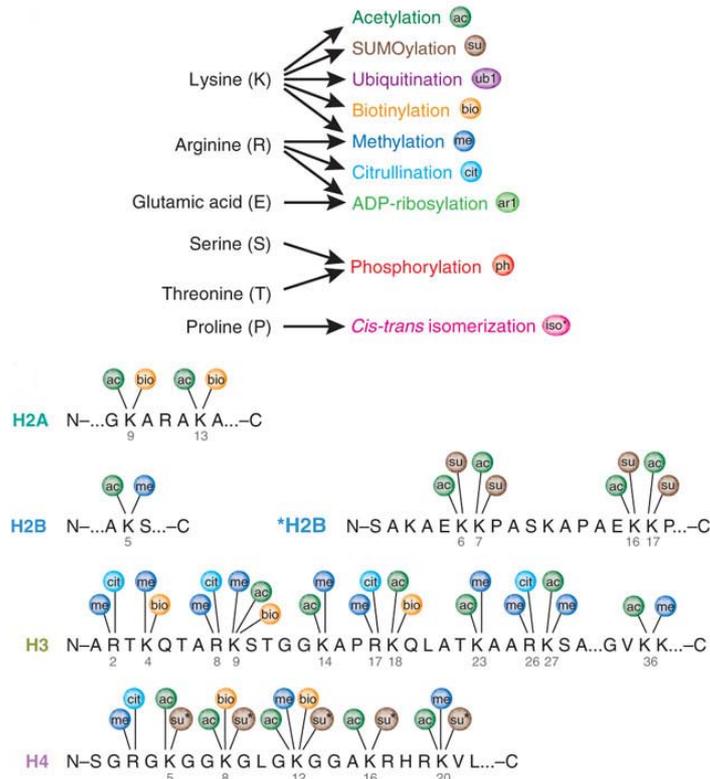


Abbildung 1-4: Dargestellt sind Aminosäuresequenzen der Histonschwänze H2A, H2B, H2B* (Hefe), H3 und H3 mit möglichen post-translationalen Histonmodifikationen (Latham and Dent 2007).

Der Einfluss von Histonmodifikationen auf die Chromatinstruktur und Regulation der transkriptionellen Aktivität ist komplex. Es ist die kombinatorische Wirkung der verschiedenen post-translationalen Modifikationen, die einen Effekt hervorruft. Die Kombinationen sind spezifisch und vielfältig, deswegen spricht man oft von einem „Histon-Code“ (Strahl and Allis 2000).

Acetylierungen und Methylierungen der Histone H3 und H4 sind die am häufigsten auftretenden post-translationalen Modifikationen. Viele Beobachtungen und Untersuchungen verbinden die Acetylierung mit einer aktivierenden Wirkung auf die Genexpression. Durch Acetylierung von Lysinresten wird die positive Ladung des Aminosäurerestes neutralisiert, wodurch die Wechselwirkungen der Histonschwänze mit der DNA abgeschwächt wird. Dies kann physikalisch zu einer Auflockerung der gesamten Chromatinstruktur führen. Das dynamische Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung wird durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDAC) reguliert.

Die Methylierung wird durch Histon-Methyltransferasen (HMT) und Histon-Demethylasen katalysiert. An Arginin kann nur eine Methylgruppe angehängt werden. Im Fall von Lysinresten kann es zu einer Mono-, Di- und Trimethylierung kommen. Methylierungen können je nach Position, Grad der Methylierung und Kombination mit anderen Modifizierungen entweder einen repressiven oder einen aktivierenden Effekt auf die Genexpression haben (Ng *et al.* 2009). Eine Methylierung des Lysins an Position 4 des Histons 3 (H3K4) wird zum Beispiel mit einer aktivierenden Wirkung auf die Transkription assoziiert (Koch *et al.* 2007). Die Methylierung des Lysins an Position 9 des Histons 3 (H3K9) und 27 (H3K27) führt zur Transkriptionsrepression (Barski *et al.* 2007). Eine Trimethylierung von Lysin 4 des Histons 3 (H3K4me₃) findet man oft in der Nähe des 5' Endes von transkribierenden Genen (Taverna *et al.* 2006), dagegen eine Trimethylierung von Histon 3 des Lysins 9 (H3K9me₃) im pericentromerischen, kompakten Heterochromatin (Grunau *et al.* 2006).

Neben der direkten Wirkung auf die Chromatinstruktur bieten Histonmodifikationen auch die Bindungsstellen für zahlreiche Effektorproteine. Es gibt eine Reihe von Proteindomänen die Histonmodifikationen erkennen. Die meisten Acetylierungen werden von der Bromodomäne erkannt und gebunden (Mujtaba *et al.* 2007).

Methylierungen werden von verschiedenen Proteinfamilien erkannt: die „Royal Family“ Proteine (Maurer-Stroh *et al.* 2003), WD40 repeat protein WDR5 (Wysocka *et al.* 2005) und PHD-Finger haltige Proteine (Taverna *et al.* 2006). Die „Royal Family“ Proteine beinhalten Tudor-, Chromo- und MBP- (malignant brain tumor) Proteindomänen, die mit methylierten Histonen wechselwirken. Im Laufe der Einleitung wird die Struktur und Funktion der PHD Domäne detaillierter beschrieben.

1.3.2. Plant Homeodomäne (PHD)

Die PHD-Domäne wurde erstmals 1993 in einem Pflanzenprotein entdeckt (Schindler *et al.* 1993). Zwei Jahre danach wurde die Domäne bereits in vielen eukaryotischen Proteinen identifiziert, vor allem in Proteinen, die bei der Regulation der Chromatinstruktur eine Rolle spielen (Aasland *et al.* 1995).

Die PHD Domäne weist Ähnlichkeiten mit der RING Proteindomäne auf. Es wurden bereits mehrere PHD-Finger Strukturen von verschiedenen Proteinen mit großer

Auflösung aufgeklärt (Adams-Cioaba and Min 2009). Allgemein weisen diese Strukturen ein Cystein4-Histidin-Cystein3 Motiv auf, welches zwei Zinkionen koordinieren kann, wodurch sich zwei Schleifen ausbilden können (Abbildung 1-5 A).

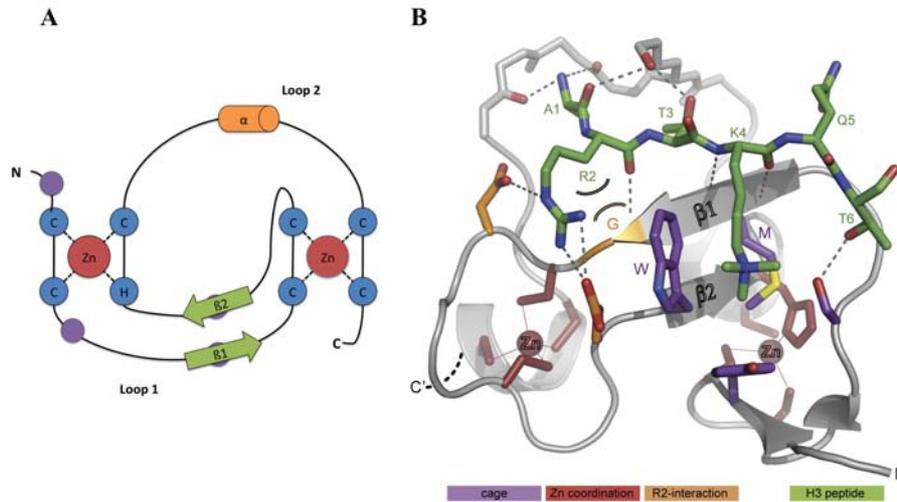


Abbildung 1-5: A) Schematische Darstellung des PHD-Fingers. Die Histidin- und Cysteinreste, welche die Zinkionen koordinieren sind blau markiert. Mit violetten Kreisen ist die Lage der Aminosäuren angedeutet, die den Käfig ausbilden. Die zwei beta-Faltblätter sind grün und der alpha-helikale Zylinder orange dargestellt. B) Der PHD-Finger eines ING Proteins und die Erkennung von H3K4me3. In violett sind die Aminosäureseitenketten dargestellt, die den Käfig ausbilden. In Gelb- Aminosäuren, die mit H3R2 wechselwirken. In Rot- die Aminosäuren, die Zinkionen koordinieren. In Grün- das H3K4 Peptid. β1 und β2- β-Faltblätter. Zn- Zinkatome (Ruthenburg *et al.* 2007).

Dreidimensional bildet die Struktur zwei Taschen aus, die für die Erkennung und Bindung von Mono-, Di- und trimethyliertem Lysin 4 des Histons H3 nötig sind (Abbildung 1-5 B). Die erste Tasche, ein Käfig (Cage) der aus drei aromatischen Aminosäuren ausgebildet wird, ist eine Andockstelle für methyliertes Lysin 4. Die Bindung wird durch Wechselwirkungen zwischen π -Elektronenwolken der Aromaten und der methylierten Aminogruppe des Lysins bewerkstelligt. Eine zusätzliche Tasche ermöglicht Wechselwirkungen von Arginin 2 des Histons H3 (H3R2) mit dem Protein. Viele Proteine mit PHD Fingern binden spezifisch H3K4 (Di- und/oder Trimethylierung). Es sind aber auch Proteine bekannt, bei denen der PHD-Finger mit unmodifizierten Histonen 3 wechselwirkt (Lan *et al.* 2007).

Neben der Erkennung und Bindung von H3K4 methylierten Histonschwänzen, sind die PHD Finger auch an Protein-Protein Interaktionen beteiligt. Als Beispiel kann der PHD Finger des Proteins Pygopus dienen, der neben H3K4me auch an das

BCL/Legless Protein bindet (Fiedler *et al.* 2008). BCL/Legless ist eine Komponente des Wnt-Signalweges (Fiedler *et al.* 2008). Andere Studien zeigen auch, dass der PHD-Finger des Pygopus Proteins sowohl im Kristall als auch in der Lösung Dimere ausbilden kann (Nakamura *et al.* 2007).

DPF3 wurde als erstes Protein charakterisiert, dessen zwei tandemartig angeordnete PHD-Finger (PHD1 und PHD2) in der Lage sind sowohl an methylierte als auch acetylierte Histone H3 und H4 zu binden (Lange *et al.* 2008). Für die Bindung an acetylierte Histonreste war bisher nur die Bromodomäne bekannt. Die PHD-Finger der DPF3b-Isoform binden an H3K4me1, H3K4me2, H3K14ac, H3K9ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac. Die zweite Isoform, DPF3a, kann mit dem halben PHD-Finger und dem spezifischen C-Term weder Histone noch Histonmodifikationen erkennen, was andere regulatorische Funktionen bei dieser Isoform vermuten lässt.

1.3.3. Chromatin Remodeling Komplexe

Chromatin Remodeling Komplexe nutzen die freie Energie aus der ATP Hydrolyse um die Nukleosomenstruktur zu verändern. Die Histonoktamere werden entweder direkt entlang der DNA verschoben oder die DNA wird aus dem Histonoktamer abgelöst, wobei sich eine DNA-Schleife bildet (Kassabov *et al.* 2003). Bisher wurden verschiedene Chromatin Remodeling Komplexe identifiziert. Dazu gehören unter anderem ISWI, INO80, CHD/Mi-2 und SWI/SNF Komplexe, die sich alle durch die Zusammensetzung ihrer Untereinheiten charakterisieren (Ebbert *et al.* 1999; Vignali *et al.* 2000).

BAF Chromatin Remodeling Komplexe gehören zu der Familie der SWI/SNF Komplexe und werden durch das Vorhandensein von zwei Kernuntereinheiten (BRG1 oder BRM) charakterisiert. BRG1 und BRM enthalten ATP-ase Aktivität und eine Bromodomäne, die acetylierte Histone und andere Proteine erkennt (Simone 2006). Weiterhin verfügen diese Komplexe über mindestens 10 weitere Untereinheiten, deren Zusammensetzung jedoch je nach Gewebe oder Entwicklungsstadium variieren kann (Lessard *et al.* 2007; Ho *et al.* 2009). Als Beispiel dient der BAF Chromatin Remodeling Komplex im Herzen. Dieser Komplex verfügt über eine BAF60c (Smarcd3) Untereinheit, die essentiell für die Funktionen des BAF Chromatin

Remodeling Komplexes während der Mauserentwicklung ist (Lickert *et al.* 2004). Weitere Studien zeigen, dass das Vorhandensein dieser Untereinheit zusammen mit den Transkriptionsfaktoren GATA4 und TBX5 essentiell ist, um das Mausmesoderm zu Herzgewebe zu differenzieren (Takeuchi and Bruneau 2009). Weiterhin enthält dieser Komplex den bereits beschriebenen gewebespezifisch exprimierten Transkriptionsfaktor DPF3, der an acetylierte und methylierte Histone binden kann und dadurch eine Rolle in dem Führen des BAF Chromatin Remodeling Komplexes zu muskelspezifischen Genloci spielen kann.

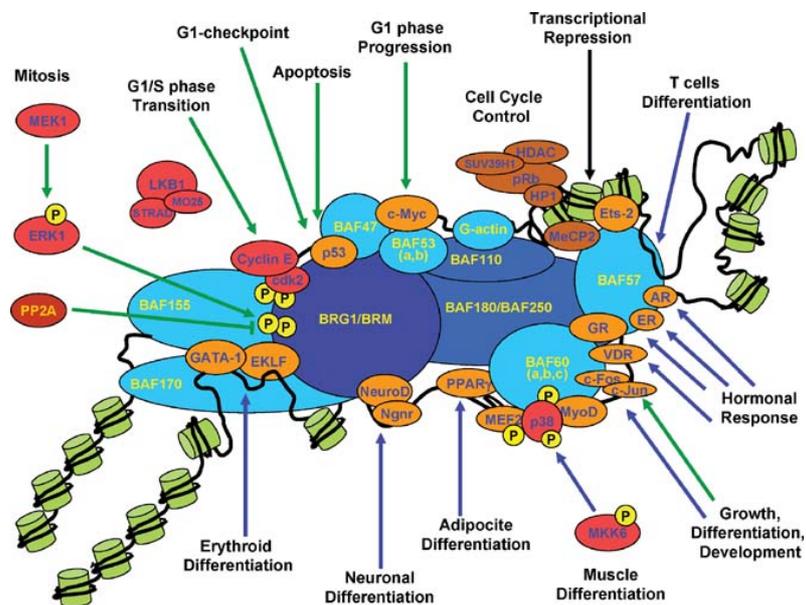


Abbildung 1-6: Eine schematische Darstellung des BAF Chromatin Remodeling Komplexes und der Signalwege an denen der Komplex beteiligt ist (Simone 2006).

1.4. Dimerisierung von Transkriptionsfaktoren

Dimerisierung von Proteinen ist ein häufiger Prozess der bei verschiedenen Vorgängen in der Zelle stattfindet. Ein wichtiges Beispiel sind die nuklearen Rezeptoren des Typs I, die Homo- und Heterodimere bilden, nachdem sie Liganden gebunden haben. Ohne Liganden befinden sich die Transkriptionsfaktoren im Cytoplasma in Form von Monomeren, die mit Hitzeschockproteinen assoziiert sind. Die Bindung des Liganden bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, eine Dissoziation der Hitzeschockproteine und die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren. Die Dimerisierung ist notwendig, damit die Proteine aktiv werden, in

EINLEITUNG

den Zellkern wandern und dort als Transkriptionsfaktoren wirken können. Nur als Dimere mit zwei symmetrisch angeordneten DNA-Bindedomänen können die Transkriptionsfaktoren an die palindromischen Erkennungssequenzen der DNA binden (Aranda and Pascual 2001).

Man kann zahlreiche weitere Beispiele nennen wo eine Dimerisierung eine essentielle Rolle in der Regulation der Genexpression spielt. Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte die Dimerisierung des epigenetischen Transkriptionsfaktors DPF3, einer Komponente des BAF Chromatin Remodeling Komplexes untersucht werden. Bis jetzt wurde nicht beschrieben, ob die Untereinheiten des BAF Chromatin Remodeling Komplexes Dimere ausbilden können. Studien zeigen aber, dass die Chromatin Remodeling Faktoren oft als Co-Regulatoren der nuklearen Rezeptoren fungieren können (Aranda and Pascual 2001).

2. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die potentielle Homo- und/oder Heterodimerisierung des epigenetischen Transkriptionsfaktors DPF3 zu untersuchen. Beide DPF3 Isoformen sind als Bestandteile des BAF Chromatin Remodeling Komplexes identifiziert worden (Lange *et al.* 2008). Unpublizierte Daten geben bereits Hinweise darauf, dass die Proteine Homodimere ausbilden können.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Homo- und Heterodimerbildung zwischen beiden DPF3 Spliceformen. Als Methode wird der GST-Pull-down Assay verwendet, der einen *in vitro* qualitativen Nachweis der Interaktionen zwischen Proteinen ermöglicht.

Falls die DPF3 Isoformen Dimere ausbilden, soll mithilfe von GST-Pull-down Assays nach der möglichen Dimerisierungsdomäne gesucht werden. Dazu sollen verschiedene Deletionskonstrukte des DPF3 Transkriptionsfaktors verwendet werden. Weiterhin sollen ebenfalls mit GST-Pull-down Assays die Interaktionen zwischen DPF3 und zwei weiteren Mitglieder der d4 Genfamilie, DPF1 und DPF2, untersucht werden, da diese untereinander eine hohe Konservierung aufweisen.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Invitrogen
Ampicillin	AmpliChem
APS	Merck
Antarctic Phosphatase Buffer	New England BioLabs Inc.
Rothphorese [®] NF-Acrylamid/Bis 30%	Roth
Bidestilliertes H ₂ O	MPI Berlin
Borsäure	Merck
Bradfordreagenz	Sigma
BSA mol. boil grade 500µg/ml	Biolabs
Chloramphenicol	Biomol
dNTPs	MPI Berlin
DAPI	Invitrogen
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco
DTT	Sigma
<i>ECL Plus Western Blotting Detection System</i>	GE Healthcare
EDTA	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
FSB (Fetales Kälberserum)	SAFC Bioscience
Glucose	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Merck
Hefeextrakt	Merck
HCl	Merck
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Fermentas
Isopropanol	Merck
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
KOH	Merck

MATERIAL UND METHODEN

L-Glutathione, reduziert	Sigma
Magermilchpulver	Roth
Methanol	Merck
MES	Sigma
MgSO ₄	Invitrogen
MOPS	Sigma
Mowiol	Roth
NaCl	Merck
NaOH	Merck
Na ₃ VO ₄	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
NP-40 (Nonidet P-40 IGEPAL)	Sigma
NuPAGE™ LDS Probenpuffer 4x	Invitrogen
PBS, <i>cell culture grade</i>	Sigma
PEI 1x (Polyethylenimin)	Polysciences Inc.
Penicillin/Streptomycin Lösung, <i>cell culture grade</i>	Gibco
Protease Inhibitor Coctail	Roche
Protease and Phoshatase Inhibitor Coctail	Sigma
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Quick Ligation Buffer 10x	New England BioLabs Inc.
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma
TEMED	Invitrogen
TrisBase	Sigma
Triton-X	Sigma
Trypton	Merck
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween20, nuclease free	Sigma
ZnAc	Roth

3.2. DNA Größenmarker

1kB DNA Ladder	New England BioLabs Inc.
100bp DNA Ladder	New England BioLabs Inc.

MATERIAL UND METHODEN

	Phosphatase Inhibitor Cocktail 1/3333Vol Benzonase Der Puffer wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.
GST-Protein Elutionspuffer	30mM L-Glutathion, reduziert 50µM ZnAc 50mM Tris pH 8.0 150mM NaCl 0,2% Triton-X Der pH 8.5-9.0 wurde mit 2M NaOH eingestellt. Der Puffer wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.
25x Protease Inhibitor Coctail	1 Tablette wurde in 2ml bidest. H ₂ O gelöst und bei -20C gelagert.
HEK293T-Lysepuffer	20mM Tris pH 7.4 150mM NaCl 1mM EDTA 1% Triton-X 100 200mM Na ₃ VO ₄ 1mM DTT 0,1mM PMSF 1/3333Vol Benzonase 1x PIC Der Puffer wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.

MATERIAL UND METHODEN

Co-IP Puffer	200mM Tris pH 7.4 150mM NaCl 1mM EDTA 1% Triton-X 100 200mM Na ₃ VO ₄ 1mM DTT 0,1mM PMSF 1x PIC Der Puffer wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.
Bindungspuffer	50mM Tris pH 7.5 1M NaCl 0,1% NP40 50µM ZnAc
MOPS KOH Puffer	1M MOPS Der pH Wert wurde auf 7.9 mit KOH Plättchen eingestellt.
1xPBS	8g/l NaCl 0,2g/l KCl 0,2g/l KH ₂ PO ₄ (Anhydrid) 1,15g/l Na ₂ PO ₄ (Anhydrid)
10xTBE Puffer	890mM Tris 890mM Borsäure 20mM EDTA pH 8.0 Für den Gebrauch wurde der Puffer 1:20 auf 0,5x TBE verdünnt.

3.5. Medien

3.6. 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

3.7. Zellkulturmedium und Lösungen zum Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

HEK293T Medium	DMEM Medium (mit 1g/l Glucose und Zusatz von Natriumpyruvat) 10%FBS 1%Penicillin/ Streptomycin 10mg/ml (Endkonz. 100 µg/ml)
----------------	--

Trypsin/EDTA

Eine gebrauchsfertige Lösung,
welche aliquotiert und bei -20 °C
gelagert wurde.

3.8. Enzyme

Tabelle 3-1: Zusammenstellung aller während der Laborarbeiten benutzten Enzyme.

Name	Volumenaktivität	Firma
T4 DNA Ligase	400U/μl	New England BioLabs. Inc.
Antarctic Phosphatase	5U/μl	New England BioLabs. Inc.
Phusion DNA Polymerase	2U/μl	Finnzymes
Platinum Pfx Polymerase	2,5U/μl	Invitrogen
Hot Star Taq Polymerase	5U/μl	Qiagen
Benzonase	25U/μl	Merck

3.8.1. Restriktionsenzyme

Folgende Restriktionsenzyme wurden für Klonierungen verwendet:

BamHI, EcoRI, NotI, PstI, Sall, SmaI, XhoI

Alle Enzyme waren von der Firma New England BioLabs Inc. und hatten eine Enzymaktivität von 20U/μl.

3.9. Primer

Tabelle 3-2: Auflistung aller für Klonierungen benutzten Primer.

Name	Sequenz	Gen	Acession number	Orientierung
gata4_h_xaa2_xhoi_f	cagtactcgaggtatcagagcttggccatggc	gata4	nm_002052	Vorwärts
gata4_h_stop_psti_r	cagtactgcagttacgcagtgattatgtcccctg	gata4	nm_002052	Rückwärts
gata4_h_xaa2_sali_f	cagtagtcgacgtatcagagcttggccatggc	gata4	nm_002052	Vorwärts
gata4_h_stop_xhoi_r	cagtactcgagttacgcagtgattatgtcccctg	gata4	nm_002052	Rückwärts
dpf1_h_xxaa2_bamhi_f_new	cagtaggatccttggcactgtcatccctggc	dpf1	nm_001135155	Vorwärts
dpf1_h_xaa2_bamhi_f	cagtaggatccttggcactgtcatccctggc	dpf1	nm_001135155	Vorwärts
dpf1_h_stop_noti_r	cagtagcggccgcctaggtgagggtgatgtaag	dpf1	nm_001135155	Rückwärts
dpf2_h_xaa2_xhoi_f	cagtactcgagggcgctgtggtggagaat	dpf2	nm_006268	Vorwärts
dpf2_h_stop_psti_r	cagtactgcagcaagaggagtctgtgtct	dpf2	nm_006268	Rückwärts
dpf2_h_aa2_smai_f	cagtaccggggcgctgtggtggagaatg	dpf2	nm_006268	Rückwärts
dpf1_h_xxaa258_bamhi_f	agtaggatccaacacacagccaagaaggc	dpf1	bc125153	Vorwärts
dpf1_h_stop_ecori_r	cagtagaattcctaggtgagggtgatgta	dpf1	bc125153	Rückwärts
hdpf1_ecori_stop	cagtagaattcctaggtgagggtgatgtaagca	dpf1	nm_006268	Rückwärts
hdpf2_ecori_stop	cagtagaattcctcaagaggagtctgtgtctgg	dpf2	nm_006268	Rückwärts
dpf1_h_full_xstart_bamhi_f	cagtaggatcctggcggcctcagcgccccgcc	dpf1	nm_001135155	Vorwärts
dpf1_h_exon1_start_f	gcggcagagcggcgcgca	dpf1	nm_001135156	Vorwärts
dpf1_h_exon3a_r	ggtagaagtcctcgcctagg	dpf1	nm_001135155	Rückwärts
dpf1_h_xaa1_bamhi_f	cagtaggatcctatggcactgtcatccct	dpf1	nm_001135155	Vorwärts
hey1_h_xxaa2_bamhi_f	cagtaggatccttaagcgagctcaccccgag	hey1	nm_012258	Vorwärts
hey1_h_stop_ecori_r	cagtagaattctaaaagctccgatctccgt	hey1	nm_012258	Rückwärts

3.10. Plasmide

Tabelle 3-3: Die für Klonierungen verwendeten Plasmide.

Name	Größe	Resistenzgen	Art des Vektors	Proteintag
pGEX3x-GST-Vektor	4952bp	Ampicillin	bakterieller Expressionsvektor	GST
pTL-FlagC-Vektor	5776bp	Ampicillin	Säugetier-Expressionsvektor	Flag

3.11. Antikörper

Tabelle 3-4: Zusammenstellung aller primärer und sekundärer Antikörper, die für Western-Blot (WB) und Immunofluoreszenzexperimente (IF) verwendet wurden.

