

**Einfluss von HMGA1-Proteinen  
auf die Myogenese und Heterochromatinorganisation  
während der Differenzierung**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Jan Brocher**

aus

**Bad Mergentheim**

Würzburg 2007

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: PD Dr. Robert Hock

Gutachter: Prof. Dr. Helga Stopper

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

gewidmet:

Meinen Eltern

und

Tzutzuy

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Chromatin .....	1
1.1.1	Chromatinorganisation .....	2
1.1.1.1	Euchromatin .....	2
1.1.1.2	Heterochromatin .....	3
1.2	Chromatin und Epigenese .....	4
1.2.1	DNA-Methylierung und Methyl-DNA-bindende Proteine .....	4
1.2.1.1	DNA-Methylierung .....	4
1.2.1.2	Methyl-CpG-bindendes Protein (MeCP2) .....	5
1.2.1.3	Imprinting .....	5
1.2.2	Histone .....	6
1.2.2.1	Kernhistone und Kernhistonvarianten .....	6
1.2.2.2	Das Linker-Histon H1 .....	7
1.2.3	Der Histon-Code .....	7
1.2.4	Der Polycomb-Komplex – Zusammenspiel von DNA- und Histonmethylierung .....	10
1.2.5	Heterochromatin-Protein 1 (HP1) .....	10
1.2.6	Einfluss von RNAi auf den Chromatinzustand .....	12
1.3	High-mobility-group (HMG)-Proteine .....	13
1.3.1	Die HMGB-Proteine .....	14
1.3.2	Die HMGN-Proteine .....	14
1.3.3	Die HMGA-Proteine .....	15
1.3.3.1	Biologische Funktion von HMGA-Proteinen .....	16
1.3.3.2	Interaktionspartner von HMGA-Proteinen .....	19
1.3.4	Die Dynamik des Chromatins .....	20
1.4	Aufgabenstellung .....	21
<b>2</b>	<b>Material .....</b>	<b>22</b>
2.1	Enzyme .....	22
2.2	Oligonukleotide .....	22
2.3	Größenstandards .....	22
2.3.1	DNA .....	22
2.3.2	Protein .....	22
2.4	Kits .....	23
2.5	Chemikalien .....	23
2.6	Geräte .....	23

---

<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1	Mikrobiologische Methoden.....	25
3.1.1	Flüssigkultur von Bakterien.....	25
3.1.2	Fotometrische Bestimmung der Bakteriendicht einer Flüssigkultur.....	25
3.1.3	Glycerinkulturen.....	26
3.1.4	Bakterienkultur auf LB-Agarplatten.....	26
3.1.5	Herstellung kompetenter Bakterien.....	26
3.1.6	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien.....	27
3.2	Zellkultur.....	28
3.2.1	Auftauen von Zellen.....	28
3.2.2	Kultivieren und Passagieren von Zellen.....	28
3.2.3	Differenzierung von C2C12-Zellen.....	29
3.2.4	Kryokonservierung von Zellen.....	30
3.2.5	Transiente Transfektion von Kulturzellen.....	30
3.2.5.1	Transfektion mit Effectene™.....	31
3.2.5.2	FuGene® HD (Roche).....	31
3.2.5.3	TransFectin (BioRad).....	32
3.2.5.4	MaTRA (IBA).....	32
3.2.6	Transfektion von siRNA in C2C12-Zellen.....	33
3.2.7	Herstellung stabil transfizierter Zelllinien.....	34
3.2.7.1	Retrovirale Transduktion von C2C12-Zellen.....	34
3.2.7.2	Selektion stabiler C2C12-Klone.....	35
3.2.8	Glucosemessung in Zellkulturüberständen.....	35
3.2.9	Bestimmen der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer.....	36
3.2.10	Fluorescence activated cell sorting (FACS).....	36
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.3.1	Isolierung von RNA aus C2C12-Zellen.....	37
3.3.2	Isolierung von Zellkernen aus Kulturzellen.....	38
3.3.3	Isolierung genomische DNA aus Kulturzellen.....	38
3.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	39
3.3.4.1	GTE-System.....	39
3.3.4.2	Peqlab Plasmid Minipräp Kit I.....	40
3.3.5	Fotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	40
3.3.6	RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction).....	40
3.3.7	PCR (polymerase chain reaction).....	41
3.3.7.1	Primerdesign.....	41
3.3.7.2	Kolonie-PCR.....	41

