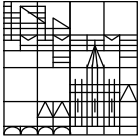


Hong-gang Hu



UNIVERSITÄT KONSTANZ
FACHBEREICH BIOLOGIE

**Das Protein DEK im Chromatin
menschlicher Zellen**

Berichte aus der Biologie

Hong-gang Hu

**Das Protein DEK im Chromatin
menschlicher Zellen**

Shaker Verlag
Aachen 2008

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Konstanz, Univ., Diss., 2005

Copyright Shaker Verlag 2008

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-7209-8

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2001 bis Dezember 2004 am Lehrstuhl für molekulare Genetik der Universität Konstanz angefertigt.

Neben dem selbstverständlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Knippers für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, möchte ich ihm besonders für die direkte Betreuung meiner Arbeit nach dem Wechsel von Dr. Claudia Gruss zu ALTANA Pharma, seine Diskussionsbereitschaft, seine stete Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Ermutigung und Unterstützung auch außerhalb des Labors, danken.

Ein ganz großes Dank geht an meine ehemalige Betreuerin Dr. Claudia Gruss für die ständige Unterstützung meiner Arbeit und ihre Diskussionsbereitschaft.

Dr. Harald Illges danke ich für die Bereitstellung der Lymphozyten, seine guten Vorschläge und Diskussionen während meiner Arbeit mit den B-Zellen und auch für seine Bereitschaft als Gutachter diese Dissertation zu beurteilen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den (ehemaligen) Mitgliedern des DEK-Labors, Ferdinand Kappes, Ingo Scholten, Tanja Waldmann, Nicole Richter und Friederike Knoche, für die angenehme Atmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft.

Dr. Daniel Schaarschmidt, Dr. Christian Keller und Dr. Eva-Maria Ladenburger möchte ich für die Einführung in die Methode des ChIP-Assays danken.

Gedankt sei darüber hinaus allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Ullrich für die Benutzung des Light-Cyclers bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an Dr. Ferdinand Kappes und Dr. Daniel Schaarschmidt für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und ihre angebrachten Korrekturen.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium in Deutschland überhaupt ermöglicht haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Ping und meiner Tochter Qiuyue für ihre Liebe und Unterstützung bedanken.

Abkürzung

A	Ampere
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	zirka
Ci	Curie
cpm	counts per minute
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
l	Liter
LB	Luria Broth Bakterienmedium
LMW	Low Molecular Weight
M	Molar
min	Minute(n)
NP-40	Nonidetphenylpolyethylglycol
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
Für Maßeinheiten werden als Kurzvorzeichen verwendet:	
m	milli (10 ⁻³)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
n	nano (10 ⁻⁹)
p	pico (10 ⁻¹²)

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Chromatin	1
1.1.1	Histone	1
1.1.2	Nukleosomen.....	3
1.1.3	Organisation von Chromatin.....	4
1.2	Modifikation der Chromatinstruktur	6
1.2.1	Modifikation der Histone.....	7
1.2.1.1	Die N-terminalen Domänen von Kern-Histone	7
1.2.1.2	Histon-Acetylierung	8
1.2.2	Nicht-Histon-Proteine: HMG-Proteine.....	9
1.2.2.1	HMGB-Proteine	10
1.2.2.2	HMGA-Proteine	10
1.2.2.3	HMGN-Proteine	11
1.2.3	Chromatin-Remodeling-Komplexe.....	12
1.2.4	Chromatin-Silencer-Proteine.....	12
1.3	Das DEK-Protein	13
1.3.1	Allgemein.....	13
1.3.2	Lokalisation und DNA-Bindung.....	14
1.3.3	Interaktionspartner von DEK.....	16
1.3.3.1	DEK im RNA-Metabolismus	16
1.3.3.2	DEK bei der Transkription	17
1.3.3.3	Interaktion mit LANA	18
2	ZIELSETZUNG	20
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	Allgemeine Lösungen	21
3.2	Allgemeine Methoden	23
3.2.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	23
3.2.2	Phenol-Extraktion und Ethanol-Fällung von DNA.....	23
3.2.3	Denaturierende Proteinfällung (Wessel and Flugge, 1984).....	24
3.2.4	SDS-Gelelektrophorese.....	24
3.2.5	Färbung von Protein-Gelen.....	24
3.2.5.1	Silberfärbung (Wray et al., 1981)	24
3.2.5.2	Coomassie-Färbung (Sambrook, 1989)	25
3.2.6	Western-Blot und Immunfärbung.....	26
3.2.6.1	Verwendete Antikörper und ihre Verdünnung	26
3.3	Zellen und Zellkultur	27
3.3.1	HeLa-Mel-Zellen.....	27
3.3.2	Prä- und reife B-Zellen.....	27
3.3.3	Hi5-Zellen.....	27
3.4	Expression und Reinigung von His-DEK	28
3.4.1	Expression von His-DEK im Baculovirus-Expressionssystem.....	28
3.4.2	Reinigung von His-DEK.....	28
3.4.2.1	Reinigung unter denaturierenden Bedingungen	28
3.4.2.2	Reinigung unter nativen Bedingungen	29
3.5	Herstellung vom monospezifischen DEK Antikörpern	30