Primäre Antikörper	Firma	Verdünnung im WB	Verdünnung in IF
anti-GST, rabbit polyclonal	Zymed 71-7500	1:2000	
anti-FLAG M2, mouse monoclonal	Sigma F3165	1:600	1:300
Sekundäre Antikörper	Firma	Verdünnung im WB	Verdünnung in IF
anti-mouse IgG (HRP), goat polyclonal	Sigma A0168	1:10000	
anti-rabbit IgGMA (HRP), mouse monoclonal	Sigma A2074	1:10000	
anti-mouse IgG (Alexa Flour 488)	Invitrogen A10631		1:2000

3.12. Geräte und sonstige Materialien

24well Platte	TPP
p150 Zellkulturschalen	TPP
T-75 Zellkulturflaschen	TPP
Bio Photometer	Eppendorf
Blotting Apparatur	Invitrogen
CO ₂ Brutschrank	Heraeus
Curix60 Entwickler Maschine	Afga
Deckgläser	Roth
Digitalkamera	Canon
Einmalküvette, UVette	Eppendorf
Einmalküvetten	Sarstedt
Filmkassette	FUJIFILM

MATERIAL UND METHODEN

Fast Plasmid Mini Kit	S Prime
Gel Doc 2000	Biorad
Glasplättchen	Roth
Glutahione Sepharose 4B	GE Healthcare
Laborverbrauchsmaterial	Eppendorf, Greiner, TPP, Corning
LDS-NuPAGE Gelelektrophorese System	Invitrogen
SDS-PA-Gelelektrophorese System	Biorad
Mikroskope	Zeiss
Neubauer Improved Zählkammer	Roth
NuPAGE® 4-12 %iges Bis-Tris Gel	Invitrogen
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel-Gläser
Streptavidin Dynal Dynabeads M-28	Invitrogen
pH-Meter	Radiometer
Power Supply EPS 1001	Amersham
Immobilion-PSQ, PVDF Membran 0,2 µm	Millipore
QIAfilter Plasmid Purification Kit	Qiagen
Röntgenfilm FUJI MEDICAL X-RAY	SuperRX
Rotierrad	Labinco
Schüttelinkubator	Roth
Schüttler R010	Gerhard
Stericup Filtration System	Millipore
Sterilwerkbank	Heraeus
Streptavidin Dyna Dynal Beads	Invitrogen
Syringe Filter 0,2 µm	Gelman
Thermocycler PTC100,	MJ Research Inc.
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Ultraschall Desintegrator	Branson
Vortexer	Scientific Industries
Waagen	Sartorius
Wizard® SV PCR Clean up System Kit	Promega
Whatman Filterpapier	Whatman
Zellkultur-Verbrauchsmaterial	Greiner, TPP, Corning
Zentrifugen	Eppendorf

3.13. Zellbiologische Methoden

3.13.1. HEK293T Zellen

Die HEK293 Zelllinie ist entstanden durch Transformation von humanen embryonalen Nierenzellen (human embryonic kidney, HEK-Zellen) mit den DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5. Spezifisch wurden 4,5 kB des Virusgenoms in die DNA der Zellen eingebaut. Eine bestimmte Variante der HEK-Zellen ist die HEK293T-Zelllinie, die zusätzlich ein „SV large T-Antigen“, ein Oncogen abgeleitet von dem Similian Vacuolating Virus 40 Protein, exprimiert. Das Vorhandensein des Proteins in den Zellen ermöglicht die Replikation aller episomalen Plasmide die einen „SV40 origin of replication“ enthalten.

In dieser Arbeit wurde die HEK293T-Zelllinie zur Expression der Flag-Fusionsproteine eingesetzt.

3.13.2. Zellkulturarbeiten

Während der Arbeiten in der Zellkultur wurde stets auf Sauberkeit geachtet. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank und mit sterilen Lösungen und Materialien durchgeführt. Die Zellkulturmedien, Trypsin und PBS wurden bei 4°C gelagert und vor der Arbeit auf 37°C erwärmt. Alle Gegenstände, Flaschen und Schalen wurden vor dem Platzieren unter der Sterilbank von außen mit einem Desinfektionsmittel gereinigt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in einer wasserdampfhaltigen Atmosphäre (5% CO₂-Gehalt) kultiviert.

3.13.3. Auftauen der HEK293T Zellen

HEK293T Zellen können für längere Zeit im flüssigen Stickstoff gelagert werden. Sie befinden sich dabei in einem speziellen Einfriermedium in Kryoröhrchen. Einmal aufgetaut können die Zellen bis zur ca. 30. Passage kultiviert werden. Danach ist die Fähigkeit zur Proliferation stark vermindert.

MATERIAL UND METHODEN

Die Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff geholt und auf Trockeneis transportiert. Die Zellen wurden dann schnell in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in 5ml frisches Medium (HEK293T-Medium) überführt und 5min bei 500xg und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 5ml frischem Medium resuspendiert und in eine T-75 Zellkulturflasche mit vorgelegten 10ml Medium überführt.

3.13.4. Kultivierung von HEK293T Zellen

Die HEK293T Zellen wurden in T-75 Zellkulturflaschen kultiviert. Nach dem Erreichen von 70-80% Konfluenz (alle 3 bis 4 Tage) wurden die Zellen 1:10 umgesetzt. Dafür wurde das HEK293T-Medium von den Zellen abgesaugt. Die Zellen wurden mit 10ml 1xPBS gewaschen und mit 2ml Trypsin/EDTA für ca. 1min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt diente der Ablösung adherenter Zellen von dem Boden der Zellkulturflaschen. Sofort nach der Inkubation mit Trypsin/EDTA wurde zu der Zellkulturflasche 8ml Medium zugegeben und gründlich resuspendiert. Von der Zellsuspension wurde dann 1ml abgenommen und in eine neue Zellkulturflasche mit 15ml vorgelegtem Medium ausgesät.

3.13.5. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Improved Zählkammer bestimmt. Um die lebenden Zellen von den toten zu unterscheiden wurde zunächst die Zellsuspension 1:1 mit dem Farbstoff Trypan Blau verdünnt. Mit 20µl dieser Lösung wurde die Zählkammer befüllt. Das Trypan-Blau kann durch die Zellmembranen toter Zellen passieren und färbt diese blau. Die lebenden Zellen bleiben dabei ungefärbt.

Ausgezählt wurde die Zahl der lebenden Zellen in einem Großquadrat. Es wurden dabei jeweils 4 Großquadrate gezählt und aus den errechneten Werten ein Mittelwert gebildet. Zur Errechnung der Zellzahl pro ml wurde der gezählte Mittelwert mit dem Kehrwert des Kammerfaktors eines Großquadrates und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Der Kammerfaktor ergibt sich aus dem Volumen des gezählten Quadrats (Quadratfläche x Quadrathöhe), welcher für das gezählte Großquadrat 10^{-4} ml war.

Dadurch ergibt sich folgende Formel:

Zellzahl/ml = Mittelwert x 10^4 x Verdünnungsfaktor

3.13.6. Aussäen der HEK293T Zellen für die Transfektion

Zum Aussäen von HEK293T-Zellen für die Transfektion wurde eine T-75 Flasche mit dicht gewachsenen HEK293T Zellen (Konfluenz 70-80%) genommen. Mit den Zellen wurde genauso vorgegangen wie bei der Umsetzung in eine neue Flasche (3.13.4) Vor dem Aussäen wurde jedoch die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt (3.13.5). Für die Transfektion wurden dann $3 \cdot 10^6$ Zellen in einer p150 Zellkulturschale in 30ml HEK293T-Medium ausgesät. Vor dem Aussäen wurden je 3 Glassplättchen auf dem Boden jeder Zellkulturschale plaziert, die für eine spätere Immunofluoreszenzfärbung der Zellen dienten (3.15.3)

3.13.7. Transfektion der HEK293T Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transfektion der HEK293T Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mit dem PEI (Polyethylenimin) Transfektionsreagenz. Polyethylenimin ist eine mehrfach positiv geladene Polymerverbindung, die mit der negativ geladenen DNA wechselwirkt und deren Aufnahme in die Zellen ermöglicht.

Die Transfektion erfolgte 48h nach dem Aussäen der Zellen (3.13.6). Drei Stunden vor der Transfektion wurde das HEK293T-Medium gewechselt, wobei 27ml statt 30ml frisches Medium zu den Zellen zugegeben wurde.

Der gesamte Transfektionsansatz wurde in serumfreien DMEM Medium angesetzt. Dazu wurde zunächst 30 μ g Plasmid-DNA in 1,5ml Medium gelöst. Separat dazu wurde 90 μ l 1xPEI in 1,5ml Medium gelöst. Danach wurden beide Ansätze vereinigt, gut vermischt und bei RT 15min stehen gelassen. Schließlich erfolgte die Zugabe des gesamten Transfektionsansatzes zu den Zellen.

24h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit 10ml 1xPBS gewaschen und mit 30ml frischen HEK293T-Medium versetzt. Nach 48h wurden die Zellen geerntet (3.13.8).

3.13.8. Ernte der transfizierten HEK293T Zellen

Zunächst wurden die Glasplättchen für die spätere Immunfluoreszenzfärbung aus der p150 Zellkulturschale entfernt (3.15.3). Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 10ml kaltem 1xPBS gewaschen. Zu jeder Zellkulturschale wurde 2ml kalter HEK293T-Lysepuffer gegeben. Die Schalen für die Zellyse wurden 30min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellysate für 15min bei 18000xg und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und vereinigt. Nachdem die Proteinkonzentration mit dem Bradford-Test (3.15.4) bestimmt wurde, wurden die Überstände aliquotiert (250µl Aliquots) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Gelagert wurden die Zellysate bei -80°C. Die aufgetauten Aliquots wurden nur einmal benutzt.

3.14. Molekularbiologische Methoden

3.14.1. *Escherichia coli* (*E.coli*) Stamm DH10B

Der Stamm wurde für die Vermehrung der Plasmid-DNA eingesetzt. Er ist besonders gut geeignet für die Transformation und Vermehrung von großen Plasmiden.

3.14.2. Transformation von hitzekompetenten *E.coli* (DH10B) mit Plasmid-DNA

Die hitzekompetenten *E.coli* Zellen des Stammes DH10B (100µl der Bakteriensuspension) wurden auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurde 1µg Plasmid-DNA (oder 5µl eines Ligationsansatzes) zugegeben und 40min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 45sek dem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Durch dieses Vorgehen sollten die Bakterienzellen die Plasmid-DNA aufnehmen. Sofort nach dem Hitzeschock wurde zu dem Ansatz 1ml LB-Medium ohne Antibiotikum zugegeben. Der Ansatz wurde dann 30min bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 1min bei 8600xg zentrifugiert. 800µl Überstand wurde abgenommen, das Bakterienpellet in dem

restlichen Überstand resuspendiert und vollständig auf einer LB-Amp-Agar-Platte ausplattiert. Diese wurden dann bei 37°C über Nacht (ÜN) inkubiert.

3.14.3. Übernachtkulturen von *E.coli* (DH10B)

Die Übernachtkulturen wurden in 3ml LB-Amp-Medium mit einem Klon aus der LB-Amp-Agar-Platte angeimpft und ÜN bei 37°C geschüttelt.

3.14.4. Glycerinstocks von *E.coli* (DH10B)

Ein 500µl Aliquot aus der Übernachtkultur wurde mit 500µl 50% Glycerinlösung in einem Kryovial vermischt und anschließend auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.14.5. Plasmidisolierung von *E.coli* (DH10B)- Mini Preps

Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem „Fast Plasmid Mini Kit“ der Firma Eppendorf nach Herstellerangaben.

3.14.6. Plasmidisolierung von *E.coli* (DH10B)- Midi Preps

Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem „QIAfilter Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

3.14.7. *E.coli* Stamm BL21prare3

Dieser Bakterienstamm wurde benutzt um die Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteine (GST-Fusionsproteine) zu exprimieren. Der Stamm trägt ein T7 RNA Polymerase Gen unter Kontrolle eines lac Promotors. Zusätzlich verfügt er über ein Plasmid, das 11 tRNA Gene und ein Chloramphenicolresistenzgen kodiert. Während der Laborarbeiten wurden diese Bakterienzellen mit Plasmiden transformiert, die

MATERIAL UND METHODEN

gewünschte GST-Fusionsproteine kodieren und einen T7 Promotor enthalten. Die Bakterien wurden in einem glucosereichen Medium wachsen gelassen. Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte durch Zugabe von IPTG.

3.14.8. Transformation von hitzekompetenten *E.coli* (BL21prare3) mit Plasmid-DNA

50µl hitzekompetente *E.coli* Zellen des Stammes BL21prare3 wurden ca. 20min auf Eis aufgetaut und mit 1µg Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wurde für 30min auf Eis inkubiert und anschließend für 45sek dem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Der Ansatz wurde erneut 2min auf Eis inkubiert und danach mit 400µl LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 1h bei 37°C unter ständigem Schütteln. Der Ansatz wurde 1min bei 8600xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 100µl LB-Medium resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde dann auf eine LB-Amp-Cm-Agar-Platte ausplattiert und bei 37°C ÜN inkubiert.

3.14.9. Vor- und Hauptkulturen von *E.coli* (BL21prare3)

Von der LB-Amp-Cm-Agarplatte wurden mehrere Klone gepickt und in 10ml LB-Amp-Cm-Medium überführt. Die Kultur wurde bei 37°C ÜN geschüttelt.

Am nächsten Tag wurde die optische Dichte der Vorkultur bestimmt. Die Hauptkultur (200ml) wurde mit dem entsprechenden Volumen an Vorkultur angeimpft, so dass die optische Dichte der Hauptkultur am Anfang 0.15 betrug. Dieser Wert ergibt sich aus der Formel:

$$\text{Angesetztes Volumen der Vorkultur} = \left[\frac{\text{gewünschtes Volumen der Hauptkultur} * \text{gewünschte Anfang OD}_{600} \text{ der Hauptkultur (0,15)}}{\text{gemessene OD}_{600} \text{ der Vorkultur}} \right]$$

Die Hauptkultur wurde in LB-Amp-Cm Medium mit 20mM Mops KOH Puffer, 50µM ZnAc und 0,2% Glucose bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei 37°C auf dem Schüttler wachsen gelassen. Im Anschluss erfolgte die Expression der Proteine (3.14.10).

3.14.10. Expression von GST-Fusionsproteinen

Sobald die *E.coli* (BL21prare3) Hauptkulturen die optische Dichte von 0,5 erreicht haben, erfolgte die Expression der GST-getagten Proteinen. Die Proteinexpression wurde mit 200µl 1M IPTG induziert. Die Bakterien wurden dann für 4h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur 20min bei 3800xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bei -80°C gelagert.

3.14.11. Bestimmung der optischen Dichte

Für die Messung wurde 50µl der Bakterienkultur 1:10 in LB-Medium verdünnt und in eine Kunststoffküvette überführt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte photometrisch bei der Wellenlänge von 600nm und unter Beachtung des Verdünnungsfaktors.

3.14.12. PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) diente der Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz für eine spätere Insertion in den Vektor. Im Laufe der Laborarbeiten wurden die verschiedenen PCR Reaktionen mit drei hitze-stabilen DNA Polymerasen (Phusion DNA, Platinum Pfx und Hot Star Taq Polymerasen) durchgeführt. Für jedes Enzym wurden andere Pufferlösungen, Mengen an Primer- und Template-DNA und Reaktionsbedingungen gewählt. Die Tabelle faßt alle drei Reaktionsansätze zusammen.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3-6: Pipettierschema der PCR Reaktionsansätze zur Vervielfältigung der Insert Sequenzen mit drei verschiedenen DNA Polymerasen: Platinum Pfx, dHot Star Taq und Phusion DNA Polymerase.

Platinum Pfx Polymerase		Hot Star Taq Polymerase		Phusion DNA Polymerase	
Template DNA	1ng	Template DNA	10ng	Template DNA	1ng
10 μ M Vorwärtsprimer	3 μ l	10 μ M Vorwärtsprimer	2 μ l	10 μ M Vorwärtsprimer	2 μ l
10 μ M Rückwärtsprimer	3 μ l	10 μ M Rückwärtsprimer	2 μ l	10 μ M Rückwärtsprimer	2 μ l
5mM dNTPs	6 μ l	5mM dNTPs	4 μ l	5mM dNTPs	2 μ l
50mM MgSO ₄	3 μ l	10x PCR Buffer	10 μ l	5x Phusion Buffer HF	10 μ l
10x PCR Enhancer Solution	10 μ l	5U/ μ l Hot Star Taq Polymerase	0,2 μ l	2U/ μ l Phusion Polymerase	0,5 μ l
10x Pfx Amplification Buffer	10 μ l	bidest. H ₂ O	ad 100 μ l	bidest. H ₂ O	ad 50 μ l
2,5U/ μ l Platinum Pfx DNA Polymerase	1 μ l				
bidest. H ₂ O	ad 100 μ l				

Als Template wurde entweder Plasmid-DNA (1ng,10ng) oder 4 μ l von 1:4 verdünnter HEK293T cDNA eingesetzt. Die HEK293T cDNA stand bereits zur Verfügung und war durch Umschreibung von 1 μ g RNA mit Reverser Transkriptase in 20 μ l Reaktionsansatz hergestellt worden. Die benutzten Primer wurden so gestaltet (3.14.13), dass die spätere Klonierung der amplifizierten DNA-Stücke mit Restriktionsendonukleasen durch Ligation in die Expressionsvektoren (3.14.17) stattfinden kann. Die Vervielfältigung erfolgte mithilfe eines Thermocyclers, wobei der PCR Ablauf für jede Reaktion optimiert wurde. Im Allgemeinen wurden für alle PCR Reaktionen immer 35 Zyklen durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus erfolgte ein Enzymaktivierungsschritt bei 95°C. Dieser Schritt dauerte 2min für die Polymerasen Phusion DNA und Platinum Pfx und wurde auf 10min für die Hot Star Taq Polymerase verlängert.

Jeder durchlaufene Zyklus bestand aus dem Denaturierungs-, Primerhybridisierungs- und Elongationsschritt. Für jeden der folgenden Schritte wurden die Temperaturen je nach der PCR Reaktion optimiert. Der Denaturierungsschritt erfolgte für 10sek bei 95°C. Die Primerhybridisierung dauerte 30sek. Die benutzte Primerhybridisierungstemperatur hing jeweils von dem GC-Gehalt der Primersequenz ab (3.14.13). Die Elongationstemperatur betrug 72°C für die Hot Star Taq und Phusion DNA Polymerase und 68°C für die Platinum Pfx Polymerase. Weiterhin dauerte die Elongation 60 bis 90sek, je nach Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz (für Sequenzen länger als 1000bp wurden 90sek gewählt). Nach Ende dieses Schrittes fing sofort der neue Zyklus an.

Anschließend wurden die Reaktionsansätze nach dem letzten Zyklus 5min bei der Elongationstemperatur weiter inkubiert und dann auf 4°C abgekühlt.

3.14.13. Primerdesign

Viele von den für die Klonierung benötigten Primern wurden von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bereits benutzt und standen zur Verfügung. Jedoch mussten mehrere Primer neu designed werden.

Die konstruierten Primer mussten mehrere Voraussetzungen erfüllen. Vor allem wurden die Primersequenzen so gewählt, dass die gesamte Insert DNA-Sequenz amplifiziert werden konnte. Dabei sollten der Vorwärts- und Rückwärtsprimer kein Start- und Stopkodon enthalten; die benutzten Expressionsvektoren tragen selbst ein Start- und Stopkodon. Damit die Insert-DNA in den Vektor eingebaut werden konnte, sollten durch Primer die Restriktionsschnittstellen an 5'- und 3'-Enden der Insert-DNA eingebaut werden. Dabei wurde auch darauf geachtet, dass es keine internen Restriktionsschnittstellen in Vektor- und Insertsequenzen gibt. Die Primer wurden so erstellt, dass die DNA-Sequenz in dem Vektor „in frame“ insertiert werden kann. Nur dadurch kann bei der Translation ein funktionsfähiges Fusionsprotein entstehen.

Die Länge der Primer sollte 30bp nicht überschreiten. Die Primerhybridisierungstemperatur in °C wurde für einzelne Primer mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Hybridisierungstemperatur} = [4^{\circ}\text{C} * (\text{C}+\text{G}) + 2^{\circ}\text{C} * (\text{A} + \text{T})] - 5^{\circ}\text{C}$$

MATERIAL UND METHODEN

Vorwärts- und Rückwärtsprimer sollten möglichst einen gleichen GC-Basenpaargehalt besitzen, um bei errechneter Temperatur zusammen zu hybridisieren.

3.14.14. Restriktionsverdau

Für eine anschließende Ligation wurden 5µg Vektor-DNA und das gesamte PCR Produkt (50 oder 100µl) dem Restriktionsverdau mit zwei verschiedenen Enzymen unterzogen. Für die Reaktion wurden je 40Units von jedem Restriktionsenzym, der von dem Hersteller empfohlene 1x NE Buffer (New England BioLabs. Inc.) und 1x BSA genommen und ÜN bzw. 2h bei vorgeschriebener Temperatur (37°C) inkubiert.

Zur Überprüfung, ob der Vektor nach der Klonierung über das gewünschte Insert verfügt, wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. Für die Reaktion wurden 150ng der Plasmid-DNA mit je 2Units der beiden Restriktionsenzyme, die bei der Klonierung benutzt wurden, in 1x NE Buffer und 1x BSA eingesetzt. Der Verdau erfolgte 2h bei 37°C.

3.14.15. Dephosphorylierung der Vektor-DNA

Nach dem Verdau des Vektors wurde der gesamte Reaktionsansatz mit 1µl Antarktischer Phosphatase (5U/µl) und 5,5µl des zugehörigen Puffers versetzt und 1h bei 37°C inkubiert.

Die Antarktische Phosphatase ist ein Enzym, dass die Dephosphorylierung der 5' und 3' Überhänge in dem geschnittenem Vektor bewirkt. Dadurch wird verhindert, dass die freien Vektor-DNA Enden wieder miteinander ligieren.

3.14.16. Aufreinigung der DNA nach dem Restriktionsansatz

Sowohl der Vektor als auch das PCR Produkt (Insert-DNA) mussten nach dem Restriktionsverdau für weitere Arbeitsschritte aufgereinigt werden.

Die Aufreinigung des PCR Produktes erfolgte mit Hilfe des Kits „Wizard® SV PCR Clean up System“ der Firma Promega nach dem Herstellerprotokoll.

Die geschnittene Vektor-DNA wurde zuerst mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (3.14.19). Die entsprechende Bande, die dem geschnittenen Vektor entspricht, wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA aus dem Gel erfolgte ebenfalls mit dem „Wizard® SV PCR Clean up System“ (Promega) nach dem Herstellerprotokoll für die Gelextraktion.

3.14.17. Ligation

Die nach dem Restriktionsverdau aufgereinigte (3.14.14, 3.14.16) Vektor- und Insert-DNA wurde der Ligrationsreaktion untergezogen. Die Reaktion wurde mit einer T4 Ligase (DNA Ligase des T4 Phagen) durchgeführt. Das Enzym ist imstande sowohl glatte als auch überhängende DNA-Enden miteinander zu verknüpfen.

Für die Reaktion wurde 50ng Vektor- und 150ng Insert-DNA genommen. Zu dem Reaktionsansatz wurden 2µl des 10x Quick Ligation Buffers und 1µl T4 Ligase (400U/µl) zugegeben und mit bidest. Wasser auf 10µl Volumen aufgefüllt. Die Ligation erfolgte 1h bei RT. Anschließend wurden die *E.coli* Zellen des DH10B Stammes mit 5µl des Ligrationsansatzes transformiert (3.14.2).

3.14.18. Re-Ligationstest

Trotz der Dephosphorylierung kann man bei der Ligation nicht vollständig ausschließen, dass sich die linearisierte Plasmid-DNA (Vektor-DNA) nicht wieder schließt ohne die Insert-DNA einzunehmen. Um das zu testen, wurde ein Re-Ligationstest mit dem verdauten Vektor durchgeführt.

Für den Re-Ligationstest wurde 150ng Vektor-DNA mit 1µl T4 Ligase (400U/µl) und 2µl 10x Quick Ligation Buffer versetzt. Der Ansatz wurde mit bidest. Wasser auf 10µl Volumen aufgefüllt und 1h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die *E.coli* DH10B Zellen mit 5µl des Reaktionsansatzes transformiert (3.14.2).

Die Auswertung des Re-Ligationstests erfolgte durch das Auszählen der auf der LB-Amp-Agarplatten gewachsenen Kolonien. Die Anzahl sollte möglichs gering sein.

3.14.19. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Für dieses Verfahren wurden 1-1,5% Agarosegele in 0,5x TBE Puffer hergestellt. Dafür wurde die entsprechende Menge an Agarose mit 50ml 0,5x TBE Puffer vermischt und zum vollständigen Auflösen in der Mikrowelle erwärmt. Die hergestellte Lösung wurde bis ca. 60°C abgekühlt, mit einer Endkonzentration von 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt und zum Aushärten in eine entsprechende Gelkammer überführt.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit DNA Ladepuffer [1x] vermischt. Um die Größe der aufgetrennten DNA Fragmente bestimmen zu können, wurden für das Gel ein 100bp und ein 1kb DNA-Marker verwendet. Die Elektrophorese wurde in 0,5x TBE Puffer bei 80V vollzogen und anschließend unter UV-Licht mit dem GelDoc 200 (Biorad) dokumentiert.

3.14.20. DNA Sequenzierung

Die Sequenzierungen der Plasmid-DNA wurden von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Dafür wurde die DNA Probe zu einer DNA Konzentration von 100ng/µl in 15µl 5mM Tris-HCl pH 8.0 gelöst und zu der Firma gesendet. Die für das Sequenzieren benutzten Primer wurden spezifisch für jedes Plasmid gewählt und von der Firma bereitgestellt. Die benutzten Primer wurden in der Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 3-2: Auflistung der Primersequenzen für die Sequenzierung von Vektoren

Vektor	Forward Sequenzierungsprimer	Reverse Sequenzierungsprimer
pGEX3x-GST-Vektor	pGex_for atagcatggcctttgcgg	pGex_rev gagctgcatgtgtcagagg
pTL-FlagC-Vektor	T7 taatacgaactcactatagg	T7 term ctagttattgctcagcgg

3.15. Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.15.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteingemische aufgetrennt werden. Die Trennung erfolgt im elektrischen Feld unter denaturierenden Bedingungen. Durch Zusatz von SDS (Natriumdodecylsulfat), einem anionischen Tensid, das sich in die Proteinketten lagert, kann die Eigenladung der Proteine überdeckt werden. Die Proteine weisen dann eine konstante Ladungsverteilung auf, die von den SDS-Molekülen stammen und proportional zur Proteingröße sind (je länger die Proteinkette, desto mehr SDS wird gelagert). Dieses Verfahren ermöglicht die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Gelelektrophorese wurde mit zwei verschiedenen Systemen (Biorad oder Invitrogen) durchgeführt. Für das Biorad System wurden 10%-ige SDS-Polyacrylamid-Gele in Glaskammern gegossen. 12%-ige Gele wurden in gebrauchsfertige Plastikammern gegossen und für die Elektrophorese mit dem Invitrogen System benutzt. Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Komponenten zur Herstellung der beschriebenen Gele.

Tabelle 3-3: Pipettierschema zur Erstellung der 10% und 12%-igen SDS-PA-Gele. Die Zusammensetzung des Sammelgels wird ebenfalls gezeigt.