3.3.7.3	Expressions-Test-PCR.....	42
3.3.7.4	Phusion-PCR.....	43
3.3.8	Herstellung methylierter DNA mittels PCR.....	44
3.3.9	Gel-mobility-shift-assay (GMSA).....	45
3.3.9.1	Vorbereitung der Proben.....	45
3.3.9.2	Acrylamid-DNA-Gelelektrophorese für GMSA.....	46
3.3.10	Micrococcus-Nuklease-Verdau von Chromatin.....	46
3.3.10.1	Micrococcus-Nuklease-Verdau.....	47
3.3.10.2	Phenol-Chloroform-Extraktion des MNase-Verdaus.....	47
3.3.10.3	Fällung des MNase-Verdaus.....	48
3.3.10.4	Gelelektrophorese des MNase-Verdaus.....	48
3.3.11	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	48
3.3.12	Auffüllen von Restriktionsschnittstellen mit 5'-Überhängen und Entfernen von 3'-Überhängen.....	49
3.3.13	Herstellung des DNA-Größenstandards MyoBP.....	49
3.3.14	Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel.....	50
3.3.15	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	51
3.3.16	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren.....	52
3.3.16.1	pCR2.1 <sup>®</sup> -TOPO <sup>®</sup> und pDrive.....	52
3.3.16.2	Klonierung in Expressionsvektoren.....	52
3.3.17	Präzipitation von DNA.....	54
3.3.18	DNA-Sequenzierung.....	54
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	56
3.4.1	Probenherstellung von Gesamtzellen für eine SDS-Gelelektrophorese.....	56
3.4.2	Probenherstellung aus isolierten Zellkernen für eine SDS-Gelelektrophorese.....	56
3.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli.....	57
3.4.4	Färbung von SDS-Gelen.....	58
3.4.5	Westernblot und enhanced chemiluminescence (ECL).....	58
3.4.6	Strippen eines Westernblots.....	60
3.5	Mikroskopie.....	60
3.5.1	Herstellung von Lebend-Beobachtungskammern.....	60
3.5.2	Detektion von alkalischer Phosphatase in Kulturzellen.....	61
3.5.3	Immunlokalisation an Kulturzellen.....	62
3.5.3.1	Fixierung, Permeabilisierung und Absättigung.....	62
3.5.3.2	Antikörperinkubation.....	62
3.5.4	Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC).....	63
3.5.5	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	64

---

3.5.6	Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP).....	65
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>68</b>
4.1	Einfluss von HMGA1 auf die Differenzierung von C2C12-Zellen .....	68
4.1.1	Abnahme der HMGA1a Expression während der Myogenese und der Osteogenese .	68
4.1.2	Charakterisierung einer HMGA1a-EGFP exprimierenden C2C12-Zelllinie .....	70
4.1.2.1	Herstellung stabil transfizierter C2C12-Zelllinien.....	70
4.1.2.2	Stabile HMGA1a-EGFP-Expression in C2C12-Zellen .....	71
4.1.2.3	Lokalisation der HMGA1a-Fusionsprotein in C2C12-Zellen.....	71
4.1.2.4	HMGA1a-Expression hat keinen Einfluss auf die Nukleosomenabstände .....	73
4.1.3	Einfluss konstitutiver HMGA1a-Expression auf die Differenzierung .....	75
4.1.3.1	HMGA1-Expression in C2C12- und C2A1a-Zellen während der Differenzierung	75
4.1.3.2	HMGA1a zeigt keinen offensichtlichen Einfluss auf den Beginn der Osteogenese	78
4.1.3.3	Konstitutive HMGA1a-Expression verhindert die Expression Myogenese- spezifischer Proteine .....	79
4.1.3.4	Hemmung der Myogenese durch HMGA1a ist unabhängig von dessen Verweildauer am Chromatin.....	82
4.1.3.5	C2H3-Zellen differenzieren zu Myotuben.....	82
4.1.3.6	Einfluss von HMGA1a die Proliferation während der Differenzierung .....	83
4.1.3.7	Die Glucoseaufnahme in C2C12- und C2A1a-Zellen korreliert mit Zellzahl .....	85
4.1.3.8	Einfluss anhaltender HMGA1a-Expression auf spezifische Genexpression .....	86
4.1.3.9	Knock-down von HMGA1 ermöglicht den Wiedereintritt in die Myogenese.....	89
4.1.4	HMGA1a beeinflusst die Heterochromatinplastizität in C2C12-Zellen .....	92
4.1.5	Veränderte Dynamik von HMGA1a während der Differenzierung .....	94
4.1.6	Modulation des Heterochromatins durch HMGA1a .....	95
4.1.6.1	Einfluss von HMGA1a auf HP1 $\alpha$ .....	96
4.1.6.2	Nachweis der Kooperation von HMGA1a und HP1 über Bimolekular Fluorescence Complementation (BiFC).....	98
4.1.6.3	Anhaltende HMGA1a-Expression führt zur Verringerung der Histon H1- Proteinmenge .....	118
4.1.6.4	Dynamische Konkurrenz von HMGA1a und MeCP2 .....	119
4.1.6.5	Fazit zum Einfluss von HMGA1-Proteinen auf die Heterochromatinplastizität ..	126
4.1.7	Einfluss von HMGA1a auf Histonmodifikationen.....	126
4.1.7.1	Charakteristische Modifikationen für aktives und inaktives Chromatin.....	126
4.2	Histon H3 in C2C12-Myoblasten und während der Myogenese .....	128
4.2.1	C2H3-EGFP-Zellen wachsen in Zellverbänden.....	128
4.2.2	H3 im Heterochromatin.....	129
4.2.2.1	Heterochromatineinbau und Modifikation von H3-EGFP in C2H3 möglich .....	129