3.6 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP-Assay)	31
3.6.1 <i>In vivo</i> Crosslinking mit Formaldehyd und Vorbereitung der Nukleoproteinkomplexe (Gohring and Fackelmayer, 1997)	31
3.6.2 Chromatin-Immunpräzipitation	33
3.6.3 Proteinextraktion aus den Immunpräzipitaten.....	34
3.6.4 DNA-Extraktion aus den Immunpräzipitaten	34
3.7 Quantitative Real-time PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	34
3.8 Analyse der DEK-assoziierten DNA-Fragmente	37
3.8.1 Klonierung	37
3.8.2 Transformation	38
3.8.3 Sequenzierung	38
3.9 RT-PCR	38
3.10 Radioaktive Markierung von DNA	39
3.11 Bandshiftassay	39
4 ERGEBNISSE	40
4.1 Expression und Reinigung von rekombinantem His-DEK	40
4.1.1 Denaturiert gereinigtes His-DEK	40
4.1.2 Reinigung von nativem His-DEK	41
4.2 Herstellung von monospezifischen DEK-Antikörpern	42
4.3 DEK-Lokalisation auf menschlichen Genen in HeLa-Zellen	43
4.3.1 Chromatin-Immunpräzipitation	43
4.3.2 Optimierung der ChIP-Bedingungen	45
4.3.3 DEK ist auf aktiven und inaktiven Gen-Bereichen lokalisiert	46
4.3.3.1 DEK und MCM4 als aktive Gene	47
4.3.3.2 HBB als Beispiel für ein inaktives Gen	49
4.3.4 DEK-Lokalisation im <i>TOP1</i> -Gen-Bereich	51
4.3.4.1 Die DEK-Anreicherung im Bereich der C4-Region ist verbunden mit der TOP1-Gen-Aktivierung	53
4.3.4.2 <i>In vitro</i> findet keine bevorzugte Bindung von DEK an das C4-Element des TOP1-Gens statt 57	
4.4 DEK-Lokalisation im Bereich des CD21-Gens in B-Zellen	62
4.4.1 CD21	62
4.4.2 DEK ist angereichert im Promotor-Bereich des aktiven <i>CD21</i> -Gens	64
4.4.3 In Nalm-6 kann die CD21-Expression mit Aza-Deoxycytidine induziert werden	67
4.4.4 DEK ist leicht angereichert im Bereich der Promotor-Region des <i>CD21</i> -Gens in Nalm-6-Zellen nach Induktion der <i>CD21</i> -Expression	71
4.5 DEK-Lokalisation am Chromatin	73
4.5.1 DEK kolokalisiert mehr mit acetyliertem Histon H4 als mit HP1 α	73
4.5.2 DEK-Klone	75
5 DISKUSSION	77
5.1 Die Methode der Wahl: der ChIP-Assay	77
5.2 DEK im Chromatin	79
5.2.1 DEK ist in aktiven und inaktiven Gen-Bereichen lokalisiert	80
5.2.2 DEK-Verteilung im Bereich des <i>TOP1</i> -Gens	81
5.2.3 DEK mit <i>CD21</i> -Gen	83

5.2.4	DEK-Lokalisation im Genom	84
5.3	DEK - ein neues Architektur-Protein?	86
6	ZUSAMMENFASSUNG	89
7	LITERATUR	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Struktur der Histone.....	3
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung des Nukleosoms.....	4
Abbildung 1.3	DNA-Verpackung und Organisationsstufen des Chromatins.....	6
Abbildung 1.4	Modifikationsstellen auf die Histone.....	7
Abbildung 1.5	Schematische Darstellung des DEK-Proteins mit seinen bisher bekannten funktionellen Bereichen.....	14
Abbildung 4.1	Reinigung von His-DEK unter denaturierenden Bedingungen.....	41
Abbildung 4.2	Reinigung von His-DEK unter nativen Bedingungen.....	42
Abbildung 4.3	Gereinigte monospezifische DEK-Antikörper.....	43
Abbildung 4.4	Chromatin-Immunpräzipitation.....	44
Abbildung 4.5	Optimierung der CHIP-Bedingungen.....	46
Abbildung 4.6	DEK-Lokalisation im Bereich des <i>DEK</i> - und <i>MCM4</i> -Gens.....	49
Abbildung 4.7	DEK-Lokalisation im <i>HBB</i> -Gen-Bereich.....	50
Abbildung 4.8	DEK-Lokalisation im Bereich des <i>TOP1</i> -Gens.....	52
Abbildung 4.9	Behandlung der HeLa-Zellen mit 100 µg/ml α -Amanitin.....	55
Abbildung 4.10	Inhibition der Transkription des <i>c-Myc</i> -Gens durch α -Amanitin.....	56
Abbildung 4.11	DEK-Anreicherung auf dem aktiven und inaktiven <i>TOP1</i> -Gen.....	57
Abbildung 4.12	Analyse der PCR-Produkte für den Bandshift-Assay.....	58
Abbildung 4.13	Bandshift-Assay mit den DNA-Fragmenten C2, P, C4, In2 und M1 im Bereich des <i>TOP1</i> -Gens.....	59
Abbildung 4.14	Kompetitionsanalyse mit dem C4-Fragment.....	60
Abbildung 4.15	Eine mögliche kruziforme Struktur innerhalb des C4-Fragmentes.....	61
Abbildung 4.16	Schematische Darstellung des <i>CD21</i> -Gens.....	63
Abbildung 4.17	DEK in B-Lymphozyten.....	65
Abbildung 4.18	DEK-Bindung im Bereich des <i>CD21</i> -Gens in B-Zellen.....	66
Abbildung 4.19	Behandlung von Nalm-6-Zellen mit TSA.....	69
Abbildung 4.20	Behandlung der Nalm-6-Zellen mit 4 µM Aza-dc.....	71
Abbildung 4.21	DEK-Bindung im Bereich des <i>CD21</i> -Gens in unbehandelten und Aza-dc behandelten Nalm-6-Zellen.....	72
Abbildung 4.22	DEK-Kokalisation mit Ach4 und HP1 α	74