Trenngel			Sammelgel	
	10%	12%		5%
	5ml	6ml		2ml
H₂O	1,9ml	1,9ml	H₂O	1,4ml
30% Bis-acrylamid	1,7ml	2,4ml	30% Bis-acrylamid	330µl
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3ml	1,6ml	1M Tris (pH 6,8)	250µl
10% SDS	50µl	60µl	10% SDS	20µl
10% APS	50µl	60µl	10% APS	20µl
TEMED	2µl	2,4µl	TEMED	2µl

MATERIAL UND METHODEN

Für GST Pull-down Experimente mit biotinylierten Histonpeptiden wurde ein gebrauchsfertiges NuPAGE® 4-12%iges Bis-Tris Gel der Firma Invitrogen verwendet. Für die Gelelektrophorese (Invitrogenkammer) wurde der NuPAGE® MES SDS Laufpuffer verwendet.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben mit 4x NuPAGE® LDS-Ladepuffer (+100mM DTT, zur Zerstörung der Disulfidbrücken) versetzt und 5min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen überführt, wobei bei jedem Gel 4µl des Precision Plus Protein Standard (Biorad) Proteinmarker aufgetragen wurde. Damit die Proteine in das Sammelgel eindringen können, wurden die Gele für die ersten 10min der Spannung von 80V ausgesetzt. Die Proteintrennung mit dem Biorad System wurde dann bei 120V für ca. 90min durchgeführt. Bei dem Invitrogen System erfolgte der Gellauf bei 200V für ca. 60min. In beiden Fällen wurde für die Elektrophorese der SDS-Laufpuffer benutzt. Im Anschluß an die SDS-PAGE wurde ein Western Blot durchgeführt (3.15.2).

3.15.2. Western Blot

In diesem Verfahren wurden die aufgetrennten und denaturierten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte elektrophoretisch nach dem *Wet-Blot*-Verfahren (Invitrogen System). Dafür wurde die Membran zuerst in Methanol und dann zusammen mit Whatman-Filterpapier und Schwämmen in Blot-Puffer eingeweicht. Die feuchte Membran, Gel, Whatman-Filterpapier und Schwämme wurden dann luftblasenfrei und in richtiger Reihenfolge zwischen zwei Elektroden in die Blot Apparatur angeordnet. Es wurde 1h bei 30V geblottet. Schließlich erfolgte die Immunodetektion der Proteine. Dafür wurde die Membran 1h in 3% Magermilchpulver in 0,05%Tween/PBS inkubiert. Dieser Schritt diente der Blockierung der freien, unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran. Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation (1h bei RT oder ÜN bei 4°C) der Membran mit dem primären Antikörper, der spezifisch gegen das nachzuweisende Protein gerichtet war. Die Antikörperlösung wurde dabei in der Blockierungslösung verdünnt. Anschließend wurde die Membran 3 mal 10min mit 0,05%Tween/PBS gewaschen und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in der Blockierungslösung 1h bei RT inkubiert. Der sekundäre Antikörper sollte an den

konstanten Teil der primären Antikörper binden. Nach weiteren drei Waschschrinen erfolgte die Detektion.

An dem sekundären Antikörper ist das Enzym HRP (horseredish peroxidase, Meerretichperoxidase) gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert eine Oxidation von Luminol. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer Chemolumineszenz und die emittierte Strahlung kann mithilfe eines Röntgenfilmes detektiert werden.

Für Auslösung dieser Reaktion wurde der Blot 5min mit dem frisch angesetzten (nach Herstellerangaben) ECL Reagenz der Firma Amersham inkubiert. Die Belichtung der Röntgenfilme erfolgte für 1 bis 30min.

3.15.3. Immunofluoreszenzfärbung

Die Immunofluoreszenzfärbung erfolgte mit den transfizierten HEK293T Zellen, die auf Glasplättchen auf dem Boden der p150 Zellkulturschalen gewachsen sind. Die Glasplättchen wurden vor der Ernte der Zellen vom Boden der Platten entfernt und in eine 24well-Platte mit 0,5ml vorgelegtem Methanol überführt. Es erfolgte eine Inkubation bei -20°C für mindestens 5min (ÜN oder länger). Durch dieses Vorgehen wurden die Zellen fixiert und für spätere Arbeitsschritte vorbereitet.

Nach der Fixierung wurden die Zellen mit 1ml 0,003%Triton/PBS für 15min bei RT zur Permeabilisierung der Zellmembranen versetzt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Antikörper 1:50 verdünnt in 150 μl 0,003%Triton/PBS) erfolgte 1h bei RT. Danach wurden die Zellen viermal mit 0,003%Triton/PBS gewaschen und anschließend mit 120 μl der in Triton/PBS gelösten sekundären Antikörper (1:500 oder 1:2000 verdünnt) für 45min bei RT inkubiert. Da diese Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, erfolgte die Inkubation im Dunkeln. Für alle darauffolgenden Arbeitsschritte wurden die Glasplättchen vor dem Licht geschützt. Die Glasplättchen wurden nach der Inkubation viermal mit je 1ml 0,003%Tween/PBS und anschließend kurz mit bidest. H_2O gewaschen. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Zellen mit 30 μl 1:1000 verdünnten 100 $\mu\text{g/ml}$ DAPI Lösung 30min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde zum Einbetten auf jedes Glasplättchen ein Tropfen Mowiol gegeben und die Glasplättchen auf einem Objektträger plaziert. Die Detektion der Proteine in den Zellen erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

3.15.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch mithilfe des Bradford-Tests durchgeführt. Das Bradfordreagenz enthält den Farbstoff Coomassie-Brillant-Blue G-250, der in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe ausbildet. Durch diesen Prozess verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470nm (freie Form) auf 595nm (komplexierte Form). Die Absorption bei 595nm ist proportional zur Proteinmenge in der gemessenen Probe. Für die Messung wurde 5µl der Proteinlösung in 450µl 1xPBS gelöst und mit 500µl Bradfordreagenz versetzt. Anschließend wurde die Absorption gegen einen Leeransatz (5µl der Pufferlösung in 450µl 1xPBS und 500µl Bradfordreagenz) bei 595nm am Spektrometer gemessen. Das Gerät wurde vorher mit einer BSA Verdünnungsreihe kalibriert und konnte unter Beachtung des Verdünnungsfaktors die Proteinkonzentrationen berechnen.

3.15.5. Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Bakterienpellets aus 100ml *E.coli* (BL21prare3) Hauptkulturen (3.14.10) wurden auf Eis aufgetaut und in 5ml GST-Protein Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch Behandlung mit Ultraschall. Die *E.coli* Kulturen wurden mit dem Ultraschallgerät (Input „4“) 3mal für 20sek jeweils mit 20sek Pause sonifiziert. Zu den lysierten Zellen wurden 50µl 10% Triton gegeben und 2min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Lysate 20min bei 13800xg und 4°C zentrifugiert.

200µl Glutathione Sepharose 4B der Firma GE Healthcare (Glutathion-Sepharose) wurde für 5min mit 1ml 1xPBS gewaschen (Rotationsrad, 4°C) und 2min bei 1600xg und 4°C abzentrifugiert. Das PBS wurde vollständig abgenommen. Zu der Glutathion-Sepharose wurde der Überstand aus den lysierten Bakterienkulturen gegeben, die Ansätze wurden für 2h bei 4°C auf dem Rotierrad inkubiert und anschließend 2min bei 1600xg und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Glutathion-Sepharose 3x 10min mit 10ml 1xPBS (Rotierrad, 4°C) gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Glutathion-Sepharosepartikel durch zentrifugieren (2min, 1600xg, 4°C) abgesetzt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Glutathion-Sepharose in 500µl 1xPBS resuspendiert. 10µl der Suspension wurde

abgenommen und für die Untersuchung der Bindungseffizienz der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose mithilfe von SDS-PAGE (3.15.1) und Western-Blot (3.15.2) aufgehoben. Der Rest der Glutathion-Sepharose wurde für den GST Pull-down bei 4°C aufbewahrt (3.15.8).

Für den GST-Pull-down mit biotinylierten Histonpeptiden (3.15.9) wurden die GST-Fusionsproteine aus der Glutathion-Sepharose eluiert (3.15.6).

3.15.6. Elution der GST-Fusionsproteine

Sofort nach dem letzten Waschschrift (3.15.5) wurden die Glutathion-Sepharosepartikel mit 500µl GST-Protein Elutionspuffer versetzt und für 15min bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. In Anschluss wurde die Glutathion-Sepharose 2min bei 1600xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Die Glutathion-Sepharose wurde erneut mit 500µl GST-Protein Elutionspuffer versetzt und inkubiert. Die Überstände nach beiden Elutionen wurden vereinigt und 10min bei 13800xg und 4°C zentrifugiert um die Reste der Glutathion-Sepharosepartikeln vollständig abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde gemessen. Das Eluat wurde entweder sofort weiter benutzt oder bis zu zwei Wochen bei 4°C gelagert.

3.15.7. Pull-down

Pull-down ist eine *in vitro* Methode zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen. Diese Methode kann sowohl zur Identifizierung neuer Interaktionspartner eines Zielproteins, als auch zur Bestätigung der schon bekannten Wechselwirkungen zwischen Proteinen benutzt werden. Im Prinzip wird bei diesem Verfahren ein Protein als Köder (bait) benutzt, mit dessen Hilfe andere Proteine (Interaktionspartner) aus dem Proteingemisch isoliert werden. Das bait-Protein ist ein rekombinantes Molekül, das N- oder C-terminal einen Protein-Tag trägt. Durch einen Tag werden die Proteine markiert und können mithilfe affinitätschromatografischer Verfahren aus einem Gemisch isoliert werden.

In dieser Arbeit wurden GST-Pull-downs zur Untersuchung der Interaktionspartner des epigenetischen Transkriptionsfaktors DPF3, sowie zur Untersuchung der Homo-

MATERIAL UND METHODEN

und Heterodimerbildung von DPF3 durchgeführt. Der theoretische Ablauf dieses Experimentes zeigt die Abbildung 3-1.

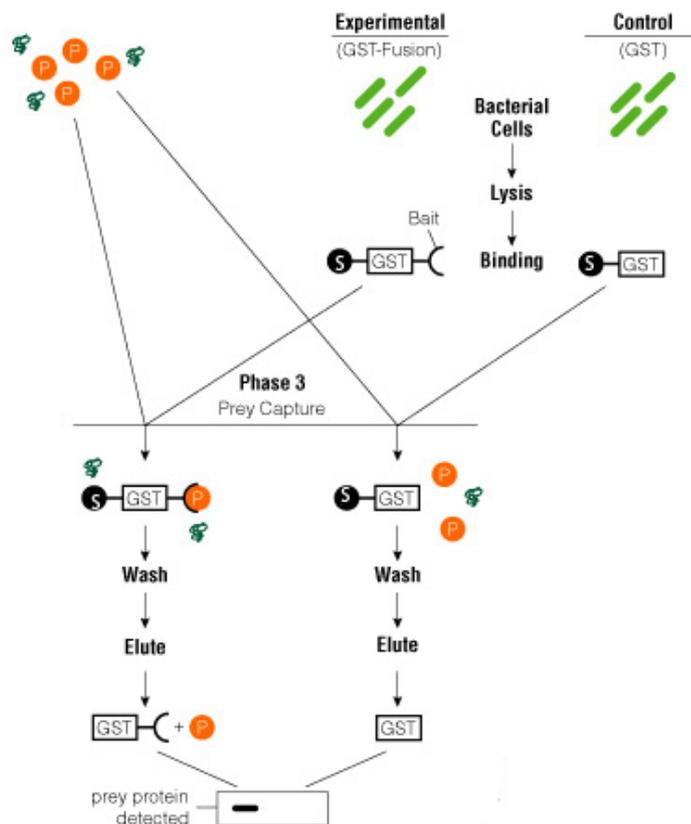


Abbildung 3-1: Schematischer Ablauf eines GST-Pull-down Versuches. Abbildung aus der Promega GmbH Internetseite, modifiziert.

Zuerst werden die GST-Fusionsproteine kloniert (DPF3a und DPF3b) und in *E.coli* BL21prare3 Bakterien exprimiert. Mithilfe von Glutathion-Sepharose wurden die GST-Fusionsproteine aus den bakteriellen Zelllysaten aufgereinigt und an eine Sepharose Matrix gebunden. Die Glutathion-Sepharose mit gebundenen GST-Fusionsproteinen wurde dann mit transfizierten HEK293T-Zelllysaten inkubiert. Die HEK293T Zellen aus denen die Lysate gewonnen wurden, dienen zur Expression der Flag-getaggen Fusionsproteine, der zu untersuchenden Interaktionspartner von DPF3. Das an die Glutathion-Sepharose gebundene GST-Fusionsprotein sollte mit dem Flag-markierten Interaktionspartner interagieren. Nach der Inkubation wurden die Sepharosepartikel gewaschen, um alle nichtgebundenen Proteine zu entfernen. Die

Detektion von Interaktionspartnern erfolgte mithilfe des Western Blots mit einem anti-Flag Antikörper.

3.15.8. GST-Pull-down mit Sepharose

Für den GST Pull-down wurden die HEK293T-Zellysate (3.13.8) mit den aufgereinigten GST-Fusionsproteinen (gebunden an Glutathion-Sepharosepartikel, 3.15.5) in einem Co-IP Puffer inkubiert. Für jeden Ansatz wurden 250µg Protein der HEK293T-Lysate eingesetzt. Von den Glutathion-Sepharosepartikeln wurde stets 150µl für alle Ansätze genommen. Um auszuschließen, dass die Flag-Fusionsproteine unspezifisch mit der Glutathion-Sepharose oder Glutathion-S-Transferase-Tag (GST) wechselwirken, wurde als Kontrolle immer ein Pull-down mit HEK293T-Lysaten und GST ohne Fusionsprotein durchgeführt. Da die Bindungseffizienz für den GST-Tag an die Glutathion-Sepharose viel stärker als für die GST-Fusionsproteine ist, wurde für diese Ansätze nur 37,5µl Glutathion-Sepharose eingesetzt.

Alle Ansätze wurden auf 500µl Volumen mit dem Co-IP aufgefüllt und 1h bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze 2min bei 1600xg und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.15.1) aufbewahrt. Die Sepharosepartikel wurden 3mal 10min mit 1ml Co-IP Puffer gewaschen (4°C, Rotationsrad). Nach jedem Waschschrift wurde die Glutathion-Sepharose für 2min bei 1600xg und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde die Waschlösung möglichst vollständig abgenommen und die Partikel in 15µl 1xPBS resuspendiert. Die Proben wurden mit 4x NuPAGE® LDS-Ladepuffer versetzt und für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.15.1) vorbereitet. Auf ein Gel wurde der gesamte Überstand von den aufgekochten Glutathion-Sepharosepartikeln, die Überstände nach der Inkubation im Co-IP Buffer und als Kontrolle 1% des angesetzten HEK293T-Zellysats aufgetragen.

3.15.9. GST-Pull-down mit biotinylierten Histonpeptiden

Pro Ansatz wurde 1µg eluiertes GST-Fusionsprotein mit 1µg des Histonpeptides (1µg/µl gelöst in 0,25x PBS pH7,0) in 300µl Bindungspuffer ÜN bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden pro Pull-down 10µl der Streptavidin

MATERIAL UND METHODEN

Dynal Beads der Firma Invitrogen (Streptavidin Beads) 3x mit 1ml Bindungspuffer für 15min bei 4°C gewaschen (nach jedem Waschschrift wurden die Proben zum Auftrennen der Streptavidin Beads von der Lösung auf eine magnetisches Rack gestellt) und anschließend in dem Anfangsvolumen (10µl pro Ansatz) wieder resuspendiert. Zu jedem der ÜN inkubierten Ansätzen wurde 10µl von den Streptavidin Beads gegeben und 1h bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Der Überstand wurde dann abgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Die Streptavidin Beads wurden 3mal mit 1ml Bindungspuffer für 15min bei 4°C gewaschen und anschließend in 45µl Bindungspuffer resuspendiert. Die gesamte Suspension wurde mit 4xLDS Probenpuffer versetzt und aufgeköcht. Auf das Gel (3.15.1) wurden 25µl der aufgeköchten Streptavidin Beads und 15µl der abgenommenen Überstände aufgetragen.

4. Ergebnisse

4.1. Zusammenstellung der Proteinkonstrukte für den GST-Pull-down Assay

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Homo- und Heterodimerbildung des epigenetischen Transkriptionsfaktors DPF3 und dessen Interaktionen mit zwei weiteren Mitgliedern der d4-Proteinfamilie, DPF1 und DPF2. Die Dimerbildung und Interaktion mit DPF1 und DPF2 wurde qualitativ *in vitro* mithilfe der GST-Pull-down Methode untersucht (3.15.8). Die dafür benötigten GST- und Flag- Proteinkonstrukte standen nicht vollständig zur Verfügung. Mehrere Flag- und GST-Fusionsproteine wurden zunächst kloniert und ihre Sequenz überprüft. Die Klonierung erfolgte mithilfe der beschriebenen molekularbiologischen Methoden (3.14). Zur Erstellung der GST-Fusionsproteine wurde der Vektor pGEX3x (3.10) und zur Erstellung der Flag-Fusionsproteine der Vektor pTL-Flag-C (3.10) benutzt.

Für die Durchführung der Versuche wurden weiterhin Positiv- und Negativkontrollen benötigt. Als Positivkontrolle wurden die Transkriptionsfaktoren GATA4 und HEY1 eingesetzt. Eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen wurde bereits in der Literatur (Fischer *et al.* 2005) beschrieben. GST- und Flag-getaggte GATA4 und HEY1 Proteine mussten ebenfalls kloniert und deren Sequenzen überprüft werden.

Frühere Versuche (unpublizierte Daten) haben gezeigt, dass die Proteine HEY1 und DPF3b als eine gute Negativkontrolle dienen können. Das HEY1 Protein ist ein Transkriptionsfaktor, welcher bei dem Notch-Signalweg eine Rolle spielt (Niessen and Karsan 2008). Bis jetzt gibt es keine Hinweise auf eine direkte Wechselwirkung zwischen diesem Transkriptionsfaktor und dem BAF Chromatin Remodeling Komplex.

Alle beschriebenen Fusionsproteine wurden in der Tabelle 4-1 zusammengefasst.

ERGEBNISSE

Tabelle 4-1: Zusammenstellung der Plasmide, die zur Expression der GST- und Flag-Fusionsproteine benutzt wurden. Zur Vereinfachung wurden die Klone nur mit einem Kürzel benannt. Weiterhin wurde für jede klonierte Gensequenz Name und Accession number, Organismus und Art des Protein-Tags angegeben.

Gen	Accession number	Art des Protein-Tags	Kürzel
<i>DPF3a</i>	BC026305	GST	CG050
<i>DPF3a</i>	BC026305	Flag	CG052
<i>DPF3b</i>	AY803021	GST	CG049
<i>DPF3b</i>	AY803021	Flag	CG051
<i>DPF1</i>	GQ358728	Flag	MM4
<i>DPF2</i>	NM_006268	Flag	MM5
<i>HEY1</i>	NM_012258	GST	MM8
<i>HEY1</i>	NM_012258	Flag	SH58
<i>GATA4</i>	NM_002052	Flag	MM1

Nicht alle von den beschriebenen Konstrukten konnten hergestellt werden. Die Klonierung von GST-DPF1, GST-DPF2 und GST-GATA4 war nicht erfolgreich. Bei den erstellten Konstrukten wurden die Protein-Tags immer am N-Terminus der Proteine fusioniert. Alle Klone enthielten die Sequenzen der humane Proteine.

Obwohl nicht alle Kombinationen der getaggtten Proteine zur Verfügung standen, konnten trotzdem die geplanten Versuche mit den vorliegenden Konstrukten durchgeführt werden.

4.2. Proteinaufreinigung und Überprüfung der Bindungseffizienz von GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose

Vor der Durchführung der GST-Pull-down Experimente, wurden zunächst die GST-DPF3a und GST-DPF3b Proteine in *E.coli* BL21prare3 Zellen exprimiert und aufgereinigt (3.14.10., 3.15.5). Die Expression der GST-Fusionsproteine und deren Bindungseffizienz an die Glutathion-Sepharose wurde mittels Western-Blot (3.15.2)

überprüft. Dafür wurden 10µl der Glutathion-Sepharose nach der Aufreinigung auf das Gel aufgetragen. Das Glutathion-S-Transferase (GST) Protein selbst wurde ebenfalls in *E.coli* BL21prare3 Zellen exprimiert und mit Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Der GST-Tag wurde bei den Pull-down Versuchen als Kontrolle eingesetzt um unspezifische Wechselwirkungen der Flag-Fusionsproteine mit GST oder Glutathion-Sepharose auszuschließen.

Anhand früherer Versuche, die von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, war bekannt, dass der GST-Proteintag in *E.coli* BL21prare3 Zellen sehr stark exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde auch eine verstärkte Bindung des GST-Tags an die Glutathion-Sepharose erwartet. Damit bei der Entwicklung des Western-Blots die Röntgenfilme nicht überbelichtet werden, wurde auf die Gele immer nur 1µl der Sepharosepartikel mit GST ohne Fusionsprotein aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem primären anti-GST Antikörper.

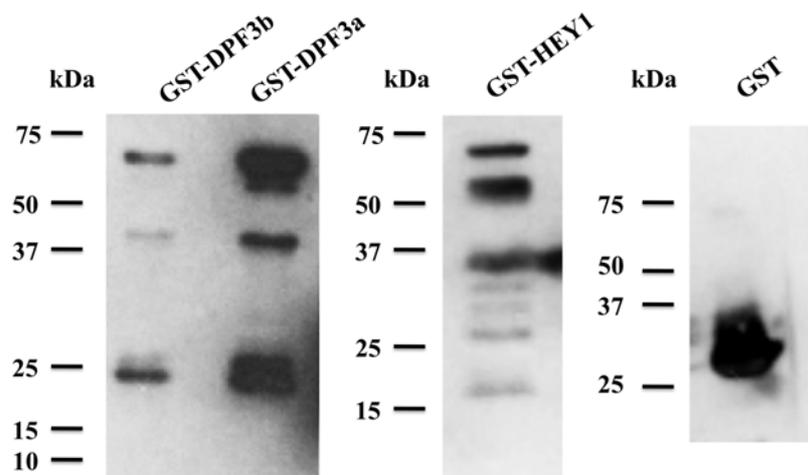


Abbildung 4-1: SDS-PAGE und Western-Blot mit Glutathion-Sepharose Beads nach der Aufreinigung der GST-Proteine (wie im Text beschrieben). Die Detektion erfolgte mit einem anti-GST Antikörper.

Die Abbildung 4-1 zeigt, dass die GST-Fusionsproteine durch Bindung an die Glutathion-Sepharose aufgereinigt werden konnten. Es sind sowohl für GST-DPF3a als auch GST-DPF3b Proteinbanden auf dem Westen-Blot zu sehen, die den erwarteten molekularen Größen beider Fusionsproteine entsprechen (65kDa für GST-DPF3a und 68kDa für GST-DPF3b). Dabei ist zu beachten, dass der GST-Tag alleine

ERGEBNISSE

ein 25kDa großes Protein ist. Die Molekulargewichte der unmarkierten Proteine betragen entsprechend 40kDa (DPF3a) und 43kDa (DPF3b).

Weiterhin ist auf dem Blot eine starke Bande für das GST ohne Fusionsprotein bei etwa 25kDa zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass GST in der Tat sehr stark exprimiert und mit großer Effizienz an die Glutathion-Sepharose gebunden wird. Für das GST-HEY1 tritt eine Bande bei etwa 58kDa auf. Weiterhin treten auf dem Blot viele Proteinbanden mit geringerem Molekulargewichte auf als erwartet. Dabei handelt sich wahrscheinlich um Degradationsprodukte oder unvollständig translatierte GST-Fusionsproteine.

4.3. Überprüfung der Expression von Flag-Fusionsproteinen

4.3.1. Überprüfung der Expression von Flag-Fusionsproteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Die Flag-getaggtten Proteine, die in GST-Pull-down Versuchen eingesetzt werden sollten, wurden in HEK293T-Zellen exprimiert. Vor der Durchführung der Pull-down Experimente wurde die Expression der Flag-Fusionsproteine in HEK293T-Zelllysaten mittels SDS-PAGE (3.15.1) und Western-Blot (3.15.2) überprüft werden.

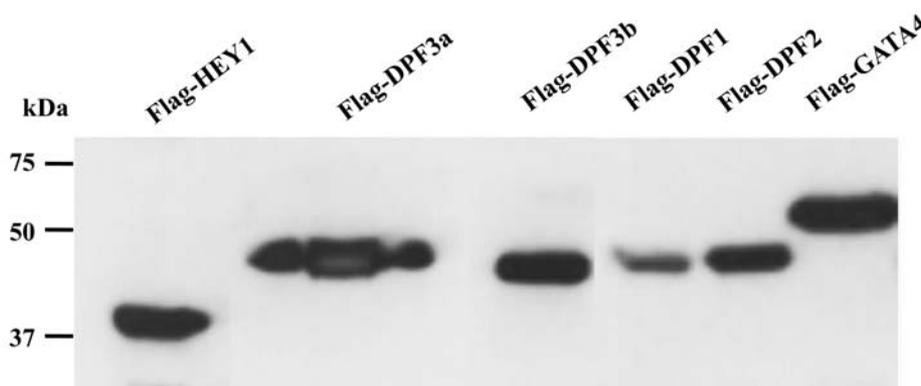


Abbildung 4-2: SDS-PAGE und Western-Blot mit Zelllysaten von transfizierten HEK293T Zellen. Auf das Gel wurde jeweils 1µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem primären anti-Flag Antikörper.

Abbildung 4-2 zeigt, dass die Flag-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen überexprimiert und mithilfe des anti-Flag Antikörpers mittels Western-Blot detektiert

werden konnten. Für jedes untersuchte Fusionsprotein ist auf dem Blot eine spezifische Bande zu sehen, die der erwarteten Größe entspricht. Die erwarteten Molekulargewichte für die Flag-Proteine betragen 44kDa für Flag-DPF3b, 41kDa für Flag-DPF3a, 48kDa für Flag-DPF1, 45kDa für Flag-DPF2, 34kDa für Flag-HEY1 und 50kDa für Flag-GATA4. Weiterhin sind keine großen Schwankungen in der Signalintensität zwischen den einzelnen Flag-Fusionsproteinen zu erkennen. Nur die Lysate von Flag-DPF1 und Flag-DPF2 weisen etwas schwächere Proteinbanden auf. Dies deutet darauf hin, dass alle Flag-Fusionsproteine mit vergleichbarer Effizienz in den HEK293T-Zellen exprimiert wurden.