4.2.2.2	Zeitlich regulierter Einbau von H3-EGFP in perizentrisches Heterochromatin ...	131
4.2.2.3	Replikations-unabhängiger Einbau von Histon H3 in das Heterochromatin .....	132
4.2.3	Unterschiedliche H3-Mobilität in Heterochromatin und Euchromatin .....	133
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>135</b>
5.1	HMGA-Proteine und Proliferation.....	135
5.2	Regulierte HMGA1a-Expression während der Differenzierung.....	137
5.3	Anhaltende HMGA-Expression während der Myogenese beeinflusst die Expression spezifischer Gene .....	138
5.4	Die Herunterregulierung von HMGA1-Proteinen ist notwendig für die Aktivierung des Myogeneseprogrammes .....	139
5.5	Modulation des Chromatins durch HMGA-Proteine .....	140
5.5.1	HMGA-Proteine verändern die Zusammensetzung des Chromatins .....	140
5.5.2	HMGA-Proteine und MecP2 konkurrieren um DNA-Bindungsstellen .....	140
5.5.3	HMGA-Proteine interagieren mit HP1-Proteinen .....	141
5.6	HMGA-Proteine beeinflussen die differenzierungsabhängige Organisation des Chromatins.....	145
5.7	Fazit .....	146
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>149</b>
6.1	Zusammenfassung.....	149
6.2	Summary .....	151
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>159</b>
8.1	Zellkultur.....	159
8.1.1	Zellkulturmedien .....	159
8.2	Antikörper .....	160
8.3	Oligonukleotide.....	161
8.4	Abkürzungen.....	166
8.5	Lebenslauf und integrierte Publikationsliste .....	168
8.6	Ehrenwörtliche Erklärung .....	171
8.7	Danksagung.....	172
<b>9</b>	<b>Supplement-CD</b>	
9.1	Vektordatenblätter	