4.3.2. Überprüfung der Expression von Flag-Fusionsproteinen mittels Immunfluoreszenzfärbung

Eine Immunfluoreszenzfärbung stellt eine zusätzliche Methode zur Untersuchung der Expression der Flag-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen dar. Mit dieser Methode wurden Flag-getaggte DPF3a, DPF3b, DPF1 und DPF2 Proteine untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem primären anti-Flag Antikörper. Als Vergleich und Kontrolle diente die Immunfluoreszenzfärbung von untransfizierten HEK293T-Zellen.

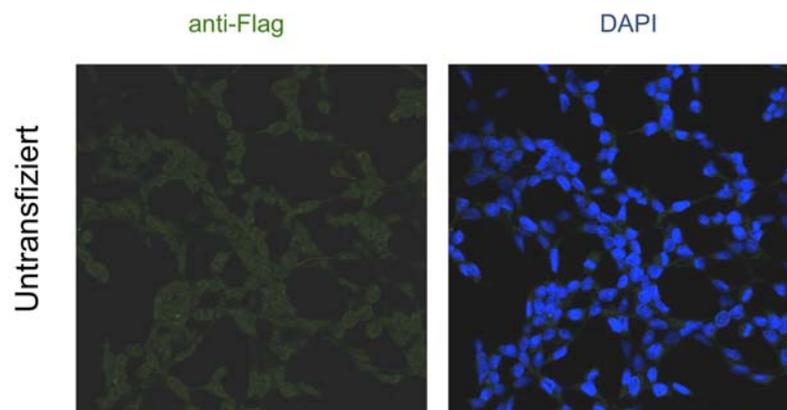


Abbildung 4-3: Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung mit untransfizierten HEK293T-Zellen. Immunfärbung mit einem primären anti-Flag Antikörper und sekundären anti-mouse Antikörper (Alexa Flour 488 gekoppelt, grün), Kernfärbung mit DAPI (blau). Zellen in 40facher Vergrößerung.

ERGEBNISSE

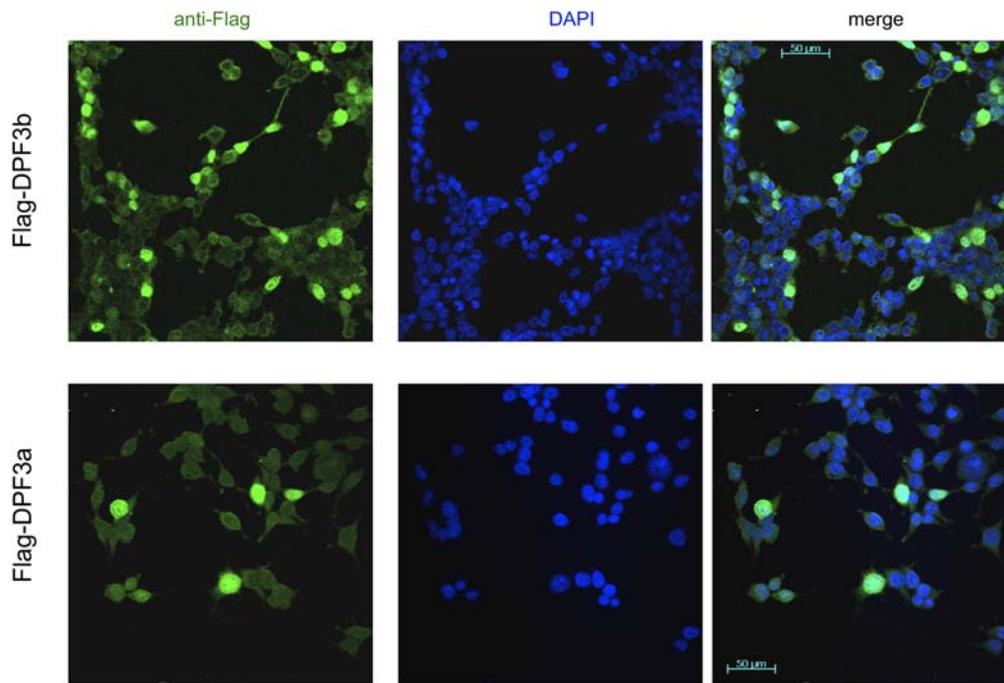


Abbildung 4-4: Immunofluoreszenzfärbung der Flag-DPF3a und Flag-DPF3b überexprimierenden HEK293T-Zellen. Immunfärbung mit einem primären anti-Flag Antikörper und sekundären anti-mouse Antikörper (Alexa Flour 488 gekoppelt, grün), Kernfärbung mit DAPI (blau), merge Überlagerung von Flag und DAPI. Zellen in 40facher Vergrößerung.

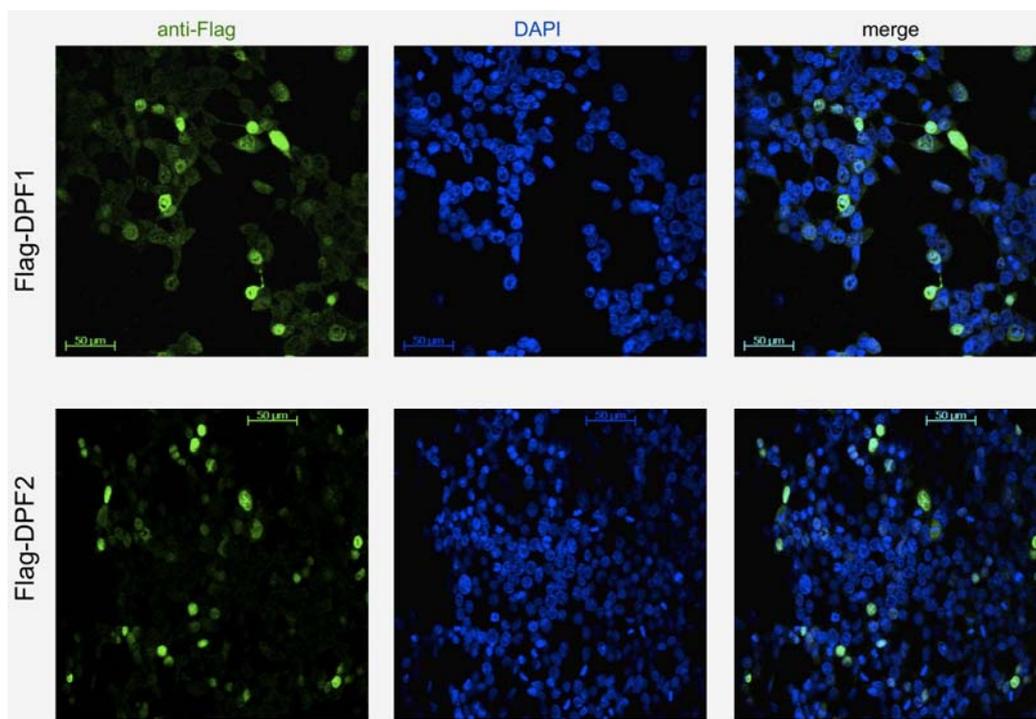


Abbildung 4-5: Immunofluoreszenzfärbung der Flag-DPF1 und Flag-DPF2 exprimierenden HEK293T-Zellen. Färbung mit einem anti-Flag Antikörper und sekundären anti-mouse Antikörper (Alexa Flour 488 gekoppelt, grün), Kernfärbung mit DAPI (blau), merge Überlagerung von Flag und DAPI. Zellen in 40facher Vergrößerung.

Die Fluoreszenzmikroskopiebilder in Abbildungen 4-4 und 4-5 zeigen die Expression der getesteten Flag-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen, die mit einem primären anti-Flag Antikörper nachgewiesen werden konnten. Die Abbildung 4-3 zeigt dagegen untransfizierte HEK293T-Zellen, die ebenfalls der Detektion mit anti-Flag Antikörper unterzogen wurden. Wie erwartet, wurden bei den untransfizierten Zellen keine Flag-Fusionsproteine detektiert. Die Zellkerne wurden in allen Abbildungen durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht.

Die Fluoreszenz ist für alle exprimierten Flag-Konstrukte vergleichbar intensiv, was auf eine vergleichbare Transfektionseffizienz der Expression von Flag-Fusionsproteinen in den HEK293T-Zellen vermuten lässt. Ähnliche Aussagen konnten bereits anhand der SDS-PAGE und Western-Blot Ergebnissen mit Flag-Fusionsproteinen gemacht werden (4.3.1)

Alle überexprimierten Flag-Proteine befinden sich sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma der transfizierten HEK293T-Zellen. Da es sich um Transkriptionsfaktoren handelt lässt diese Beobachtung vermuten, dass die Translation der Flag-Konstrukte wahrscheinlich richtig gefaltete Proteine liefert, die in den Kern transportiert werden können.

4.4. Untersuchung der Homo- und Heterodimerbildung von DPF3

Die GST-Pull-down Experimente zur Untersuchung der Homo- und Heterodimerbildung von DPF3 wurden wie beschrieben (3.15.8) mit zuvor getesteten GST- und Flag-getaggten DPF3a und DPF3b Proteinen durchgeführt (4.3, 4.2).

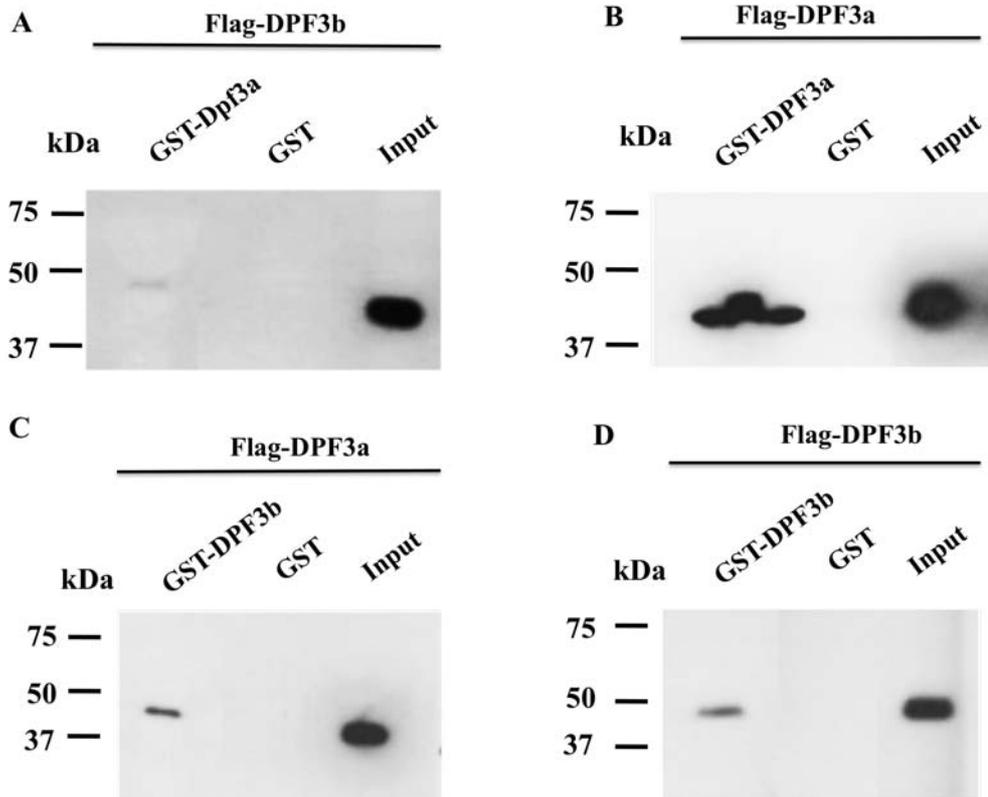


Abbildung 4-6: Pull-down-Assays mit GST- und Flag-getaggten Volllängen DPF3a und DPF3b Proteinen in verschiedenen Kombinationen. A) Kombination GST-DPF3a und Flag-DPF3b, B) GST-DPF3a und Flag-DPF3a, C) GST-DPF3b mit Flag-DPF3a, D) GST-DPF3b und Flag-DPF3b. GST- Glutathion-S-Transferase ohne Fusionsprotein, Input- 1% (2,5µg) der eingesetzten HEK293T-Lysatmenge. Die Detektion erfolgte mit einem primären anti-Flag Antikörper.

Die Abbildung 4-6 zeigt die Ergebnisse der Experimente zur Untersuchung einer potentiellen Homo- und Heterodimerisierung von DPF3a und DPF3b. Auf allen Western-Blot Abbildungen konnte man nach der Durchführung der GST-Pull-down Assays mit dem anti-Flag Antikörper Banden nachweisen, was darauf hindeutet dass DPF3 Homo- und Heterodimere ausbildet. Für das Flag-DPF3a Fusionsprotein konnte nach dem Pull-down mit GST-DPF3b auf dem Western-Blot eine Proteinbande bei ca. 41kDa detektiert werden, was dem erwarteten Molekulargewicht des Fusionsproteins entspricht. Dagegen war die auf fast der gleichen Höhe auftretende

Bande für die reverse Pull-down Kombination (Flag-DPF3b mit GST-DPF3a) nur schwach erkennbar. Der Pull-down mit GST-DPF3a und Flag-DPF3a lieferte ein stark positives Ergebnis (deutliche Bande bei ca. 41kDa, die Tasche im Gel wurde mit Probe überladen). Im Fall von GST-DPF3b mit Flag-DPF3b ist auf dem Western-Blot auch eine deutliche Proteinbande bei ca.44kDa (entspricht dem Molekulargewicht von Flag-DPF3b) zu sehen. Im allgemeinen konnte man sehen, dass die Proteinbanden für die Homodimere stärker sind. Weiterhin hat der Vergleich der Input-Proben (1% der für die Pull-down-Assays eingesetzten Gesamtproteinmenge an HEK293T-Zellysaten) keine großen Unterschiede zwischen dem Expressionsgrad der Flag-Fusionsproteine gezeigt.

Es konnte auch keine unspezifische Bindung der Flag-Proteine an Glutathion-Sepharose mit gebundenem GST-Tag festgestellt werden. Die Ergebnisse des Pull-down Assays mit der Positiv- und Negativkontrolle (Abbildung 4-7) ergaben ebenfalls, dass die Methode erfolgreich war.

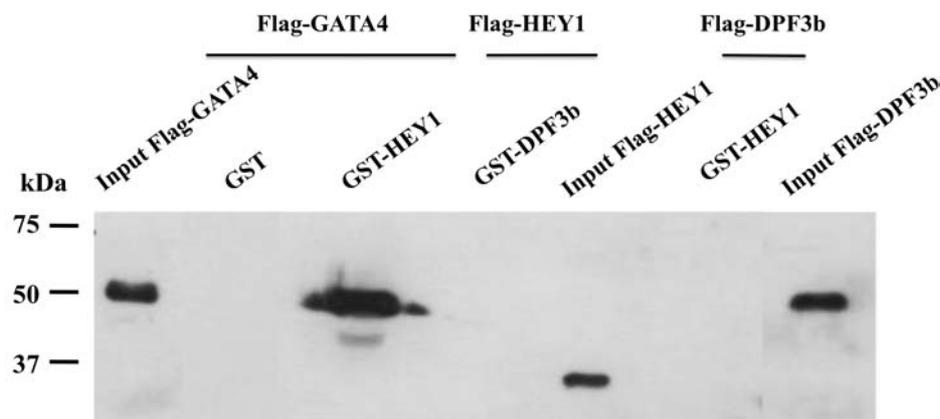


Abbildung 4-7: SDS-PAGE und Western-Blot Ergebnisse nach der Durchführung des Pull-down-Assays mit den Kontrollkonstrukten. Positivkontrolle GST-HEY1 und Flag-GATA4. Negativkontrolle sowohl GST-DPF3b und Flag-HEY1, als auch GST-HEY1 und Flag-DPF3b. GST-Glutathion-S-Transferase Tag ohne Protein. Input – 1% (2,5µg) des HEK-Zellysates. Detektion erfolgte mit einem primären anti-Flag Antikörper.

Als Positivkontrolle diente der Pull-down mit GST-HEY1 und Flag-GATA4 (Abbildung 4-7). Für diesen Pull-down ist auf dem Bild bei ca.50kDa ein sehr starkes Signal zu sehen. Die Kombinationen Flag-HEY1 mit GST-DPF3b, sowie Flag-DPF3b und GST-HEY1 wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Die Proteinbanden, die den Flag-Fusionsproteinen entsprechen waren nur bei den Inputs zu sehen (ca. 34kDa für Flag-HEY1 und ca. 44kDa für Flag-DPF3b). Keines der Flag-Fusionsproteine, die als

Kontrollen dienten, interagiert mit der Sepharosematrix oder dem GST-Tag. Diese Kontrollen wurden mehrmals durchgeführt und galten für jedes der durchgeführten Pull-down Experimente.

4.5. Charakterisierung der Dimerisierungsdomäne von DPF3

Nachdem die Homo- und Heterodimere von DPF3 nachgewiesen werden konnten (4.4) wurde nach der möglichen Dimerisierungsdomäne gesucht. Dafür wurden verschiedene GST- und Flag-markierte Deletionskonstrukte der beiden DPF3 Isoformen für GST-Pull-down Assays eingesetzt. DPF3a und DPF3b wurden entweder C-terminal oder N-terminal verkürzt. Alle eingesetzten Konstrukte wurden in die Vektoren pTL-FlagC und pGEX3x kloniert, und auf ihre Expression mittels Western-Blot getestet (3.15.2).

Zuerst wurden die C-terminal verkürzten Konstrukte auf ihre Fähigkeit zur Bildung von Homo- und Heterodimeren mit Vollängen DPF3a und DPF3b untersucht.

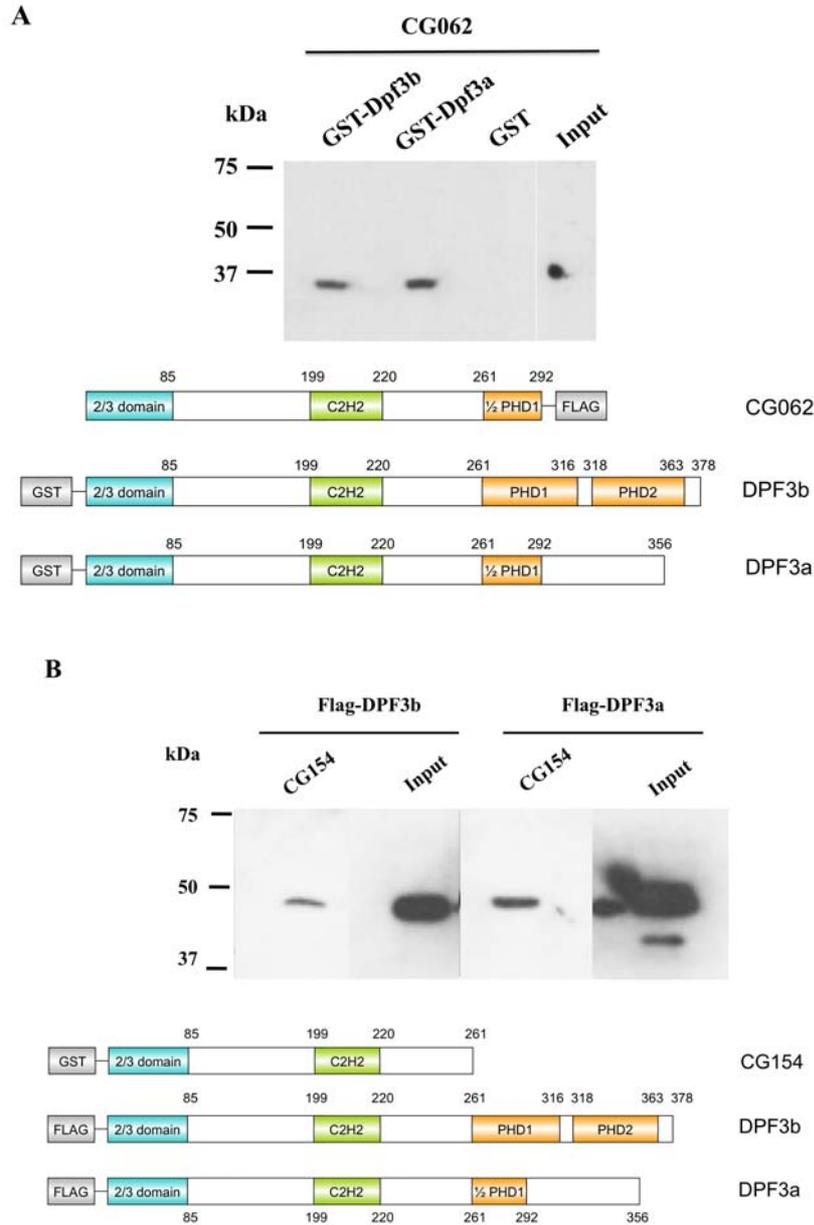


Abbildung 4-8: Die Ergebnisse der Pull-down-Assays mit C-terminal verkürzten DPF3 Konstrukten. A) SDS-PAGE und Western-Blot nach dem Pull-down von GST-DPF3a und GST-DPF3b mit Flag-DPF3a Konstrukten ohne spezifischen C-Term (DPF3a_aa2-292, CG062) B) SDS-PAGE und Western-Blot nach dem Pull-down von GST-DPF3 ohne PHD-Finger (DPF3_aa2-261, CG154) mit Flag-DPF3a und Flag-DPF3b. Die Detektion erfolgte mit einem primären anti-Flag Antikörper.

Die Abbildung 4-8 A zeigt den Pull-down Versuch mit dem Flag-DPF3a Deletionskonstrukt ohne spezifischen C-Term. Die Funktion des spezifischen C-Terms von DPF3a ist bis jetzt unbekannt. Sowohl für den Reaktionsansatz mit GST-DPF3a als auch für den Ansatz mit GST-DPF3b sind auf dem Western-Blot deutliche

ERGEBNISSE

Signale für Flag-Fusionsproteine (erwartete Molekulargröße ca. 33kDa) zu sehen, was darauf schließen lässt, dass dieser Bereich bei DPF3a keine Dimerisierungsdomäne enthält. Sehr schwach positiv (im Vergleich zum Input) ist auch das Pull-down Ergebnis mit dem Deletionskonstrukt CG154 (GST-DPF3b ohne PHD-Finger bzw. GST-DPF3a ohne den halben PHD-Finger und den spezifischen C-Term) (Abbildung 4-8 B). Das Signal für Flag-DPF3b ist schwächer als für Flag-DPF3a und fast gar nicht zu erkennen.

Da die Pull-down Ergebnisse mit den Konstrukten CG062 und CG154 alle positiv waren, wurden weitere Deletionskonstrukte von DPF3b getestet. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass für die Untersuchung der Dimerisierungsdomäne von DPF3 am besten die Deletionskonstrukte eignen, die von dem C-terminalen Ende des Proteins weiter verkürzt worden wären. Solche Konstrukte standen jedoch nicht zur Verfügung und wurden im Rahmen der Diplomarbeit nicht kloniert. Für die folgenden Versuche wurden daher andere bereits vorhandene DPF3b-Konstrukte verwendet, denen zwar in verschiedenem Ausmaß der N-Terminus fehlte, bei denen aber die C-terminal gelegenen PHD Finger vorhanden waren (bei den zwei kürzesten Konstrukten handelt es sich ausschließlich um den ersten und zweiten PHD Finger).

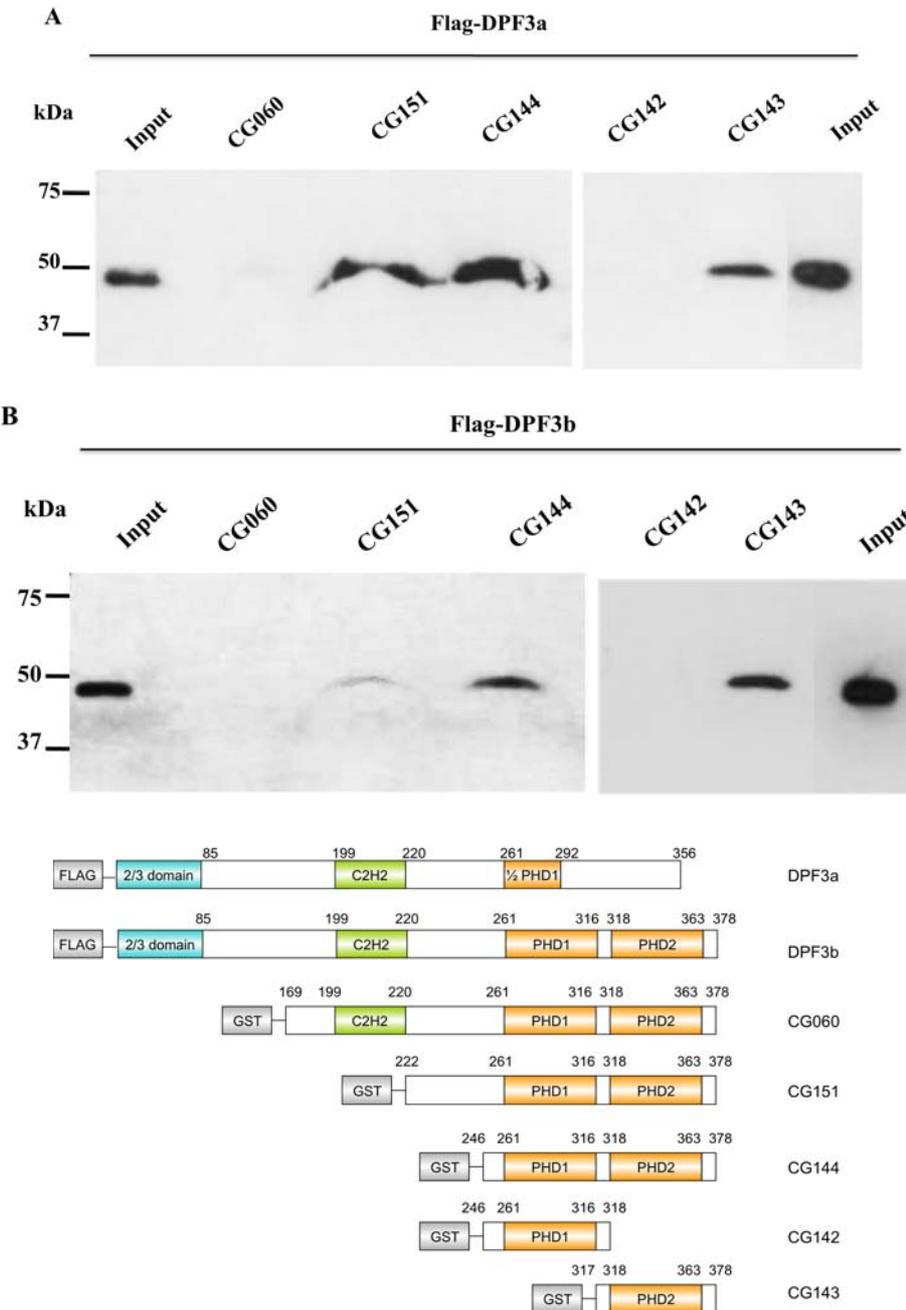


Abbildung 4-9: SDS-PAGE und Western-Blot Ergebnisse der Pull-down-Versuche mit verschiedenen GST-DPF3b Deletionskonstrukten: CG060 (GST-DPF3b_{aa169-378})- DPF3b Protein ohne funktionelle 2/3 Domäne; CG151 (GST-DPF3b_{aa222-378})- DPF3b ohne 2/3 Domäne und C2H2 Zinkfingerdomäne; CG144 (GST-DPF3b_{aa246-378})- die funktionellen PHD Fingern von DPF3b; GG142 (GST-DPF3b_{aa246-378})- der erste PHD Finger von DPF3b; CG143 (GST-DPF3b_{aa317-378})- der zweite PHD Finger von DPF3b A) Pull-down Assay mit Deletionskonstrukten und Vollängen Flag-DPF3a. B) Pull-down Assay mit Deletionskonstrukten und Flag-DPF3b. Detektion erfolgte mit einem primären anti-Flag Antikörper. Input- 1% (2,5µg) des eingesetzten HEK293T-Zellysates. Pull-down Assays mit CG142 und CG143 Konstrukten wurden in einem separaten Versuch durchgeführt, zum besseren Vergleich sind auch die Inputs für diese Ansätze gezeigt.

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Pull-down-Assays mit den oben beschriebenen GST-DPF3b Konstrukten und Vollängen Flag-DPF3a und Flag-DPF3b zeigt die Abbildung 4-9. Man sieht sowohl für Flag-DPF3a als auch Flag-DPF3b auf den Western-Blot Bildern ein ähnliches Proteinbandenmuster (Proteinbanden bei ca.44 für Flag-DPF3b und ca.41kDa für Flag-DPF3a). Das Konstrukt CG060 (funktionelles GST-DPF3 Protein ohne 2/3 Domäne) lieferte im Pull-down mit Flag-DPF3a und -DPF3b ein negatives Ergebnis. Deutliche Proteinbanden sind in dem Pull-down von Flag-DPF3a und den Konstrukten CG151 (Konstrukt ohne 2/3- und C2H2-Zinkfinger Domäne) und CG144 (GST-DPF3 PHD-Finger) zu sehen. Deutlich schwächer kann man die Proteinbanden von Flag-DPF3b mit CG151 und CG144 Konstrukten erkennen (Abbildung 4-9 B). Für dieses Protein ist jedoch auch der Input etwas schwächer. Der erste PHD Finger von DPF3b (CG142 Konstrukt) hat im Pull-down weder mit Flag-DPF3a noch Flag-DPF3b eine Interaktion gezeigt. Deutliche Proteinbanden sind hingegen für die Pull-downs mit dem CG143 Konstrukt (GST-DPF3b mit dem zweiten PHD Finger) und beider Flag-Fusionsproteine zu sehen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der zweite PHD-Finger für die Dimerisierung teilweise verantwortlich sein könnte.

Alle in diesem Kapitel bereits vorgestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass DPF3a und DPF3b zwei Dimerisierungsdomänen besitzen könnten (eine befindet sich im C-Terminus, die andere ist N-terminal gelegen). Um das zu überprüfen, wurde ein Pull-down Versuch mit einem Flag-DPF3 Konstrukt ohne C-Terminus (CG061, Flag-DPF3_aa2-246) mit den GST-Deletionskonstrukten CG154 (GST-DPF3_aa2-261, Protein ohne d4-Domäne), CG144 (GST-DPF3b_aa246-378, die d4-Domäne von DPF3b) und CG146 (GST-DPF3a_aa246-356, der halben PHD Finger und spezifischer C-Term von DPF3a) durchgeführt (Abbildung 4-10).

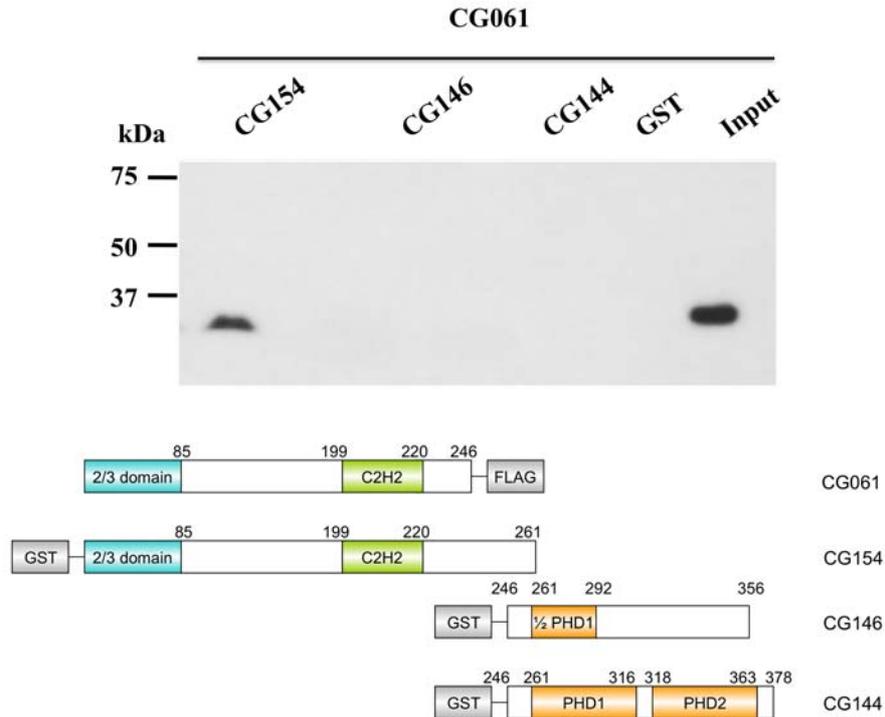


Abbildung 4-10: Pull-down Versuch mit im Text beschriebenen DPF3 Deletionskonstrukten. SDS-PAGE und Western-Blot Ergebnisse. Die Detektion erfolgte mit einem primären anti-Flag Antikörper.

Bei diesem Versuch wurde nur eine Proteinbande detektiert, die unter der 37kDa Markerbande läuft, was dem erwarteten Molekulargewicht des CG061 Deletionskonstruktes von ca. 28kDa entspricht. Diese Bande tritt auf dem Blot bei der Kombination von CG061 und CG154 Deletionskonstrukten auf, was bedeuten kann, dass sich eine der Dimerisierungsdomänen im N-terminalen Bereich von DPF3 befindet. Die Kombinationen von CG061 und CG146 sowie CG061 und CG144 Konstrukten lieferten kein Signal auf dem entwickelten Western-Blot, was darauf hindeutet, dass die N-terminal gelegene Domäne nicht in stande ist mit dem C-Terminus von DPF3a und DPF3b zu interagieren.

4.6. Untersuchung der Interaktionen von DPF3 mit weiteren Mitglieder der d4-Proteinfamilie DPF1 und DPF2

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden die Interaktionen zwischen dem epigenetischen Transkriptionsfaktor DPF3 mit DPF1 und DPF2 Proteinen untersucht. Die Untersuchung wurde mittels der GST-Pull-down Methode (3.15.8) mit GST-getaggen DPF3a und DPF3b Molekülen und Flag-markierten DPF1 und DPF2 Proteinen durchgeführt. Die Ergebnisse des Versuches zeigt die Abbildung 4-11.

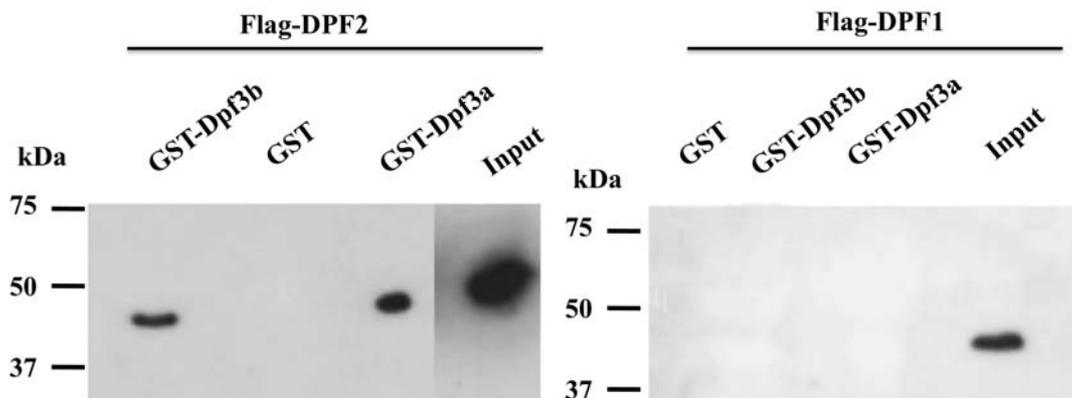


Abbildung 4-11: Pull-down Assay mit GST-DPF3a, GST-DPF3b und Flag-DPF2 (linkes Bild) oder Flag-DPF1 (rechtes Bild). Ergebnisse der SDS-PAGE und Western-Blots. Die Detektion erfolgte mit einem primären anti-Flag Antikörper. Erwartete Molekulargrößen sind 48kDa für Flag-DPF1 und 45kDa für Flag-DPF2. Das Auftreten der Flag-DPF2 Signalen auf unterschiedlichen Höhen sind auf den „Smiley-Effekt“ während der Gelelektrophorese zurückzuführen.

Sowohl für den Pull-down von GST-DPF3a und GST-DPF3b mit Flag-DPF2 sind auf dem Röntgenfilm spezifische Signale (auf der erwarteten Höhe) für das Flag-Fusionsprotein zu sehen, was auf eine Interaktion beider GST-Fusionsproteine mit Flag-DPF2 hinweist. In dem Pull-down von Flag-DPF2 mit GST ohne Fusionsprotein wurde auf dem Western-Blot kein Signal detektiert, was auf spezifische Wechselwirkung zwischen Flag-DPF2 und den beiden GST-Proteinen hindeutet.

Die Abbildung 4-11 zeigt außerdem, dass keine Interaktion von Flag-DPF1 mit GST-DPF3a und GST-DPF3b festgestellt werden konnte, obwohl Flag-DPF1 im Input vorhanden war und eine deutliche Bande bei ca. 48kDa lieferte.

4.7. Zusammenfassung der Interaktionspartner von DPF3b

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden eine Reihe von GST-Pull-down Versuchen durchgeführt. Sie dienten der Untersuchung der Homo- und Heterodimerbildung des epigenetischen Transkriptionsfaktors DPF3, der Charakterisierung dessen möglichen Dimerisierungsdomäne und der Untersuchung der Interaktionen von DPF3 mit zwei weiteren d4-Proteinfamilienmitglieder DPF1 und DPF2. Alle nachgewiesenen Interaktionen werden in Form einer Abbildung 4-12 zusammengefasst.

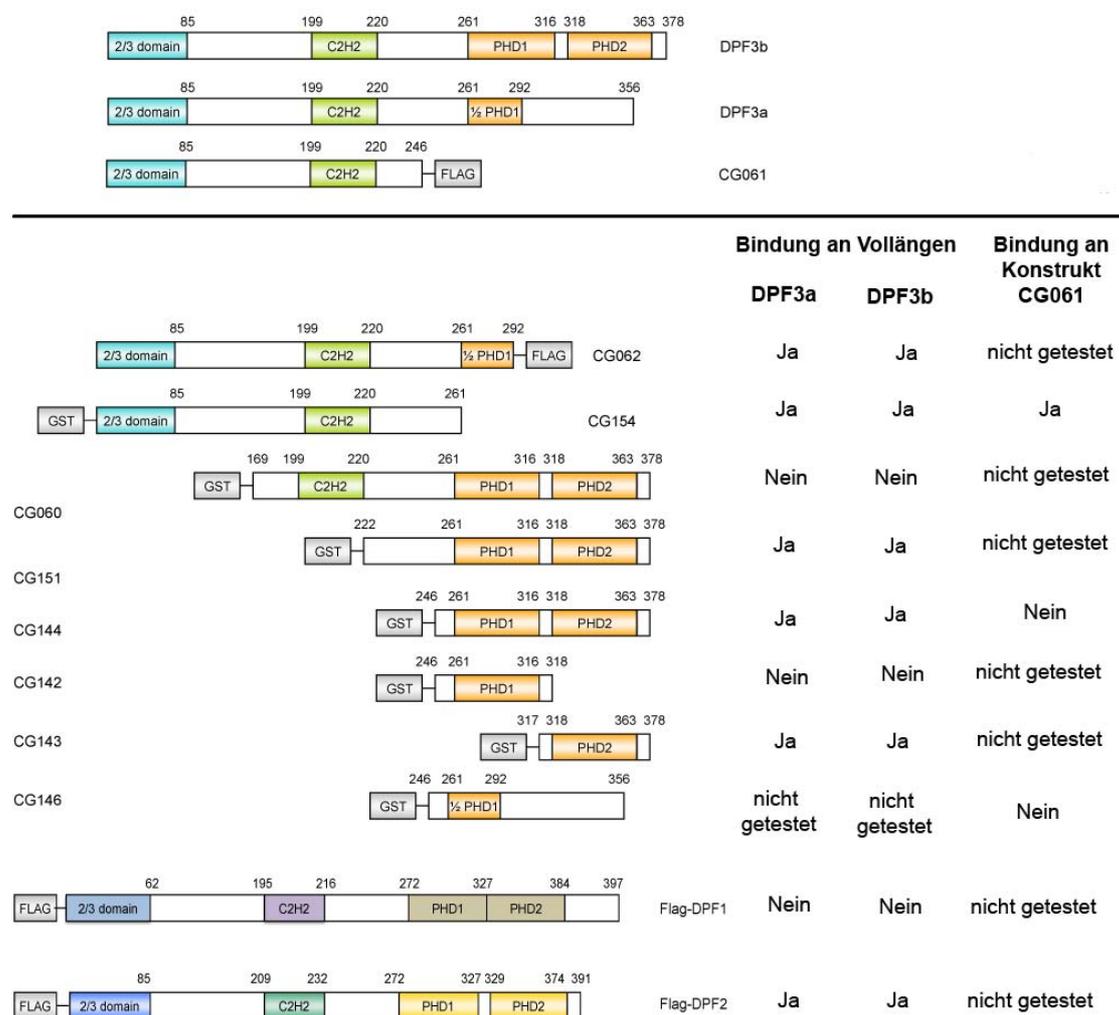


Abbildung 4-12: Zusammenfassung aller untersuchten Interaktionen.

4.8. Charakterisierung der Isoform DPF1d

Damit die Untersuchung der Interaktionen zwischen DPF1 und DPF3 Proteinen durchgeführt werden konnte (4.6), wurde rekombinantes Flag-DPF1 Protein kloniert. Die Amplifizierung des DPF1 Gens erfolgte aus cDNA von HEK293T-Zellen (3.14.12). Die Primer, die für die PCR Reaktion benutzt wurden (dpf1_h_xaa2_bamhi_f, dpf1_h_stop_noti_r) waren gegen die humane DPF1 Isoform a (DPF1a) gerichtet. Die Klonierung in den pTL-FlagC Vektor erfolgte mithilfe der im Methodenteil beschriebenen molekularbiologischen Methoden (3.14). Die Plasmid-DNA des positiven *E.coli* DH10B Klons wurde anschließend von der Firma Eurofins MWG Operon sequenziert (3.14.20). Die Ergebnisse der Sequenzierung lieferten eine neue, bisher unbekannte Sequenz des humanen DPF1 Proteins. Sowohl die DNA, als auch die Proteinsequenz des Klons wurden mithilfe der Software ClustalW mit den drei bekannten humanen DPF1 Isoformen (NCBI Reference Sequences) verglichen (siehe Anhang 9.1 und 9.2).

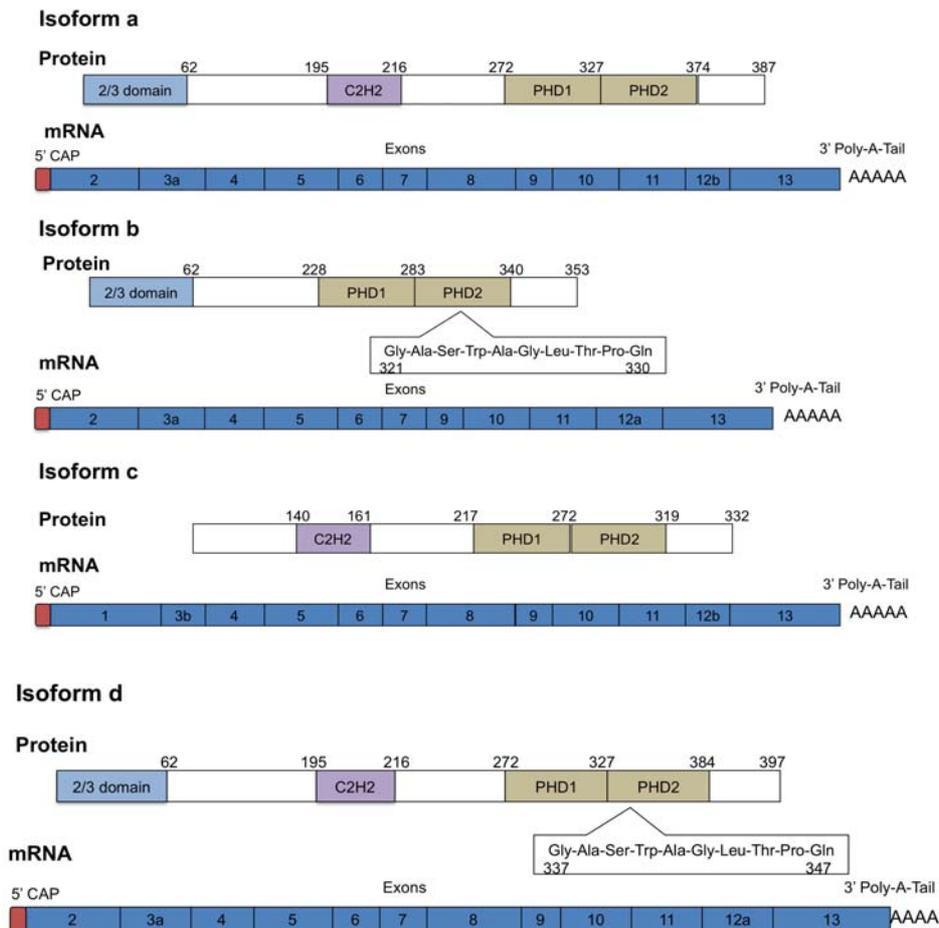


Abbildung 4-13: Schematische Darstellung der Protein- und mRNA-Sequenzen der drei bekannten Isoformen (a, b, c) und der neu entdeckten Isoform d des humanen DPF1 Proteins.

Alle DPF1 Proteinisoformen sind schematisch in der Abbildung 4-13 dargestellt. Die Isoform a war bis jetzt die längste humane DPF1 Spleißvariante. Die Isoform b ist im Vergleich zu DPF1a und DPF1c kürzer, weil ihre mRNA nicht das Exon 8 enthält. Aufgrund des gespleißten Exons ist die resultierende Proteinsequenz kürzer und besitzt keine C2H2 Zinkfingerdomäne. Dafür besitzt das Protein einen um 10 Aminosäuren verlängerten PHD-Finger (Aminosäuren 321-330). Diese Besonderheit kommt während des Spleißprozesses durch Benutzung einer alternativen „3' splice acceptor site“ im Exons 12 zu Stande und resultiert in 30 zusätzlichen Basenpaaren in der mRNA Sequenz.

Die mRNA DPF1c unterscheidet sich von den beiden anderen Spleißvarianten durch Vorhandensein von Exon 1, das Fehlen von Exon 2 und eine um 5 Basenpaare am 3'Ende verkürzte Exon 3b Variante (siehe Anhang 9.1).

Die neue DPF1 Isoform d (DPF1d) verfügt sowohl über den C2H2 Zinkfinger, der bei der Isoform b fehlt als auch über die 10 Aminosäuren (Aminosäuren 337-347) des PHD2 Fingers, welche nur bei der Isoform b vorkommen. Damit stellt die Isoform d die längste Spleißform von humanem DPF1 dar

4.8.1. Untersuchung des Vorhandenseins eines Exon 1 in der mRNA Sequenz der DPF1 Isoform d.

Durch alternatives Spleißen enthält DPF1c als Einzige von den Isoformen eine Exon 1 Sequenz (Anhang 9.1, Abbildung 4-13). Das Exon 2 fehlt und Exon 3 ist am 3'Ende um 5 Nukleotide verkürzt. Durch diese Veränderungen entsteht ein zusätzliches Startkodon, welches „*down stream*“ gelegen ist. Bei der Translation dieser Spleißvariante entsteht ein Protein, welches N-terminal verkürzt ist und keine 2/3 Domäne mehr enthält. (Anhang 9.2, Abbildung 4-13).

Mithilfe von PCR wurde untersucht, ob die mRNA der neu klonierten Isoform d noch über die Exon 1 Sequenz zusammen mit dem Exon 2 verfügt. Es wurde folglich untersucht, ob es eine Kombination von Exon 1, Exon 2 und Exon 3a gibt. Dazu wurden zwei Primer designed (Abbildung 4-14).

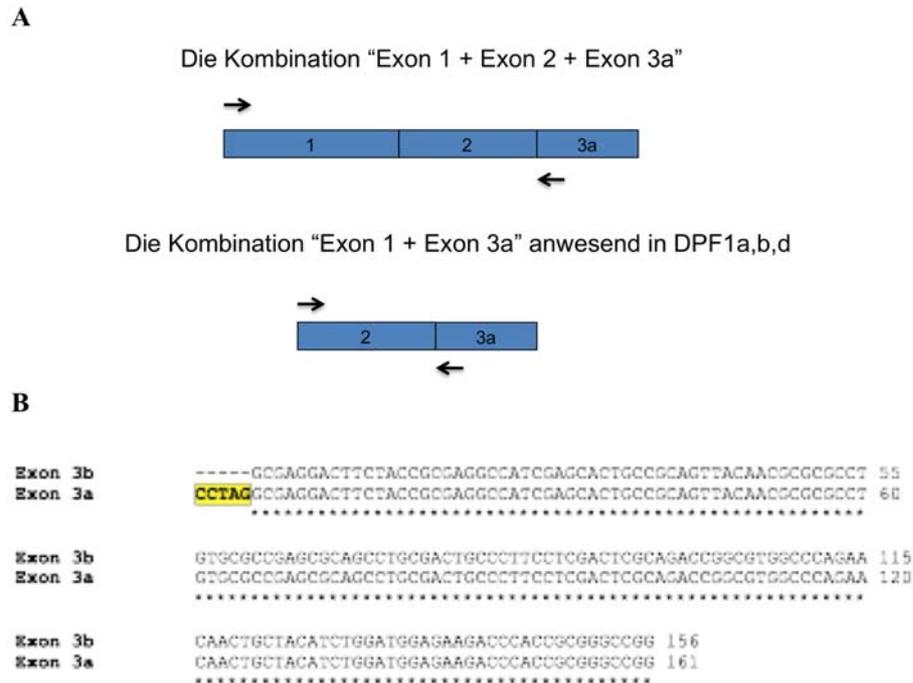


Abbildung 4-14: A) Schematische Darstellung der im Text beschriebenen Exonkombinationen, die amplifiziert werden sollten. Mit Pfeilen ist die Lage der PCR-Primer angedeutet, die für die Reaktionen benutzt wurden. B) Alignment der beiden Exon 3 Varianten a und b (mit der ClustalW Software erstellt). Gelb markiert wurden die 5 zusätzlichen Nukleotide, die nur im Exon 3a vorkommen und gegen die der Rückwärtsprimer gerichtet wurde.

Der Vorwärtsprimer (dpf1_h_exon1_start_f) wurde gegen die ersten Basenpaare des Exon 1 gerichtet. Der Rückwärtsprimer (dpf1_h_exon3a_r) sollte zu dem 3' Ende der Exon 3a Variante komplementär sein (auch zu den 5 Basenpaaren die bei der Exon 3b Variante fehlen, Anhang 9.1). Damit sollte die Amplifizierung einer Sequenz „Exon 1 + Exon 2 + Exon 3a“ gewährleistet werden (Abbildung 4-14). Die PCR Reaktion wurde mithilfe der Hot Star Taq Polymerase wie beschrieben (3.14.12) durchgeführt. Als Template zur Amplifikation diente cDNA von HEK293T-Zellen, aus der auch DPF1d kloniert wurde.

Die Ergebnisse der PCR (Abbildung 4-15) zeigen, dass mit den gewünschten Primern keine Sequenz amplifiziert werden konnte, was darauf schließen lässt, dass es keine Kombination von Exon 1, Exon 2 und Exon 3a Sequenzen in der cDNA von HEK293T-Zellen gibt. Die erwartete Größe des PCR Produktes betrug ca. 416bp. Als Kontrolle wurde das cDNA-Stück zwischen den Exons 2 und 3a amplifiziert (diese Exons in dieser Kombination kommen bei DPF1a, DPF1b und DPF1d mRNA-

ERGEBNISSE

Sequenzen vor). Die Größe der Kontrollsequenz betrug 46bp. Auf dem Bild ist in der Tat für den Kontrollansatz (Exon 2 + Exon 3a) eine schwache Bande zu sehen, die unter der Markerbande von 100bp läuft.

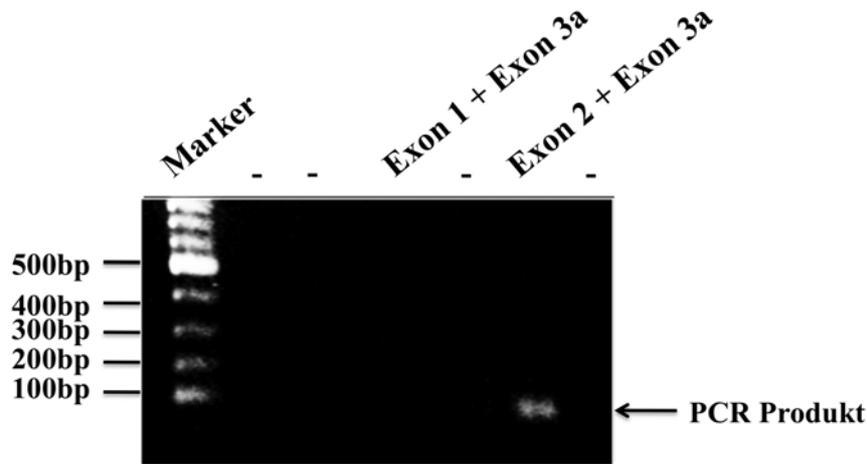


Abbildung 4-15: Die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese nach der Durchführung der PCR mit den im Text beschriebenen Primern. Marker: 100bp DNA Ladder. Es wurden je 5 μ l des PCR Produktes auf das Gel aufgetragen.