# 1 Einleitung

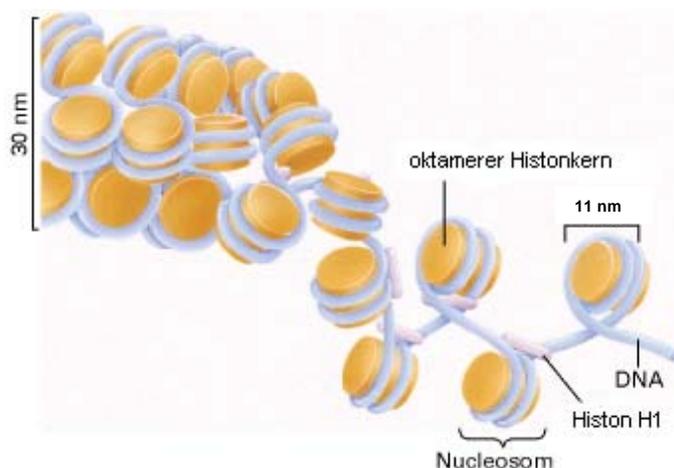
## 1.1 Chromatin

Im menschlichen Zellkern mit einem durchschnittlichen Volumen von  $\sim 1000 \mu\text{m}^3$  müssen in etwa zwei Meter diploide DNA verpackt werden. Diese Komprimierung und Organisation wird durch proteinvermittelte Faltung der DNA erreicht. An die so verpackte DNA binden eine Vielzahl von Proteinen, woraus ein Nukleoproteinkomplex resultiert, der als Chromatin bezeichnet wird (Kamakaka et al. 2005)

Der Begriff Chromatin wurde erstmals 1879 von Walter Flemming verwendet, der damit die färbaren Bestandteile des Zellkerns bezeichnete (vom griechischen *khroma* = gefärbt) (Geschichte der Biologie, Nikols-Verlag, 2004; Maison et al. 2004). Über 100 Jahre später zeichnet sich ein weitaus komplexeres, wenn auch längst noch nicht vollständiges Bild des Chromatins ab.

Die Grundeinheit des Chromatins bildet das Nucleosom. Dieses besteht aus  $\sim 146$  bp DNA, welche in 1,65-1,75 Windungen um den Nucleosomenkern gewunden sind (Luger 2006; Th'ng et al. 2005). Dieser wird durch ein Histon-Oktamer der Nucleosomenkernhistone gebildet (Wang et al. 1997). Die alternierende Anordnung aus Nucleosomen und der dazwischen liegenden Linker-DNA führt zu einer Struktur mit 11 nm im Durchmesser und wird aufgrund ihres Erscheinungsbildes als „Perlschnur“ bezeichnet.

Ein höherer Verpackungsgrad resultiert in der 30-nm-Fibrille (Abb. 1-1), mit lediglich 1/40 des Ausgangsvolumens. Weitere Komprimierungen führen bis zu einer 1000-fachen Kondensation des Interphase-Chromatins und zu einer 10000-fachen Kondensation in mitotischen Chromosomen (Wang et al. 1997). Diese höher geordneten Organisationsstrukturen, haben entscheidenden Einfluss auf zelluläre Prozesse, wie zum Beispiel Transkription, Replikation, DNA-Reparatur und Rekombination (Luger 2006).

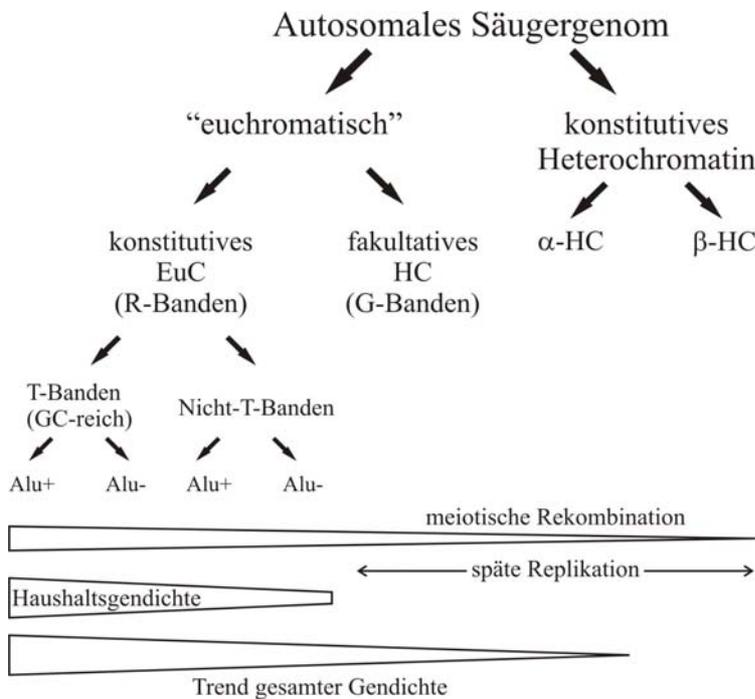


**Abb. 1-1: Verpackung des Chromatins in die 30 nm Fibrille**

Die DNA windet sich um den Nucleosomenkern (dunkle Zylinder) und bildet die 11 nm „Perlschnur“-Struktur. Eine stärkere Komprimierung resultiert in der 30 nm Fibrille. Abbildung verändert nach Grunstein 1992