4.8.2. Untersuchung der PHD-Finger von DPF1d auf ihre Fähigkeit zur Bindung von modifizierten Histonpeptiden

Die PHD-Finger von DPF1a zeigen ein gleiches Bindungsmuster für modifizierte Histonpeptide wie DPF3b (Lessard *et al.* 2007)(Abbildung 4-16, unteres Bild). Sie verfügen jedoch nicht über die 10 zusätzlichen Aminosäuren, die bei der neu entdeckten DPF1d Isoform vorhanden sind.

Mithilfe von GST-Pull-down Assays mit biotinylierten Histonpeptiden (3.15.9) sollten die PHD Finger der neuen DPF1 Isoform d auf ihre Fähigkeit und Spezifität der Bindung an N-terminal modifizierte Histone 3 und 4 untersucht werden. Dafür wurden die PHD Finger in den pGEX3x-Vektor kloniert (3.14) und einem Pull-down mit biotinylierten Histonpeptiden untergezogen.

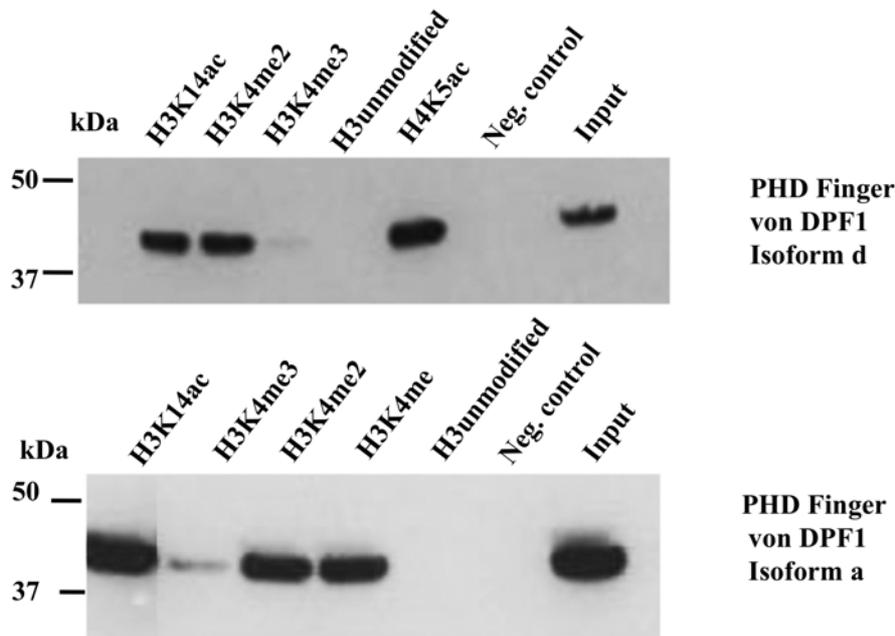


Abbildung 4-16: SDS-PAGE und Western-Blot Ergebnisse nach Durchführung des GST-Pull-downs mit biotinylierten Histonpeptiden. Oberes Bild – Pull-down mit den PHD Fingern von DPF1d (GST-DPF1_Isoform_d_aa258-397). Unteres Bild – Pull-down mit den PHD Fingern von DPF1a (GST-DPF1_Isoform_a_aa258-387); durchgeführt von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe. Negativkontrolle- Beads von einem Kontrollansatz mit GST-Protein aber ohne Histonpeptide. Input- 25µl des Überstandes von dem Kontrollansatz ohne Histonpeptide. Weitere Abkürzungen wurden im Text beschrieben. Detektion erfolgte mit einem primären anti-GST Antikörper. Erwartete Molekulargrößen betragen: ca. 39kDa für die DPF1 Isoform a PHD Finger und 40kDa für DPF1 Isoform d PHD Finger.

Die Ergebnisse des Pull-down Assays mit biotinylierten Histonpeptiden zeigen, dass es in der Bindungsspezifität der PHD-Finger zu modifizierten H3 Histonpeptiden keine Unterschiede zwischen den Isoformen DPF1a und DPF1d gibt (Abbildung 4-16). An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass der Pull-down Assay mit biotinylierten Peptiden und DPF1a PHD Finger (unteres Bild) von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe in der Vergangenheit durchgeführt wurde. Das Ergebnis des Experimentes sollte hier daher zum Vergleich dargestellt werden, da in beiden Versuchen die PHD Finger auf Interaktionen mit gleichen Histon 3 Modifikationen getestet wurden. Zusätzlich wurde aber im Rahmen der Diplomarbeit die Bindung von DPF1d PHD Finger an dem H4K5 Histonpeptid untersucht. Diese Interaktion wurde in dem Experiment mit DPF1a PHD Finger nicht getestet.

Auf beiden Western-Blot Bildern sieht man ein ähnliches Proteinbandenmuster. Beide GST-PHD-Finger interagieren mit den Peptiden H3K14ac, H3K4me und H3K4me2.

ERGEBNISSE

Weiterhin weisen beide PHD-Finger eine schwache Interaktion mit H3K4me3 tragendem Peptid auf. Für unmodifiziertes Histon 3 Peptid konnte bei beiden Isoformen kein Signal detektiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass DPF1d PHD Finger mit H4K5ac interagiert. Diese Histonmodifizierung als auch alle bereits beschriebene H3 Modifikationen werden auch von DPF3b erkannt (Lange *et al.* 2008). Weiterhin hat die Negativkontrolle auch bei beiden Versuchen kein Signal gezeigt, was auf einen funktionierenden Assay schließen lässt.

5. Diskussion

5.1. Rekombinante Proteine für GST-Pull-down Versuche

Das Ziel dieser Diplomarbeit war die potentielle Homo- und Heterodimerisierung des epigenetischen Transkriptionsfaktors DPF3 zu untersuchen. Die Untersuchung sollte mithilfe einer GST-Pull-down Methode durchgeführt werden. Dafür wurden Vollängen GST-DPF3a und GST-DPF3b Proteine benötigt. Die GST-getaggten Proteine sollten in *E.coli* Zellen des Stammes BL21prare3 mit guter Effizienz überexprimiert werden. Eine Voraussetzung zur Durchführung der Pull-down Assays war auch die Bindung der GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose. Die SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blot von Glutathion-Sepharosepartikeln nach Aufreinigung der GST-Fusionsproteine zeigte eine gute Bindungseffizienz aller Fusionsproteine an die Sepharosematrix (4.2). Die GST-Fusionsproteine konnten spezifisch mit dem primären anti-GST Antikörper nachgewiesen werden.

Als „bait“ wurden Flag-getaggte DPF3a und DPF3b Proteine benutzt. Die HEK293T-Zellen eigneten sich sehr gut für die Expression der Flag-Fusionsproteine. Die Überexpression der Flag-Fusionsproteine konnte mittels Western-Blot mit guter Effizienz festgestellt werden (4.3.1). Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-Flag Antikörper konnte die Ergebnisse der Western-Blot Experimente bestätigen (4.3.2). Diese Methode lieferte auch zusätzlich interessante Informationen über die Lokalisation der Flag-markierten Proteine. Sowohl beide Flag-DPF3 Proteine als auch zwei weitere Mitglieder der d4-Genfamilie, die Proteine Flag-DPF1 und Flag-DPF2 wurden sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern der transfizierten HEK293T-Zellen nachgewiesen. Da es sich bei den Proteinen der DPF-Familie um Transkriptionsfaktoren handelt und diese Komponenten des BAF Chromatin Remodeling Komplexes sind (Lessard *et al.* 2007), war das Auftreten der Proteine im Zellkern zu vermuten. Die Flag-Fusionsproteine werden im Cytoplasma synthetisiert und sind deswegen auch dort durch Immunfluoreszenzfärbung nachweisbar.

5.2. Homo- und Heterodimerisierung von DPF3

Das Vorhandensein von zwei DPF3 Isoformen (Ninkina *et al.* 2001) im BAF Chromatin Remodeling Komplex, von denen jedoch nur DPF3b in der Lage ist an acetylierte und methylierte H3 und H4 Histone zu binden (Lange *et al.* 2008), lassen eine regulatorische Funktion von DPF3a vermuten. Eine der Möglichkeiten für die Regulation des Transkriptionsfaktors könnte die Ausbildung von Heterodimeren zwischen DPF3a und DPF3b sein.

In dieser Diplomarbeit konnten sowohl Homo- als auch Heterodimere von DPF3a und DPF3b *in vitro* nachgewiesen werden (4.4). Der Nachweis erfolgte mithilfe der GST-Pull-down Methode mit Flag- und GST-markierten DPF3a und DPF3b Proteinen. Die Proteine wurden alle auf ihre Expression (4.3) und bei GST-Fusionsproteinen auf ihre Bindung an die Glutathion-Sepharose getestet (4.2). Die GST-Pull-down Versuche wurden wie beschrieben durchgeführt (3.15.8).

Die Funktionalität und Zuverlässigkeit der GST-Pull-down Methode wurde anhand der Positiv- und Negativkontrollen bestätigt (Abbildung 4-7).

Obwohl in jedem Pull-down Versuch gleiche Mengen an Glutathion-Sepharose und gleiche Konzentrationen von HEK293T-Zellysaten eingesetzt wurden, kann keine eindeutige Aussage zur Stärke der verschiedenen Interaktionen gemacht werden. Die Vergleiche der Bandenintensitäten zwischen Input und Pull-down Ansätzen lieferten jedoch interessante Beobachtungen. Der Pull-down mit GST-DPF3a und Flag-DPF3a lieferte im Western-Blot die stärkste Proteinbande. Die Homodimerisierung von DPF3b war auch eindeutig, lieferte aber nicht so ein starkes Signal. Am wenigstens prägnant waren die Ergebnisse der Pull-down Versuche, die zur Untersuchung der Heterodimerisierung von DPF3 durchgeführt wurden. Es scheint, dass bei dem Transkriptionsfaktor DPF3b die Homodimerisierung bevorzugt wird, jedoch kann die Aussage aus folgendem Grund nicht bestätigt werden. Bei der Untersuchung der Heterodimerisierung von DPF3b wurde festgestellt, dass die Kombination von GST-DPF3a und Flag-DPF3b ein positives Signal im Western-Blot geliefert hat, aber deren Intensität wesentlich stärker als für die umgekehrte Kombination GST-DPF3b und Flag-DPF3a war. Dies würde bedeuten, dass der DPF3 Transkriptionsfaktor in einer der Kombinationen einfacher heterodimerisiert als in der anderen. Dies entspricht jedoch nicht den Erwartungen, es sei denn, dass die Fähigkeit zur Bildung von

Dimeren von Flag-DPF3b Protein verringert ist. Eine plausible Erklärung für diese Theorie könnte sein, dass nicht die Gesamtheit der überexprimierten Flag-DPF3b Fusionsproteine funktionell aktiv waren, was zwar zu einer verminderten Fähigkeit zur Bildung von Homo- und Heterodimeren führte, aber die Detektion von Flag-DPF3b auf dem Western-Blot nicht störte (Flag-DPF3b war immer im Input deutlich zu sehen). Es könnte auch sein, dass die Bildung von Homo- und Heterodimeren mit Flag-DPF3b durch verschiedene, unbekannte Faktoren beeinflusst war, die bei Flag-DPF3a keine Rolle spielten.

Im Laufe der Pull-down Versuche konnte die Tendenz einer stärkeren Wechselwirkung zwischen Flag-DPF3a und GST-Fusionsproteinen im Vergleich zu Flag-DPF3b immer wieder gesehen werden. Deswegen wird im Laufe der Diskussion immer nur von einer oder keiner Bindung, aber nicht von den Bindungsintensitäten gesprochen.

5.3. Identifizierung der Dimerisierungsdomäne von DPF3

Nachdem die Homo- und Heterodimere von dem Transkriptionsfaktor DPF3 nachgewiesen wurden, wurde nach der möglichen Dimerisierungsdomäne des Transkriptionsfaktors gesucht. Dafür wurden GST-Pull-down Assays mit verschiedenen GST- und Flag-getaggen DPF3 Deletionskonstrukten durchgeführt, die alle bereits auf die Expression und Bindung an Glutathion-Sepharose getestet worden waren. Die Erwartung war, dass eines der Konstrukte mit Vollängen DPF3a und DPF3b nicht mehr interagieren kann, was die Identifizierung der Dimerisierungsdomäne ermöglichen würde.

Zuerst wurde ein Deletionskonstrukt von DPF3a ohne spezifischen C-Terminus auf Interaktion mit Vollängen DPF3a und DPF3b getestet. Der Wahl dieses Konstruktes erfolgte aus verschiedenen Gründen:

- 1) Beide DPF3 Isoformen unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz nur im C-terminalen Bereich (Abbildung 1-1). Die Spleißvariante DPF3b enthält am C-Terminus zwei tandemförmig angeordnete PHD Finger. DPF3a dagegen enthält die Sequenz des ersten halben PHD Fingers, dafür aber einen spezifischen C-Terminus (Ninkina *et al.* 2001).

DISKUSSION

2) Beide DPF3 Isoformen sind Mitglieder des BAF Chromatin Remodeling Komplexes, besitzen jedoch noch andere Funktionen (Lange *et al.* 2008). Die DPF3b Isoform bindet durch ihre PHD Finger an acetylierte und methylierte Histonen, was die DPF3a Isoform mit ihrem halben PHD Finger und dem spezifischen C-Terminus nicht kann. Es wird daher eine regulatorische Funktion von DPF3a vermutet.

Wenn die Regulation der Proteine durch Heterodimerisierung beeinflusst werden könnte (Amoutzias *et al.* 2007), wäre es daher gut möglich, dass der spezifische C-Terminus von DPF3a die Dimerisierungsdomäne enthalten würde. Die Ergebnisse des Pull-down Experimentes (Abbildung 4-8 A) zeigten jedoch, dass dies nicht der Fall sein kann, da das beschriebene Flag-Deletionskonstrukt sowohl mit Vollängen GST-DPF3a als auch GST-DPF3b interagiert.

Die Homo- und Heterodimerisierung von DPF3 wurde mit einem weiteren Deletionskonstrukt untersucht. Dieses Konstrukt enthielt den N-terminalen Bereich (also die Aminosäuresequenz, die sowohl in DPF3a als auch DPF3b vorhanden ist) aber nicht den C-terminalen Bereich, deren Aminosäuresequenz bei beiden Isoformen unterschiedlich ist. Dadurch sollte untersucht werden, ob es eine, für die beiden DPF3 Isoformen gemeinsame, Dimerisierungsdomäne gibt. Die Ergebnisse des Pull-down Experimentes zeigten, dass es in der Tat eine Dimerisierungsdomäne im N-terminalen Bereich von DPF3 gibt, die an der Ausbildung von Homo- und Heterodimeren beteiligt ist (Abbildung 4-8 B).

Um die Lage der Dimerisierungsdomäne näher zu bestimmen, wurden Pull-down Experimente mit GST-DPF3b-Deletionskonstrukten, denen im verschiedenem Ausmaß der N-Terminus fehlte, mit Vollängen Flag-DPF3a und Flag-DPF3b durchgeführt (Abbildung 4-9). Die Konstrukte wurden dabei in einer Reihe von dem längsten (ein GST-DPF3 Konstrukt, dem die ersten 168 Aminosäuren und dadurch die 2/3 Domäne fehlte) zu dem kürzesten (der zweite PHD Finger von DPF3b) angeordnet (Abbildung 4-9, schematisch dargestellt). Erwartet wurde, dass sobald die Dimerisierungsdomäne in einem der Konstrukte fehlt der Pull-down Ergebnis negativ wird. Als Folge davon sollten die Pull-down Ergebnisse mit allen kürzeren Konstrukten aus der Reihe ebenfalls negativ werden. Dies war jedoch nicht der Fall. Fast alle getesteten GST-Deletionskonstrukte zeigten jedoch Interaktionen mit Vollängen Flag-DPF3a und Flag-DPF3b. Unter den Konstrukten, die interagierten,

befanden sich auch Konstrukte, die GST-Proteine ohne den bereits untersuchten N-terminalen Bereich kodierten.

Auf den ersten Blick widersprechen diese Ergebnisse den Daten der früheren Pull-down Versuche mit C-terminal verkürzten DPF3 Konstrukten. Wenn man jedoch bedenkt, dass in allen Experimenten die Deletionskonstrukte immer mit Vollängen DPF3a und DPF3b Proteinen getestet wurden, können diese Beobachtungen mit dem Vorhandensein von zwei Dimerisierungsdomänen im DPF3 Protein erklärt werden. Die erste Domäne könnte N-terminal liegen und gemeinsam für beide DPF3 Spleißformen sein. Die andere Domäne könnte im C-Terminus liegen, und unterschiedlich für DPF3a und DPF3b sein.

Im Fall von DPF3b konnte als die C-terminal gelegene Domäne der zweite PHD Finger identifiziert werden. Das GST-Konstrukt, das nur noch diese Domäne des DPF3b Proteins enthielt, konnte noch an Flag-DPF3a und Flag-DPF3b binden. Das einzige Konstrukt, dem dieser PHD Finger fehlte, hat dagegen keine Interaktion im GST-Pull-down gezeigt. In der Literatur ist bereits ein PHD Finger beschrieben, welcher Dimere ausbilden kann (Nakamura *et al.* 2007). Das Protein Pygopus besitzt im C-Terminus einen PHD Finger, welcher an der Bindung von BCL/Legless (ein Bestandteil des Wnt-Signalweges) und der Erkennung von H3K4me beteiligt ist (Fiedler *et al.* 2008). Röntgenstrukturanalysen zeigten, dass der PHD Finger von Pygopus sowohl im Kristall als auch in der Lösung Dimere ausbildet, was einen Einfluss auf die Bindungsaffinität des Proteins an BCL/Legless hat (Nakamura *et al.* 2007).

Für die DPF3a Spleißform konnte die Rolle des halben PHD Fingers und des spezifischen C-Terminus in der Homo- und Heterodimerisierung von DPF3 nicht bestätigt werden.

Schließlich sollte untersucht werden, wie die Dimerisierungsdomänen von DPF3 miteinander interagieren. Dies könnte wichtige Informationen zu dem Aufbau der Homo- und Heterodimere von dem Transkriptionsfaktor liefern.

Theoretisch gibt es, beim Vorhanden von zwei unterschiedlichen Dimerisierungsdomänen, zwei Möglichkeiten zur Ausbildung von Dimeren. Der erste Weg ist die Dimerisierung durch Wechselwirkungen der gleichen Dimerisierungsdomänen jedes Monomers miteinander. Im Fall von DPF3 würde das bedeuten, dass die Interaktionen zwischen der N-terminal gelegenen Domänen zweier

DISKUSSION

DPF3 Molekülen stattfinden. Zusätzlich interagieren auch die C-terminalen Domänen miteinander. Die entstehenden Homo- und Heterodimere ähneln in ihrem Aufbauprinzip den Dimeren von nuklearen Rezeptoren des Typs I (Aranda and Pascual 2001).

Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, dass die zwei unterschiedliche Dimerisierungsdomäne miteinander interagieren. Dies würde bedeuten, dass die DPF3 Homo- und Heterodimere in ihrem Aufbauprinzip z.B. den Dimeren von STAT-Proteinen ähneln (Heim 1999). Bei diesen Transkriptionsfaktoren bewirkt die Phosphorylierung eines bestimmten Tyrosins den Dimerisierungsvorgang. Das phosphorylierte Tyrosin des einen Monomers wird von einer SH2-Domäne eines zweiten Monomers gebunden (Machida and Mayer 2005) wobei gleichzeitig das phosphorylierte Tyrosin des zweiten mit der SH2-Domäne des ersten Monomers interagiert. Das resultiert in einer Anordnung beider Moleküle zum Dimer wie sie in Abbildung (Abbildung 5-1) dargestellt ist. DPF3 Dimere könnten eine ähnliche Anordnung aufweisen.

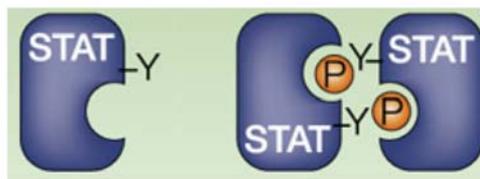


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der STAT-Proteine. Links gezeigt ein Monomer mit einer SH2-Domäne (Einbuchtung) und dem Tyrosinrest (Y), der phosphoryliert werden kann. Rechts sind die Dimere, die nach der Phosphorylierung der Tyrosine entstehen (Shuai and Liu 2003).

Um die beiden Theorien zu überprüfen wurde ein GST-Pull-down Versuch mit einem Flag-getagtem DPF3 Deletionskonstrukt ohne C-Terminus und drei GST-Deletionskonstrukten CG154 (DPF3 ebenfalls ohne C-Terminus), CG146 (der halbe PHD Finger und C-Terminus von DPF3a) und CG144 (beide PHD Finger von DPF3b) durchgeführt (Abbildung 4-10). Die Ergebnisse des Pull-down-Assays zeigten eine Interaktion zwischen den N-terminalen Domänen von DPF3. Folglich kann man auch eine Interaktion zwischen den C-terminal gelegenen PHD Fingern

zweier DPF3b Moleküle in den Homodimeren vermuten. Die Rolle des C-Terminus von DPF3a bei der Ausbildung der Homo- und Heterodimeren ist nicht bekannt.

Anhand der vorgestellten Ergebnisse wird folgendes Modell der DPF3 Homo- und Heterodimerisierung vorgeschlagen (Abbildung 5-2).

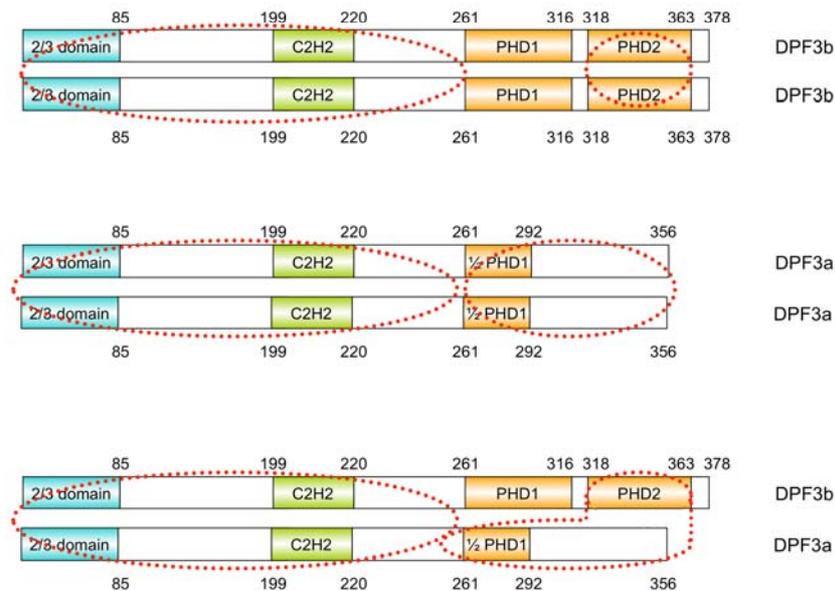


Abbildung 5-2: Die Abbildung zeigt schematisch die möglichen Homo- und Heterodimere von DPF3. Rot markiert sind immer die Proteinbereiche, die vermutlich Dimerisierungsdomänen tragen. Im Fall von Heterodimeren wird die Wechselwirkung zwischen dem zweiten PHD-Finger von DPF3b und dem C-Terminus von DPF3a vermutet. In blau- 2/3 Domäne, in Grün- C2H2 Zinkfinger, in Orange- Plant Homeodomäne.

Das Modell basiert auf den Ergebnissen der durchgeführten GST-Pull-down Versuche. Die Aussagen, die anhand der Versuche gemacht wurden und zur Erstellung des Modells beigetragen haben, werden noch mal kurz zusammengefasst:

- 1) Es gibt sowohl Homo- als auch Heterodimere des epigenetischen Transkriptionsfaktors DPF3.
- 2) Es gibt eine gemeinsame Dimerisierungsdomäne für DPF3a und DPF3b, die im N-terminalen Bereich der Proteine lokalisiert ist.
- 3) Bei der DPF3b Isoform ist der zweiten PHD Finger eine zweite, C-terminal gelegene Dimerisierungsdomäne.

- 4) Die N-terminal gelegenen Domänen interagieren miteinander aber nicht mit dem zweiten PHD Finger von DPF3b oder dem C-Terminus von DPF3a.
- 5) Es besteht eine Vermutung, dass der halbe PHD Finger und der spezifische C-Terminus von DPF3a ebenfalls eine Rolle in der Homo- und Heterodimerisierung spielen können.

Zum Schluss soll noch das Pull-down Ergebnis kurz erwähnt werden, das fraglich war. Bei der Untersuchung der N-terminalen Dimerisierungsdomäne (detaillierte Beschreibung des Versuches erfolgte bereits im Text) konnte man sehen, dass das längste der GST-Konstrukte (CG060, GST-DPF3b_aa169-378), bei dem die ersten 168 Aminosäuren, und dadurch die gesamte 2/3-Domäne fehlte, weder an DPF3a noch DPF3b gebunden hat (Abbildung 4-9). Dieses Ergebnis hat jedoch bei der Identifizierung der Dimerisierungsdomäne nicht geholfen, da kürzere GST-DPF3b-Deletionskonstrukte immer noch mit Flag-DPF3a und Flag-DPF3b interagiert haben. Wieso gerade dieses Konstrukt im Pull-down ein negatives Ergebnis geliefert hat ist nicht geklärt. Möglich wäre, dass die Faltung des Konstruktes nicht richtig oder unvollständig war, was einen schlechten Zugang zu der Dimerisierungsdomäne verursacht haben könnte.

5.4. Interaktionen von DPF3 mit DPF1 und DPF2

Die Mitglieder der d4-Genfamilie zeigen alle eine ähnliche Domänenstruktur und sind untereinander hoch konserviert (Chestkov *et al.* 1996). Für die Untersuchung der Interaktionen von DPF3 mit DPF1 und DPF2 wurden Flag-getaggte DPF1 und DPF2 Proteine kloniert (3.14) und ihre Expression wurde in HEK293T-Zellen getestet (4.3). Die GST-Pull-down Ergebnisse zeigten Interaktionen von DPF3a und DPF3b Proteinen mit DPF2 (ubi-d4, Requiem). Bis jetzt war der Transkriptionsfaktor DPF2 mit der Regulation von Apoptose in Verbindung gebracht worden (Gabig *et al.* 1994). DPF3 ist in die Regulation der Genexpression während der Herzentwicklung involviert (Lange *et al.* 2008). Beide Proteine wurden als Mitglieder des BAF Chromatin Remodeling Komplexes identifiziert (Lessard *et al.* 2007). Die nachgewiesene Interaktion zwischen beiden Proteinen läßt vermuten, dass sie sich gegenseitig regulieren, was einen Einfluss auf die bereits beschriebenen Funktionen

haben kann. Weiterhin könnten die Proteine bisher unbekannte Funktionen haben, die durch die identifizierten Interaktionen erst ermöglicht werden.

Die GST-Pull-down Ergebnisse zeigten interessanterweise keine Interaktion von DPF3a und DPF3b Proteinen mit DPF1 (Neuro-d4). Dies ist interessant, da sowohl DPF1 als auch DPF3 Komponenten des BAF Chromatin Remodeling Komplexes im Zentralnervensystem der Maus sind (Lessard *et al.* 2007). Die Studien ergaben, dass während der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Neuronen die Zusammensetzung der Komponenten der BAF Komplexe verändert wird. Mitunter erfolgt der Austausch von PHF10 (BAF45a) gegen DPF1 und/oder DPF3, wobei nur DPF3a untersucht wurde. Dieser Prozess ist für die Differenzierung der Neuronen während der Mausembryonalentwicklung notwendig. In dieser Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass die PHD Finger von DPF1 die gleichen Bindungseigenschaften an H3K14ac, H3K4me, H3K4me2, H3K4me3 und H4K5ac wie die PHD Finger von DPF3 aufweisen (Lange *et al.* 2008). Zusammenfassend lassen die Ergebnisse auf ähnliche Funktion beider Transkriptionsfaktoren DPF1 und DPF3 während der Entwicklung des Nervensystems schließen. Weiterhin lässt das Auftreten mehrerer Spleißvarianten von DPF1 (Buchman *et al.* 1992) vermuten, dass auch diese Proteine untereinander Homo- und Heterodimere ausbilden können.

5.5. GST-Pull-down – Limitierungen

Die GST-Pull-down Methode diene zum qualitativen *in vitro* Nachweis der DPF3 Dimerisierung, sowie zur Untersuchung der Interaktionen von DPF3 mit zwei weiteren Mitgliedern der d4-Genfamilie, DPF1 und DPF2. Die GST-Pull-down Methode besitzt jedoch Limitierungen. Aufgrund der Arbeiten mit HEK293T-Zelllysaten und den darin vorliegenden endogenen Proteinen kann man nicht ausschließen, dass die beobachteten Interaktionen nur indirekt sind. Durch Verwendung der humanen Zelllinie als Expressionssystem könnte es zu Interaktionen zwischen überexprimierten Flag-Fusionsproteinen mit endogenen Proteinen gekommen sein. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Flag-Fusionsproteine im Zellkern der HEK293T-Zellen detektiert wurden, was Wechselwirkungen mit weiteren Mitgliedern des BAF Chromatin Remodeling Komplexes und/oder anderen Effektorproteinen vermuten lässt. Um in einem GST-

Pull-down eine direkte Interaktion nachzuweisen, könnte man die Flag-Fusionsproteine mithilfe einer *in vitro* Translation erstellen. Solche Experimente wurden jedoch im Rahmen der Diplomarbeit nicht durchgeführt. In Zukunft sollten weitere Methoden, die auf einem anderen Prinzip basieren, zur Bestätigung der Ergebnisse angewendet werden. Unter anderem könnten beide Proteine mit einem Fusionstag versehen und aufgereinigt werden (z.B. His und GST), um die endogenen Zellbestandteile auszuschließen. Desweiteren könnte einer der zu testenden Interaktionspartner *in vitro* translatiert und zur sensitiveren Detektion nach dem Pull-down radioaktiv markiert werden. Eine denkbare Lösung wäre auch das Hefe-zwei-Hybrid-System (Luban and Goff 1995). Die Technik ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Hefe, d.h im *in vivo* Milieu einer eukaryotischen Zelle, was ein Vorteil gegenüber von GST-Pull-down Assays ist. Die Methode hat aber eine hohe Fehlerquote und liefert oft falsch positive oder falsch negative Ergebnisse, was eindeutige Aussagen erschwert. Nichtsdestotrotz wäre das Hefe-zwei-Hybrid-System eine Möglichkeit zur Bestätigung der GST-Pull-down Ergebnisse.

5.6. Die Isoform DPF1d

Für die Untersuchung der Interaktionen von dem epigenetischen Transkriptionsfaktors DPF3 mit DPF1 wurde ein Flag-DPF1 Fusionsprotein hergestellt. Die Ergebnisse der Klonierung aus cDNA von HEK293T-Zellen lieferten die Identifizierung einer neuen humanen DPF1 Isoform d. Bisher waren nur drei Spleißvarianten von DPF1 bekannt (Abbildung 4-13, (Chestkov *et al.* 1996)). DPF1d wurde als die längste Isoform von allen identifiziert, die sowohl die C2H2 Zinkfinger Domäne als auch einen verlängerten, zweiten PHD-Finger besitzt. Die Isoform konnte mithilfe von PCR mit Primern, welche gegen die verschiedenen Exonvarianten gerichtet waren validiert werden. Anhand dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass die Exonzusammensetzung, die für die DPF1 Isoform c charakteristisch war, nur in dieser Isoform zu finden war. Es stellte sich außerdem heraus, dass die Isoformen, welche Exon II enthalten (DPF1a, DPF1b und DPF1d) kein Exon I in ihrer mRNA Sequenz tragen.

Das Auftreten von zwei verschiedenen PHD Finger Varianten in DPF1 Isoformen ist auf alternatives Spleißen zurückzuführen. Auf Proteinebene unterscheiden sich die PHD Finger von DPF1d und DPF1b von den PHD Fingern der Isoformen DPF1a und DPF1c durch das Auftreten von 10 zusätzlichen Aminosäuren. Es sind die Aminosäuren Gly-Ala-Ser-Trp-Ala-Gly-Leu-Thr-Pro-Gln die zwischen den Positionen 321 und 330 liegen. Der Sequenzvergleich mithilfe von Blast und die Suche in der PROSITE Datenbank (<http://www.expasy.ch/prosite/>) ergab für diese Aminosäuren kein strukturelles Motiv. In der zweidimensionalen Struktur führen diese Aminosäuren wahrscheinlich zu einer Verlängerung eines ersten Loops des PHD Fingers (Abbildung 1-5). Welchen Einfluss das auf die tatsächliche Faltung und dreidimensionale Struktur von DPF1 haben kann, ist jedoch nicht bekannt. Die 10 AS sind alle ungeladen. Glycin, Alanin und Leucin gehören zu den hydrophoben Aminosäuren mit kleinen Seitenketten. Weiterhin ist in der Abfolge die aromatische Aminosäure Tryptophan, hydrophiles Serin und Threonin, und ein basisches Glutamin zu finden. Außer Tryptophan und Glutamin besitzen alle Aminosäuren kleine Seitenketten. Das Auftreten von Prolin, was als Helixbrecher bezeichnet wird, könnte vielleicht einen Effekt auf die Sekundärstruktur der PHD-Finger ausüben. Eindeutige Aussagen sind jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

Desweiteren war es sehr interessant zu untersuchen, welche Auswirkung diese 10 AS auf die Erkennung der modifizierten Histonpeptide der Histone H3 und H4 hat. Um das näher zu untersuchen, wurden die PHD Finger von DPF1d in den pGEX3x-Vektor kloniert, was die Erstellung des GST-markierten Konstruktes und Durchführung des GST-Histon-Pulldowns mit biotinylierten Histonpeptiden ermöglichte (4.8.2). Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigten jedoch keine Unterschiede in der Bindung an modifizierte Histone H3. Beide DPF1 Isoformen erkennen mit gleicher Spezifität die gleichen Histon H3 Modifikationen, welche auch von DPF3b erkannt werden (Lange *et al.* 2008). Die DPF1d Isoform erkennt auch acetyliertes Lysin 5 von Histon 4 (bei DPF1a wurde diese Modifikation nicht untersucht). Diese Interaktion findet ebenfalls bei DPF3b statt. Es ist jedoch möglich, dass es unterschiedliche Bindungseigenschaften gegenüber anderen Histonmodifikationen gibt, die hier nicht getestet wurden.

DISKUSSION

6. Zusammenfassung

DPF3 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher spezifisch im Herz-, Skelettmuskel- und Neuronalgewebe während der Maus- und Huhnembryonalentwicklung exprimiert wird (Lange *et al.* 2008). Weiterhin ist es ein Bestandteil des BAF Chromatin Remodeling Komplexes. Es sind zwei Spleißformen von DPF3 bekannt. Die längere Isoform DPF3b enthält in ihrem C-Terminus zwei tandemartig angeordnete PHD Fingern, die mit acetylierten und methylierten Histonen H3 und H4 wechselwirken können. Die kürzere Isoform DPF3a enthält nur den ersten Teil des ersten PHD-Finger und kann keine modifizierten Histone erkennen, was auf eine andere Funktion dieser Isoform schließen lässt.

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden mithilfe der GST-Pull-down Methode sowohl Homo- als auch Heterodimere von DPF3 qualitativ *in vitro* nachgewiesen. Weiterhin konnte das Vorhandensein zweier Dimerisierungsdomänen in dem Transkriptionsfaktor DPF3b nachgewiesen werden. Der zweite PHD-Finger von DPF3b wurde mit großer Wahrscheinlichkeit als eine der Domänen identifiziert. Weiterhin wurde festgestellt, dass die zweite Dimerisierungsdomäne N-terminal gelegen ist und somit in beiden Spleißformen vorkommt. Die Identifikation einer zweiten Dimerisierungsdomäne bei DPF3a war nicht erfolgreich. Die N-terminal gelegene Dimerisierungsdomänen beider Monomere interagieren miteinander, jedoch nicht mit dem PHD-Finger von DPF3b oder dem C-Terminus von DPF3a.

Weiterhin konnte eine Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor DPF3 und DPF1, einem weiteren Mitglied der d4-Genfamilie, festgestellt werden. DPF1 ist ebenfalls eine Komponente des BAF Chromatin Remodeling Komplexes, dessen Expression jedoch in der Maus und der Ratte auf das Zentralnervensystem beschränkt ist (Buchman *et al.* 1992). Der Faktor interagiert sowohl mit DPF3a als auch mit DPF3b.

Bei der Klonierung von DPF1 aus cDNA von HEK293T-Zellen konnte eine neue Isoform des Proteins entdeckt werden. Die Isoform DPF1d stellt die vierte bekannte Spleißform dar, die im humanen Organismus bekannt ist. Die PHD Finger von DPF1d tragen im Vergleich zur Isoform DPF1a und DPF1c 10 zusätzliche Aminosäuren. Im Rahmen der Diplomarbeit wurde nachgewiesen, dass dieser Unterschied keinen

ZUSAMMENFASSUNG

Einfluss auf die Spezifität und Intensität der Wechselwirkungen mit modifizierten Histonpeptiden (H3K14ac, H3K4me, H3K4me2) hat.

7. Literaturverzeichnis

- Aasland, R., T. J. Gibson and A. F. Stewart (1995) The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* **20**, 56-9.
- Adams-Cioaba, M. A. and J. Min (2009) Structure and function of histone methylation binding proteins. *Biochem Cell Biol.* **87**, 93-105.
- Amoutzias, G. D., E. E. Pichler, N. Mian, D. De Graaf, A. Imsiridou, M. Robinson-Rechavi, E. Bornberg-Bauer, D. L. Robertson and S. G. Oliver (2007) A protein interaction atlas for the nuclear receptors: properties and quality of a hub-based dimerisation network. *BMC Syst Biol.* **1**, 34.
- Aranda, A. and A. Pascual (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* **81**, 1269-304.
- Barski, A., S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev and K. Zhao (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* **129**, 823-37.
- Brayer, K. J. and D. J. Segal (2008) Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains. *Cell Biochem Biophys.* **50**, 111-31.
- Brown, R. S. (2005) Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol.* **15**, 94-8.
- Buchman, V. L., N. N. Ninkina, Y. D. Bogdanov, A. L. Bortvin, H. N. Akopian, S. L. Kiselev, O. Krylova, K. V. Anokhin and G. P. Georgiev (1992) Differential splicing creates a diversity of transcripts from a neurospecific developmentally regulated gene encoding a protein with new zinc-finger motifs. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5579-85.
- Chestkov, A. V., I. D. Baka, M. V. Kost, G. P. Georgiev and V. L. Buchman (1996) The d4 gene family in the human genome. *Genomics.* **36**, 174-7.
- Ebbert, R., A. Birkmann and H. J. Schuller (1999) The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of *Saccharomyces cerevisiae* required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex. *Mol Microbiol.* **32**, 741-51.
- Fiedler, M., M. J. Sanchez-Barrena, M. Nekrasov, J. Mieszczanek, V. Rybin, J. Muller, P. Evans and M. Bienz (2008) Decoding of methylated histone H3 tail by the Pygo-BCL9 Wnt signaling complex. *Mol Cell.* **30**, 507-18.
- Fischer, A., J. Klattig, B. Kneitz, H. Diez, M. Maier, B. Holtmann, C. Englert and M. Gessler (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**, 8960-70.
- Gabig, T. G., C. D. Crean, A. Klenk, H. Long, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, D. Quincey, F. Parente, F. Lespinasse, G. F. Carle, P. Gaudray, C. X. Zhang, A. Calender, J. Hoepfener, K. Kas, R. V. Thakker, F. Farnebo, B. T. Teh, C. Larsson, F. Piehl, J. Lagercrantz, S. Khodaei, E. Carson and G. Weber (1998) Expression and chromosomal localization of the Requiem gene. *Mamm Genome.* **9**, 660-5.
- Gabig, T. G., P. L. Mantel, R. Rosli and C. D. Crean (1994) Requiem: a novel zinc finger gene essential for apoptosis in myeloid cells. *J Biol Chem.* **269**, 29515-9.

- Grunau, C., J. Buard, M. E. Brun and A. De Sario (2006) Mapping of the juxtacentromeric heterochromatin-euchromatin frontier of human chromosome 21. *Genome Res.* **16**, 1198-207.
- Heim, M. H. (1999) The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res.* **19**, 75-120.
- Ho, L., J. L. Ronan, J. Wu, B. T. Staahl, L. Chen, A. Kuo, J. Lessard, A. I. Nesvizhskii, J. Ranish and G. R. Crabtree (2009) An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 5181-6.
- Hoyal, C. R., S. Kammerer, R. B. Roth, R. Reneland, G. Marnellos, M. Kiechle, U. Schwarz-Boeger, L. R. Griffiths, F. Ebner, J. Rehbock, M. R. Nelson and A. Braun (2005) Genetic polymorphisms in DPF3 associated with risk of breast cancer and lymph node metastases. *J Carcinog.* **4**, 13.
- Iuchi, S. (2001) Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci.* **58**, 625-35.
- Kassabov, S. R., B. Zhang, J. Persinger and B. Bartholomew (2003) SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome. *Mol Cell.* **11**, 391-403.
- Kaynak, B., A. von Heydebreck, S. Mebus, D. Seelow, S. Hennig, J. Vogel, H. P. Sperling, R. Pregla, V. Alexi-Meskishvili, R. Hetzer, P. E. Lange, M. Vingron, H. Lehrach and S. Sperling (2003) Genome-wide array analysis of normal and malformed human hearts. *Circulation.* **107**, 2467-74.
- Koch, C. M., R. M. Andrews, P. Flicek, S. C. Dillon, U. Karaoz, G. K. Clelland, S. Wilcox, D. M. Beare, J. C. Fowler, P. Couttet, K. D. James, G. C. Lefebvre, A. W. Bruce, O. M. Dovey, P. D. Ellis, P. Dhami, C. F. Langford, Z. Weng, E. Birney, N. P. Carter, D. Vetrie and I. Dunham (2007) The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res.* **17**, 691-707.
- Lan, F., R. E. Collins, R. De Cegli, R. Alpatov, J. R. Horton, X. Shi, O. Gozani, X. Cheng and Y. Shi (2007) Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression. *Nature.* **448**, 718-22.
- Lange, M., B. Kaynak, U. B. Forster, M. Tonjes, J. J. Fischer, C. Grimm, J. Schlesinger, S. Just, I. Dunkel, T. Krueger, S. Mebus, H. Lehrach, R. Lurz, J. Gobom, W. Rottbauer, S. Abdelilah-Seyfried and S. Sperling (2008) Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes Dev.* **22**, 2370-84.
- Latham, J. A. and S. Y. Dent (2007) Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol.* **14**, 1017-1024.
- Lessard, J., J. I. Wu, J. A. Ranish, M. Wan, M. M. Winslow, B. T. Staahl, H. Wu, R. Aebersold, I. A. Graef and G. R. Crabtree (2007) An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron.* **55**, 201-15.
- Lickert, H., J. K. Takeuchi, I. Von Both, J. R. Walls, F. McAuliffe, S. L. Adamson, R. M. Henkelman, J. L. Wrana, J. Rossant and B. G. Bruneau (2004) Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodeling complexes in heart development. *Nature.* **432**, 107-12.
- Luban, J. and S. P. Goff (1995) The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions. *Curr Opin Biotechnol.* **6**, 59-64.

- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. **389**, 251-60.
- Machida, K. and B. J. Mayer (2005) The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim Biophys Acta*. **1747**, 1-25.
- Marks, P., R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller and W. K. Kelly (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*. **1**, 194-202.
- Maurer-Stroh, S., N. J. Dickens, L. Hughes-Davies, T. Kouzarides, F. Eisenhaber and C. P. Ponting (2003) The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci*. **28**, 69-74.
- Mertsalov, I. B., D. A. Kulikova, N. N. Ninkina, O. B. Simonova, V. L. Buchman and L. I. Korochkin (2000) [Genomic organization of the murine neuro-d4 gene]. *Genetika*. **36**, 314-7.
- Mujtaba, S., L. Zeng and M. M. Zhou (2007) Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene*. **26**, 5521-7.
- Nakamura, Y., T. Umehara, H. Hamana, Y. Hayashizaki, M. Inoue, T. Kigawa, M. Shirouzu, T. Terada, A. Tanaka, B. Padmanabhan and S. Yokoyama (2007) Crystal structure analysis of the PHD domain of the transcription co-activator Pygopus. *J Mol Biol*. **370**, 80-92.
- Ng, S. S., W. W. Yue, U. Oppermann and R. J. Klose (2009) Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci*. **66**, 407-22.
- Niessen, K. and A. Karsan (2008) Notch signaling in cardiac development. *Circ Res*. **102**, 1169-81.
- Ninkina, N. N., I. B. Mertsalov, D. A. Kulikova, M. V. Alimova-Kost, O. B. Simonova, L. I. Korochkin, S. L. Kiselev and V. L. Buchman (2001) Cerd4, third member of the d4 gene family: expression and organization of genomic locus. *Mamm Genome*. **12**, 862-6.
- Ruthenburg, A. J., C. D. Allis and J. Wysocka (2007) Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell*. **25**, 15-30.
- Schindler, U., H. Beckmann and A. R. Cashmore (1993) HAT3.1, a novel Arabidopsis homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *Plant J*. **4**, 137-50.
- Shuai, K. and B. Liu (2003) Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. **3**, 900-11.
- Simone, C. (2006) SWI/SNF: the crossroads where extracellular signaling pathways meet chromatin. *J Cell Physiol*. **207**, 309-14.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*. **403**, 41-5.
- Takeuchi, J. K. and B. G. Bruneau (2009) Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature*. **459**, 708-11.
- Taverna, S. D., S. Ilin, R. S. Rogers, J. C. Tanny, H. Lavender, H. Li, L. Baker, J. Boyle, L. P. Blair, B. T. Chait, D. J. Patel, J. D. Aitchison, A. J. Tackett and C. D. Allis (2006) Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Mol Cell*. **24**, 785-96.
- Thoma, F., T. Koller and A. Klug (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol*. **83**, 403-27.

LITERATURVERZEICHNIS

- Vignali, M., A. H. Hassan, K. E. Neely and J. L. Workman (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol.* **20**, 1899-910.
- Wysocka, J., T. Swigut, T. A. Milne, Y. Dou, X. Zhang, A. L. Burlingame, R. G. Roeder, A. H. Brivanlou and C. D. Allis (2005) WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell.* **121**, 859-72.

8. Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
Beads	Streptavidin Dyna Dynal Beads der Firma Invitrogen
bidest. H ₂ O	Bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cm	Chloramphenicol
dNTPs	Deoxyribonucleotidphosphate
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothrietol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FSB	Fetales Kälbeserum
GST	Glutathion-S-Transferase
Glutathion-Sepharose	Glutathione Sepharose 4B der Firma GE Healthcare
h	Stunde
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
IF	Immunofluoreszenzfärbung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodaltons
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NP-40	Nonidet P-40 IGEPAL
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PEI	Polyethlenimin
PHD	Plant Homeodomäne
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TOF	<i>Tetralogy of Fallot</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WB	Western Blot

9. Anhang

9.1. Vergleich der Nukleotidsequenzen vier menschlichen DPF1 Isoformen

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

Grau markiert - die Sequenz des Exons 1

Gelb markiert – die Sequenzen der Exone 3a und 3b

Grün markiert – die Sequenz des Exons 8

Blau markiert – die Sequenzen der Exone 12a und 12b

Startkodon ATG und Stopkodon TAG sind fett gedrückt und unterstrichen dargestellt.

DPF1 Isoform a (NM_001135155)

DPF1 Isoform b (NM_004647)

DPF1 Isoform c (NM_001135156)

DPF1 Isoform d (GQ358728)

```

Isoform c      -----GCGGCAGAGCGGGCGGCGCAGGCCGGGCTGGGCCCGCGC 39
Isoform d      -----
Isoform a      GTGCTCCCGCCCCCGGGAATGAATGGATGGGGCGCCTCAGCGCCCGCCGACCGCTGGG 60
Isoform b      GTGCTCCCGCCCCCGGGAATGAATGGATGGGGCGCCTCAGCGCCCGCCGACCGCTGGG 60

Isoform c      GCGGCGGCAGCGGGCGCCCGGGCGGAGGCCGCCAGCCGAGCGGGCCATGGCCACCGCC 99
Isoform d      -----ATGGCCACTGTC 12
Isoform a      AGGACCGACCCCGCGGGGACCTGCTGGGGGCAGGACCCGGGGAGCAAGATGGCCACTGTC 120
Isoform b      AGGACCGACCCCGCGGGGACCTGCTGGGGGCAGGACCCGGGGAGCAAGATGGCCACTGTC 120
                ***** * *

Isoform c      ATTCAGAACCCGCTCAAGTC--GCGAGGACTTCTACCGGAGGCCATCGAGCACTGCCGC 157
Isoform d      ATCCCTGGCCCCCTGAGCCTAGGCGAGGACTTCTACCGGAGGCCATCGAGCACTGCCGC 72
Isoform a      ATCCCTGGCCCCCTGAGCCTAGGCGAGGACTTCTACCGGAGGCCATCGAGCACTGCCGC 180
Isoform b      ATCCCTGGCCCCCTGAGCCTAGGCGAGGACTTCTACCGGAGGCCATCGAGCACTGCCGC 180
                *** *      *** * *      *****

Isoform c      AGTTACAACGCGCGCCTGTGCGCCGAGCGCAGCCTGCGACTGCCCTTCCTCGACTCGCAG 217
Isoform d      AGTTACAACGCGCGCCTGTGCGCCGAGCGCAGCCTGCGACTGCCCTTCCTCGACTCGCAG 132
Isoform a      AGTTACAACGCGCGCCTGTGCGCCGAGCGCAGCCTGCGACTGCCCTTCCTCGACTCGCAG 240
Isoform b      AGTTACAACGCGCGCCTGTGCGCCGAGCGCAGCCTGCGACTGCCCTTCCTCGACTCGCAG 240
                *****

Isoform c      ACCGGCGTGGCCCAAGAACAACCTGCTACATCTGGATGGAGAAGACCCACCGGGCGGGGT 277
Isoform d      ACCGGCGTGGCCCAAGAACAACCTGCTACATCTGGATGGAGAAGACCCACCGGGCGGGGT 192
Isoform a      ACCGGCGTGGCCCAAGAACAACCTGCTACATCTGGATGGAGAAGACCCACCGGGCGGGGT 300
Isoform b      ACCGGCGTGGCCCAAGAACAACCTGCTACATCTGGATGGAGAAGACCCACCGGGCGGGGT 300
                *****

Isoform c      TTGGCCCCGGGACAGATTTACACGTACCCCGCCCGCTGTTGGAGGAAGAAACGGAGACTC 337
Isoform d      TTGGCCCCGGGACAGATTTACACGTACCCCGCCCGCTGTTGGAGGAAGAAACGGAGACTC 252
Isoform a      TTGGCCCCGGGACAGATTTACACGTACCCCGCCCGCTGTTGGAGGAAGAAACGGAGACTC 360
Isoform b      TTGGCCCCGGGACAGATTTACACGTACCCCGCCCGCTGTTGGAGGAAGAAACGGAGACTC 360
                *****

Isoform c      AACATCCTGGAGGACCCAGACTCAGGCCCTGCGAGTACAAGATCGACTGTGAAGCACCC 397
Isoform d      AACATCCTGGAGGACCCAGACTCAGGCCCTGCGAGTACAAGATCGACTGTGAAGCACCC 312
Isoform a      AACATCCTGGAGGACCCAGACTCAGGCCCTGCGAGTACAAGATCGACTGTGAAGCACCC 420
Isoform b      AACATCCTGGAGGACCCAGACTCAGGCCCTGCGAGTACAAGATCGACTGTGAAGCACCC 420
                *****
    
```