### 1.1.1 Chromatinorganisation

DNA-abhängige Prozesse in Eukaryoten, wie Replikation, Transkription oder DNA-Reparatur in somatischen Zellen oder Synapsis und Rekombination während der Meiose, hängen vom Komprimierungsgrad der DNA ab. Gene die beispielsweise für die Basisaktivitäten der Zelle (Haushaltsgene), wie Replikation, Transkription und Zellzykluskontrolle benötigt werden, bedürfen einer ubiquitären Expression, während andere Gene gewebsspezifisch exprimiert werden müssen. Aktive Gene befinden sich grundsätzlich im Euchromatin, während beispielsweise konstitutives Heterochromatin im gesamten Zellzyklus in einem inaktiven, kompakten Zustand vorliegt. Der unterschiedliche Verpackungsgrad führt zu einer Kompartimentierung des Genoms, die in Abb. 1-2 zusammengefasst ist.



**Abb. 1-2: Kompartimentierung des Chromatins**

Ubiquitär exprimierte Gene verweilen in sogenannten R-Banden, während viele gewebsspezifischen Gene in G-Banden lokalisiert sind. Bei R-Banden handelt es sich um konstitutives Euchromatin, bei G-Banden um fakultatives Heterochromatin. Daneben existiert eine weitere Chromatinklasse, das konstitutive Heterochromatin. Im unteren Drittel sind zelluläre Prozesse und deren räumliche Verteilung im Chromatin dargestellt.

Verändert nach Holmquist et al. 2006.

#### 1.1.1.1 Euchromatin

Ganz allgemein definiert sich Euchromatin als Form des Chromatins, welche in der Interphase in einem dekondensierten Zustand vorliegt. Eine Form ist das konstitutive Euchromatin (R-Banden), welches stets einen geringeren Kondensationsgrad aufweist und eine höhere transkriptionelle Aktivität besitzt. Beim Menschen kann man die R-Banden aufgrund ihres GC-Reichtums und dem Auftreten von Alu-Sequenzen (10-300 bp lange, repetitive DNA Elemente) unterteilen. Dabei werden die GC-reichen Bereiche als T-Banden bezeichnet.

### 1.1.1.2 Heterochromatin

Heterochromatin wurde erstmals durch Emil Heitz (1929) als eine Form des Chromatins beschrieben, die im Gegensatz zum Euchromatin, während des gesamten Zellzyklus kondensiert vorliegt. Heute unterscheidet man fakultatives und konstitutives Heterochromatin.

Fakultatives Heterochromatin nimmt eine Stellung zwischen Euchromatin und Heterochromatin ein. Die wenigen darin enthaltenen Gene benötigen den Heterochromatinstatus für eine funktionierende Expression. Das prominenteste Beispiel dafür ist das inaktivierte weibliche X-Chromosom. Das *Xist*-Gen beim Menschen ist aktiv während der späten Replikation im inaktiven X-Chromosom und inaktiv im früh replizierenden, aktiven X-Chromosom (Holmquist et al. 2006). Ein weiteres Beispiel stellen die G-Banden in Säugerchromosomen dar. In menschlichem Gewebe enthalten die G-Banden circa die Hälfte der DNA, die sich nicht in Satellitenregionen befinden, aber lediglich 19% der gesamten Gene. G-Banden sind nur bedingt heterochromatisch und darin enthaltene, individuelle Replikons sind darauf programmiert, entwicklungsabhängig in einen euchromatischen und somit transkriptionell aktiveren Zustand überzugehen (Holmquist et al. 2006). Fakultatives Heterochromatin korreliert mit Genrepression und tritt besonders häufig in den Kernen terminal differenzierter Zellen auf.