ANHANG

Isoform c	CTGAAGAAGGAGGGTGGCCTCCCGAAGGGCCGGTCTCGAGGCTCTACTGTGTGCAGAG	457
Isoform d	CTGAAGAAGGAGGGTGGCCTCCCGAAGGGCCGGTCTCGAGGCTCTACTGTGTGCAGAG	372
Isoform a	CTGAAGAAGGAGGGTGGCCTCCCGAAGGGCCGGTCTCGAGGCTCTACTGTGTGCAGAG	480
Isoform b	CTGAAGAAGGAGGGTGGCCTCCCGAAGGGCCGGTCTCGAGGCTCTACTGTGTGCAGAG *****	480
Isoform c	ACGGGGGAGAAGAAGATTGAGCTGAAGGAGGAGGAGACCATTATGGACTGTCAGAAACAG	517
Isoform d	ACGGGGGAGAAGAAGATTGAGCTGAAGGAGGAGGAGACCATTATGGACTGTCAGAAACAG	432
Isoform a	ACGGGGGAGAAGAAGATTGAGCTGAAGGAGGAGGAGACCATTATGGACTGTCAGAAACAG	540
Isoform b	ACGGGGGAGAAGAAGATTGAGCTGAAGGAGGAGGAGACCATTATGGACTGTCAGAAACAG *****	540
Isoform c	CAGTTGCTGGAGTTTCCGCATGACCTCGAGGTGGAAGACTTGGAGGATGACATTTCCAGG	577
Isoform d	CAGTTGCTGGAGTTTCCGCATGACCTCGAGGTGGAAGACTTGGAGGATGACATTTCCAGG	492
Isoform a	CAGTTGCTGGAGTTTCCGCATGACCTCGAGGTGGAAGACTTGGAGGATGACATTTCCAGG	600
Isoform b	CAGTTGCTGGAGTTTCCGCATGACCTCGAGGTGGAAGACTTGGAGGATGACATTTCCAGG *****	600
Isoform c	AGGAAGAACAGGGCCAAAGGAAAGGCATATGGCATCGGGGGTCTCCGGAACGCCAGGAC	637
Isoform d	AGGAAGAACAGGGCCAAAGGAAAGGCATATGGCATCGGGGGTCTCCGGAACGCCAGGAC	552
Isoform a	AGGAAGAACAGGGCCAAAGGAAAGGCATATGGCATCGGGGGTCTCCGGAACGCCAGGAC	660
Isoform b	AGGAAGAACAGGGCCAAAGGAAAGGCATATGGCATCGGGGGTCTCCGGAACGCCAGGAC *****	660
Isoform c	ACCGCTTCCCTGGAGGACCGAGACAAGCCGTATGTCTGTGATA	697
Isoform d	ACCGCTTCCCTGGAGGACCGAGACAAGCCGTATGTCTGTGATA	612
Isoform a	ACCGCTTCCCTGGAGGACCGAGACAAGCCGTATGTCTGTGATA	720
Isoform b	ACCGCTTCCCTGGAGGACCGAGACAAGCCGTATGTCTGTGATA *****	703
Isoform c	AAGAACCAGGGCCGAGGCTCAGCTACCACTACACCCACACCCACCTGGCCGAGGAGGAGGGG	757
Isoform d	AAGAACCAGGGCCGAGGCTCAGCTACCACTACACCCACACCCACCTGGCCGAGGAGGAGGGG	672
Isoform a	AAGAACCAGGGCCGAGGCTCAGCTACCACTACACCCACACCCACCTGGCCGAGGAGGAGGGG	780
Isoform b	-----	-----
Isoform c	GAGGAGAACGCCGACCGCCACGCGCTGCCCTTCCACCGGAAAAACAACCATAAAAG	817
Isoform d	GAGGAGAACGCCGACCGCCACGCGCTGCCCTTCCACCGGAAAAACAACCATAAAAG	732
Isoform a	GAGGAGAACGCCGACCGCCACGCGCTGCCCTTCCACCGGAAAAACAACCATAAAAG	840
Isoform b	-----AGTTT *****	708
Isoform c	TACAAAGAATTGGCCTGGGTCCCTGAGGCACAAAGGAAACACACAGCCAAGAAGGCGCCC	877
Isoform d	TACAAAGAATTGGCCTGGGTCCCTGAGGCACAAAGGAAACACACAGCCAAGAAGGCGCCC	792
Isoform a	TACAAAGAATTGGCCTGGGTCCCTGAGGCACAAAGGAAACACACAGCCAAGAAGGCGCCC	900
Isoform b	TACAAAGAATTGGCCTGGGTCCCTGAGGCACAAAGGAAACACACAGCCAAGAAGGCGCCC *****	768
Isoform c	GACGGCACTGTCTATCCCCAACGGTACTGTGACTTCTGCCTGGGGGGCTCCAAGAAGACG	937
Isoform d	GACGGCACTGTCTATCCCCAACGGTACTGTGACTTCTGCCTGGGGGGCTCCAAGAAGACG	852
Isoform a	GACGGCACTGTCTATCCCCAACGGTACTGTGACTTCTGCCTGGGGGGCTCCAAGAAGACG	960
Isoform b	GACGGCACTGTCTATCCCCAACGGTACTGTGACTTCTGCCTGGGGGGCTCCAAGAAGACG *****	828
Isoform c	GGGTGTCCCGAGGACCTCATCTCCTGTGCGGACTGTGGGCGATCAGGACACCCCTCGTGT	997
Isoform d	GGGTGTCCCGAGGACCTCATCTCCTGTGCGGACTGTGGGCGATCAGGACACCCCTCGTGT	912
Isoform a	GGGTGTCCCGAGGACCTCATCTCCTGTGCGGACTGTGGGCGATCAGGACACCCCTCGTGT	1020
Isoform b	GGGTGTCCCGAGGACCTCATCTCCTGTGCGGACTGTGGGCGATCAGGACACCCCTCGTGT *****	888
Isoform c	TTACAATTACCGGTGAACATGACGGCAGCCGTGCGGACCTACCGCTGGCAGTGCATCGAG	1057
Isoform d	TTACAATTACCGGTGAACATGACGGCAGCCGTGCGGACCTACCGCTGGCAGTGCATCGAG	972
Isoform a	TTACAATTACCGGTGAACATGACGGCAGCCGTGCGGACCTACCGCTGGCAGTGCATCGAG	1080
Isoform b	TTACAATTACCGGTGAACATGACGGCAGCCGTGCGGACCTACCGCTGGCAGTGCATCGAG *****	948
Isoform c	TGCAAATCCTGCAGCCTGTGCGGAACCTCCGAGAACGACG-----	1097
Isoform d	TGCAAATCCTGCAGCCTGTGCGGAACCTCCGAGAACGACG	1032
Isoform a	TGCAAATCCTGCAGCCTGTGCGGAACCTCCGAGAACGACG-----	1120
Isoform b	TGCAAATCCTGCAGCCTGTGCGGAACCTCCGAGAACGACG	1008
Isoform c	-----ACCAGCTGCTGTTTGTGTGATGACTGCGATCGGGGTTACCACATGTACTGC	1147
Isoform d	-----ACCAGCTGCTGTTTGTGTGATGACTGCGATCGGGGTTACCACATGTACTGC	1092
Isoform a	-----ACCAGCTGCTGTTTGTGTGATGACTGCGATCGGGGTTACCACATGTACTGC	1170
Isoform b	-----ACCAGCTGCTGTTTGTGTGATGACTGCGATCGGGGTTACCACATGTACTGC *****	1068
Isoform c	CTGAGTCCCCCATGGCGGAGCCCCGGAAGGGAGCTGGAGCTGTACCTCTGTCTCCGG	1207
Isoform d	CTGAGTCCCCCATGGCGGAGCCCCGGAAGGGAGCTGGAGCTGTACCTCTGTCTCCGG	1152
Isoform a	CTGAGTCCCCCATGGCGGAGCCCCGGAAGGGAGCTGGAGCTGTACCTCTGTCTCCGG	1230
Isoform b	CTGAGTCCCCCATGGCGGAGCCCCGGAAGGGAGCTGGAGCTGTACCTCTGTCTCCGG *****	1128

Isoform c	CACCTGAAGGAAAAGGCTTCTGCTTACATCACCTCACCTAGGCCGGCTCGGCTCGCCG	1267
Isoform d	CACCTGAAGGAAAAGGCTTCTGCTTACATCACCTCACCTAG-----	1194
Isoform a	CACCTGAAGGAAAAGGCTTCTGCTTACATCACCTCACCTAGGCCGGCTCGGCTCGCCG	1290
Isoform b	CACCTGAAGGAAAAGGCTTCTGCTTACATCACCTCACCTAGGCCGGCTCGGCTCGCCG *****	1188
Isoform c	GACTCTGGGGTGGTGCTCGCCTACTGCCTCTCCGAGCTCCTCAATTCTCCCCACCCTG	1327
Isoform d	GACTCTGGGGTGGTGCTCGCCTACTGCCTCTCCGAGCTCCTCAATTCTCCCCACCCTG	1350
Isoform a	GACTCTGGGGTGGTGCTCGCCTACTGCCTCTCCGAGCTCCTCAATTCTCCCCACCCTG	1248
Isoform b	GACTCTGGGGTGGTGCTCGCCTACTGCCTCTCCGAGCTCCTCAATTCTCCCCACCCTG	1248
Isoform c	AACATCCCGCAGGGGGAGGGGGAGAGGGGAAGCCGAGAGGGGGCTGGGCCACCCCTCC	1387
Isoform d	AACATCCCGCAGGGGGAGGGGGAGAGGGGAAGCCGAGAGGGGGCTGGGCCACCCCTCC	1410
Isoform a	AACATCCCGCAGGGGGAGGGGGAGAGGGGAAGCCGAGAGGGGGCTGGGCCACCCCTCC	1308
Isoform b	AACATCCCGCAGGGGGAGGGGGAGAGGGGAAGCCGAGAGGGGGCTGGGCCACCCCTCC	1308
Isoform c	CCTCTGTGCAAGTGAATGTCTGCCCTGTGGGTGGGTGGGCCCGCCAGGGCCTCTCCCT	1447
Isoform d	CCTCTGTGCAAGTGAATGTCTGCCCTGTGGGTGGGTGGGCCCGCCAGGGCCTCTCCCT	1470
Isoform a	CCTCTGTGCAAGTGAATGTCTGCCCTGTGGGTGGGTGGGCCCGCCAGGGCCTCTCCCT	1368
Isoform b	CCTCTGTGCAAGTGAATGTCTGCCCTGTGGGTGGGTGGGCCCGCCAGGGCCTCTCCCT	1368
Isoform c	CCCTCCCTCCCTCTCTGTCCCTTGGCAAATGGACACCAGGGGCTTCTCCCTCAAAGCCA	1507
Isoform d	CCCTCCCTCCCTCTCTGTCCCTTGGCAAATGGACACCAGGGGCTTCTCCCTCAAAGCCA	1530
Isoform a	CCCTCCCTCCCTCTCTGTCCCTTGGCAAATGGACACCAGGGGCTTCTCCCTCAAAGCCA	1428
Isoform b	CCCTCCCTCCCTCTCTGTCCCTTGGCAAATGGACACCAGGGGCTTCTCCCTCAAAGCCA	1428
Isoform c	TACCCCGCTCTGGGCGGCATGGGGGGTGGTGGGTGCCAGCCAGGGGCATGGACAGAGC	1567
Isoform d	TACCCCGCTCTGGGCGGCATGGGGGGTGGTGGGTGCCAGCCAGGGGCATGGACAGAGC	1590
Isoform a	TACCCCGCTCTGGGCGGCATGGGGGGTGGTGGGTGCCAGCCAGGGGCATGGACAGAGC	1488
Isoform b	TACCCCGCTCTGGGCGGCATGGGGGGTGGTGGGTGCCAGCCAGGGGCATGGACAGAGC	1488
Isoform c	CTTTTCTAAAGAAAAGACAAAAGTTAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAAGAAAAGAAGT	1627
Isoform d	CTTTTCTAAAGAAAAGACAAAAGTTAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAAGAAAAGAAGT	1650
Isoform a	CTTTTCTAAAGAAAAGACAAAAGTTAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAAGAAAAGAAGT	1548
Isoform b	CTTTTCTAAAGAAAAGACAAAAGTTAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAAGAAAAGAAGT	1548
Isoform c	TAATATATACAAAGAGTCTCCAAGGCCTGGCTGGGTGGAGGGGCGCTGCTGAGAGTGTC	1687
Isoform d	TAATATATACAAAGAGTCTCCAAGGCCTGGCTGGGTGGAGGGGCGCTGCTGAGAGTGTC	1710
Isoform a	TAATATATACAAAGAGTCTCCAAGGCCTGGCTGGGTGGAGGGGCGCTGCTGAGAGTGTC	1608
Isoform b	TAATATATACAAAGAGTCTCCAAGGCCTGGCTGGGTGGAGGGGCGCTGCTGAGAGTGTC	1608
Isoform c	CACCGGGCACCCGCTCTGCCGGCCCCCGCGGGCGCCCAACCCCAATTTCTGGAGCT	1747
Isoform d	CACCGGGCACCCGCTCTGCCGGCCCCCGCGGGCGCCCAACCCCAATTTCTGGAGCT	1770
Isoform a	CACCGGGCACCCGCTCTGCCGGCCCCCGCGGGCGCCCAACCCCAATTTCTGGAGCT	1668
Isoform b	CACCGGGCACCCGCTCTGCCGGCCCCCGCGGGCGCCCAACCCCAATTTCTGGAGCT	1668
Isoform c	GCAGCCGTCCCGGCCCCACCCAAGGTGGGCGCCTTCCCTCTTGTGCCAGGGCGGTGG	1807
Isoform d	GCAGCCGTCCCGGCCCCACCCAAGGTGGGCGCCTTCCCTCTTGTGCCAGGGCGGTGG	1830
Isoform a	GCAGCCGTCCCGGCCCCACCCAAGGTGGGCGCCTTCCCTCTTGTGCCAGGGCGGTGG	1728
Isoform b	GCAGCCGTCCCGGCCCCACCCAAGGTGGGCGCCTTCCCTCTTGTGCCAGGGCGGTGG	1728
Isoform c	GCGTGGTGTCCACCCGCCCTCTGGTGCCACGGTGGATACTGCATGATGTGAACCTTG	1867
Isoform d	GCGTGGTGTCCACCCGCCCTCTGGTGCCACGGTGGATACTGCATGATGTGAACCTTG	1890
Isoform a	GCGTGGTGTCCACCCGCCCTCTGGTGCCACGGTGGATACTGCATGATGTGAACCTTG	1788
Isoform b	GCGTGGTGTCCACCCGCCCTCTGGTGCCACGGTGGATACTGCATGATGTGAACCTTG	1788
Isoform c	GTTTTGAACTCTGTTCTGCCCTCCCCGACCGCCCCAGCCTGTGCCCGCCCCGTGCCTG	1927
Isoform d	GTTTTGAACTCTGTTCTGCCCTCCCCGACCGCCCCAGCCTGTGCCCGCCCCGTGCCTG	1950
Isoform a	GTTTTGAACTCTGTTCTGCCCTCCCCGACCGCCCCAGCCTGTGCCCGCCCCGTGCCTG	1848
Isoform b	GTTTTGAACTCTGTTCTGCCCTCCCCGACCGCCCCAGCCTGTGCCCGCCCCGTGCCTG	1848
Isoform c	CCGTGGCTGGTGGGTGGCGGTGGTGGGGCCGGGTGGGCCCCCGCCAGCGCCTGCTGGAA	1987
Isoform d	CCGTGGCTGGTGGGTGGCGGTGGTGGGGCCGGGTGGGCCCCCGCCAGCGCCTGCTGGAA	2010
Isoform a	CCGTGGCTGGTGGGTGGCGGTGGTGGGGCCGGGTGGGCCCCCGCCAGCGCCTGCTGGAA	1908
Isoform b	CCGTGGCTGGTGGGTGGCGGTGGTGGGGCCGGGTGGGCCCCCGCCAGCGCCTGCTGGAA	1908
Isoform c	TGAGAAGCACAGACTCCGCCACGGACTCCTTTTCTCTCCCTCCTCCCGCCCCGCCAGGCC	2047
Isoform d	TGAGAAGCACAGACTCCGCCACGGACTCCTTTTCTCTCCCTCCTCCCGCCCCGCCAGGCC	2070
Isoform a	TGAGAAGCACAGACTCCGCCACGGACTCCTTTTCTCTCCCTCCTCCCGCCCCGCCAGGCC	1968
Isoform b	TGAGAAGCACAGACTCCGCCACGGACTCCTTTTCTCTCCCTCCTCCCGCCCCGCCAGGCC	1968

ANHANG

Isoform c	TGGCGCCCCCGCCCCCTCGCTGGCCATTTGGGGGAGTGAGGGGGCGTGGTTGTTTCT	2107
Isoform d	-----	
Isoform a	TGGCGCCCCCGCCCCCTCGCTGGCCATTTGGGGGAGTGAGGGGGCGTGGTTGTTTCT	2130
Isoform b	TGGCGCCCCCGCCCCCTCGCTGGCCATTTGGGGGAGTGAGGGGGCGTGGTTGTTTCT	2028
Isoform c	TGTGGTTGTGTGTGTTTGTGTTGCGGGTTTAAAAAAGGGAAACTGAGACTGCAGGTGGG	2167
Isoform d	-----	
Isoform a	TGTGGTTGTGTGTGTTTGTGTTGCGGGTTTAAAAAAGGGAAACTGAGACTGCAGGTGGG	2190
Isoform b	TGTGGTTGTGTGTGTTTGTGTTGCGGGTTTAAAAAAGGGAAACTGAGACTGCAGGTGGG	2088
Isoform c	GGAGGTGGTGGGTTTGGGGGATGTCCCTAATCCAGGAGTGCCCCCTCACTTGTCCACC	2227
Isoform d	-----	
Isoform a	GGAGGTGGTGGGTTTGGGGGATGTCCCTAATCCAGGAGTGCCCCCTCACTTGTCCACC	2250
Isoform b	GGAGGTGGTGGGTTTGGGGGATGTCCCTAATCCAGGAGTGCCCCCTCACTTGTCCACC	2148
Isoform c	GAGTCTCCTCTATTGCCTGCCTCTGCTGTGAATTAACCTGTTCTGTGTATTAACCTGGGC	2287
Isoform d	-----	
Isoform a	GAGTCTCCTCTATTGCCTGCCTCTGCTGTGAATTAACCTGTTCTGTGTATTAACCTGGGC	2310
Isoform b	GAGTCTCCTCTATTGCCTGCCTCTGCTGTGAATTAACCTGTTCTGTGTATTAACCTGGGC	2208
Isoform c	CTGACCCCTCTGCCAAAA	2306
Isoform d	-----	
Isoform a	CTGACCCCTCTGCCAAAA	2329
Isoform b	CTGACCCCTCTGCCAAAA	2227

9.2. Vergleich der vier humanen DPF1 Isoformen auf Proteinebene

Blau markiert – 2/3 Domäne

Violett markiert – C2H2 Zinkfinger

Gelb markiert – ersten PHD Finger

Braun markiert – zweiten PHD Finger

Verdickt und unterstrichen wurden Aminosäure markiert, die die Zinkionen koordinieren.

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

Isoform b  MATVIPGPLSLGDFYREAIEHCRSYNARLCAERSLRLPFLDSQTGVAQNNCYIWMEKTH 60
Isoform d  MATVIPGPLSLGDFYREAIEHCRSYNARLCAERSLRLPFLDSQTGVAQNNCYIWMEKTH 60
Isoform c  -----MEKTH 5
Isoform a  MATVIPGPLSLGDFYREAIEHCRSYNARLCAERSLRLPFLDSQTGVAQNNCYIWMEKTH 60
*****

Isoform b  RGPGLAPGQIYTYPARCWRKKRRLNILEDPRLRPCEYKIDCEAPLKKEGGLPEGPVLEAL 120
Isoform d  RGPGLAPGQIYTYPARCWRKKRRLNILEDPRLRPCEYKIDCEAPLKKEGGLPEGPVLEAL 120
Isoform c  RGPGLAPGQIYTYPARCWRKKRRLNILEDPRLRPCEYKIDCEAPLKKEGGLPEGPVLEAL 65
Isoform a  RGPGLAPGQIYTYPARCWRKKRRLNILEDPRLRPCEYKIDCEAPLKKEGGLPEGPVLEAL 120
*****

Isoform b  LCAETGEKKIELKEEETIMDCQKQQLLEFPHDLEVEDEDDIPRRKNRAKGKAYGIGGLR 180
Isoform d  LCAETGEKKIELKEEETIMDCQKQQLLEFPHDLEVEDEDDIPRRKNRAKGKAYGIGGLR 180
Isoform c  LCAETGEKKIELKEEETIMDCQKQQLLEFPHDLEVEDEDDIPRRKNRAKGKAYGIGGLR 125
Isoform a  LCAETGEKKIELKEEETIMDCQKQQLLEFPHDLEVEDEDDIPRRKNRAKGKAYGIGGLR 180
*****

Isoform b  KRQDTASLEDRDKPYVCD----- 198
Isoform d  KRQDTASLEDRDKPYVCDICGKRYKNRPGLSYHYTHHLAEEEGEENAERHALPFHRKNN 240
Isoform c  KRQDTASLEDRDKPYVCDICGKRYKNRPGLSYHYTHHLAEEEGEENAERHALPFHRKNN 185
Isoform a  KRQDTASLEDRDKPYVCDICGKRYKNRPGLSYHYTHHLAEEEGEENAERHALPFHRKNN 240
*****

Isoform b  --KFYKELAWVPEAQRKHTAKKAPDGTVIPNGYCDFCLGGSKKTGCPEDLISCADCGRSG 256
Isoform d  HKQFYKELAWVPEAQRKHTAKKAPDGTVIPNGYCDFCLGGSKKTGCPEDLISCADCGRSG 300
Isoform c  HKQFYKELAWVPEAQRKHTAKKAPDGTVIPNGYCDFCLGGSKKTGCPEDLISCADCGRSG 245
Isoform a  HKQFYKELAWVPEAQRKHTAKKAPDGTVIPNGYCDFCLGGSKKTGCPEDLISCADCGRSG 300
:*****

Isoform b  HPSCLOQFTVNMNTAAVRTYRWQCIIECKSCSLCGTSENDGASWAGLTPQDQLLFCDDCDRGY 316
Isoform d  HPSCLOQFTVNMNTAAVRTYRWQCIIECKSCSLCGTSENDGASWAGLTPQDQLLFCDDCDRGY 360
Isoform c  HPSCLOQFTVNMNTAAVRTYRWQCIIECKSCSLCGTSEND-----DQLLFCDDCDRGY 295
Isoform a  HPSCLOQFTVNMNTAAVRTYRWQCIIECKSCSLCGTSEND-----DQLLFCDDCDRGY 350
*****

Isoform b  HMYCLSPMAEPPEGSWSCHLCLRHLKEKASAYITLT 353
Isoform d  HMYCLSPMAEPPEGSWSCHLCLRHLKEKASAYITLT 397
Isoform c  HMYCLSPMAEPPEGSWSCHLCLRHLKEKASAYITLT 332
Isoform a  HMYCLSPMAEPPEGSWSCHLCLRHLKEKASAYITLT 387
*****

```


DPF3a	TCGCTCCTGTTCGAGGACGCCGAGTGGCCGGGGTTCGCCACAGCAGATAAAAAGGGCAG	1080
DPF3b	ACTCTTCTGCGATGACTGTGACCGAGGCTA---TCACATGTACTGTTTAAATCCCCCGG	1048
	* * * * *	
DPF3a	TTGCTAAACCCACGGAACAGACTCTCTGGGCAATTAGCCATCCCCCTCTGACTTTGGTCA	1140
DPF3b	TGGCTGAGCCCCAGAAGGAA---GCTGG---AGCTGCCACTTATGCTGGGAACTGCTCA	1102
	* * * * *	
DPF3a	TTGTGCTGGTTCGATATATATATTTTTTTAATGAAAGGCAACTTAGATTTCCCTCTAT	1200
DPF3b	AAGAGAAAGCCTCAGCCTTTGGCTGCCAGGCC TAGG -----	1138
	* * * * *	
DPF3a	CCTTGCTTTTTTCCCTTCACCTCCCACGTGTCCTCCATCCCTCCCCCACCCCTCTGT	1260
DPF3b	-----	
DPF3a	TTTGGGTATGTACAACAGAAGCACAACACTACTGAAACAAAACAAAACAGCAGAATGAGCG	1320
DPF3b	-----	
DPF3a	TTCTCCGAGAGATGGCATCGTGATGCGCTATTTATTTCCATAGAAATAGGAAGTTAGA	1380
DPF3b	-----	
DPF3a	CGGATTGTCTCTTTTCTGAGGGGAGGGGTCTTTTGGACAGGAGCAGAGTTGATGTCCTC	1440
DPF3b	-----	
DPF3a	AATTTTCATATTTATTGGCAAAGGAAGAGAAGAGGAACTTGGGTTGGAAACAAAGAAC	1500
DPF3b	-----	
DPF3a	CAATAACATTA AAAACATTATTATTTATATATTCTAGCTGTATTAGAATCAGACTTTTTT	1560
DPF3b	-----	
DPF3a	TGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAGGGAAATCAAAGAAATCGAAGCAATATCCTGT	1620
DPF3b	-----	
DPF3a	TTAGAGGCAAGCCGCCGGTGGGAGAAATTCCTCAATGGGAGACGGTTGCACTTTCTGT	1680
DPF3b	-----	
DPF3a	GCCCCACGGAGTTTGTGGCTCCCCGCGGACAGCCCTCCCTCATTTCTCTCCCTGACCTT	1740
DPF3b	-----	
DPF3a	TCCATCTTCTCTCTGCTTGCAGAAAATGTCAGTAGTTCCAGAGAAGTCGGGGTGCCTA	1800
DPF3b	-----	
DPF3a	TGCCTGGCCTCCCTCCACACCTGGGCCCTGACCAGCCGCTCCTGGGCTCCTCCTCCTCC	1860
DPF3b	-----	
DPF3a	GTCAGTAGAGCTGCTGTTTTGTTATTGCTGGTTTTTCTCACTTTCTCTGGCAAAGAA	1920
DPF3b	-----	
DPF3a	CGACTTCCAAATGCAGGGATGGAATATAAGCAGAACGTATGGGCTCAGCAGTACTCCA	1980
DPF3b	-----	
DPF3a	CCACCCGAGGCCGAGCCGCTGCTTCTGGAAGATAGAAGGAGACATCATCGTGTGTTCC	2040
DPF3b	-----	
DPF3a	CTCCCCTTGCCCCGTTAAGAAACGTATCAATACCCATTGGATGATCAAGGCTACCGTAT	2100
DPF3b	-----	
DPF3a	TTCTTCTATTTTTTTTTATAGTGCTGCCAGGCACTTTGTTTTATGTTTCCAATAGCAC	2160
DPF3b	-----	
DPF3a	TTCTGAAATAAACCAAAGCAACACTGCTCAAGGCCCTGGGGCGATGGAGAAGGCCACC	2220
DPF3b	-----	
DPF3a	CACCTCACTGACAGTCCCAAGAATGACCGGCTGCGAGGTCCTAGTCAAAGTCAACATTA	2280
DPF3b	-----	
DPF3a	TGACCTGGGACTCCAGCATCCTTCAAGCAAGCCATTTCCGAAGAAGGTGAAAAGAAGCC	2340
DPF3b	-----	

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Diese Arbeit hat keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Berlin, den

Michalina Mańkowska