Konstitutives Heterochromatin umgibt in großen Blöcken hauptsächlich funktionelle Chromosomenstrukturen, wie beispielsweise Centromere und Telomere, während kleinere Heterochromatinabschnitte das gesamte Chromosom durchsetzen. Um die Centromere herum werden diese Bereiche als perizentrisches Heterochromatin bezeichnet (Grewal et al. 2003). Dieses besteht hauptsächlich aus AT-reichen DNA-Sequenzen, Satelliten-DNA (Tandem-Sequenzwiederholungen) und einer Anreicherung von spezifischen Heterochromatinproteinen wie Heterochromatinprotein 1 (HP1) (James et al. 1989). Weitere Merkmale epigenetischer Natur sind methylierte CpG-Dinukleotide, meist hypoacetylierte Histone und ein an Lysin 9 methyliertes Histon H3 (H3K9) (Maison et al. 2004) (siehe 1.2).

In Mauszellen lassen sich solche Bereiche leicht durch die intensive Färbung der DNA mittels Hoechst 33258 oder DAPI erkennen. Sie sind während des gesamten Zellzyklus zu beobachten, aber am besten treten sie während der Interphase hervor, in welcher sich diese Regionen verschiedener Chromosomen zusammenlagern und so genannte Chromozentren bilden (Maison et al. 2004). Konstitutives Heterochromatin lässt sich weiter in Gen-armes  $\alpha$ -Heterochromatin und  $\beta$ -Heterochromatin untergliedern. Letzteres dient dem Genom als Schutz vor Retrotransposons. Des Weiteren erfüllt es weitreichende Funktionen im eukaryotischen Zellkern. Zum Beispiel trägt es zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität bei und ist an der Inaktivierung entwicklungsrelevanter Regulatoren, wie zum Beispiel homöotischer Gencluster in *Drosophila* und in Säugern beteiligt. Darüber hinaus spielt die Stabilität und Dynamik des Heterochromatins eine zentrale Rolle in der Regulation der Genexpression während der zellulären Differenzierung (Grewal et al. 2003).

## 1.2 Chromatin und Epigenese

Unter dem Begriff Epigenese versteht man wechselnde phänotypische Zustände, welche nicht auf einem veränderten Genotypus basieren, potentiell reversibel sind und innerhalb eines Zellzyklus stabil erhalten bleiben (Laird 2005). Meist werden erbliche Modifikationen des Chromatins mit Epigenese in Verbindung gebracht. Daher ist die epigenetische Regulation der Genexpression ein wichtiges Element, um Veränderungen während Entwicklungsprozessen zu steuern.

### 1.2.1 DNA-Methylierung und Methyl-DNA-bindende Proteine

#### 1.2.1.1 DNA-Methylierung

Im Säuger genom sind etwa 70% der CpG-Dinukleotide an Position fünf des Cytosinrings methyliert (Klose et al. 2005; Wade 2001). Die DNA-Methylierung verändert sich während zellulärer Entwicklungsprozesse, greift in die entwicklungsabhängige Expression von Genen ein und ist bei der Stilllegung ganzer Genomabschnitte, wie der Inaktivierung des X-Chromosoms bei Säugern beteiligt. In Tumoren führen veränderte DNA-Methylierungsmuster zu genomischer Instabilität (Esteller 2007). Die Entscheidung über die Transkription vom maternalen oder paternalen Allel wird bei einigen Genen über eine unterschiedliche DNA-Methylierung geprägt. Dabei spricht man von Imprinting (siehe 1.2.1.3). Für die DNA-Methylierung werden S-Adenosyl-Methionin als Methylgruppendonor und die Aktivität verschiedener DNA-Methyltransferasen (Dnmts) benötigt. Dnmt1 kopiert das DNA-Methylierungsmuster während der Replikation und ist für seine Aufrechterhaltung in den Tochterzellen wichtig. Dnmt3a und Dnmt3b sind beide für *de novo* Methylierung der DNA verantwortlich und Dnmt3b zusätzlich für ihre Aufrechterhaltung (Robertson 2005).

Alle diese drei DNA-Methyltransferasen sind essentiell für die Embryonalentwicklung in Mäusen und Dnmt-defiziente Mausstammzellen sterben sobald die Differenzierung induziert wird. In somatischen Zellen führt der Verlust eines normalen DNA-Methylierungsmusters zum Verlust der Wachstumskontrolle (Robertson 2005). Während der Entwicklung kommt es vermutlich aber auch durch eine aktive Demethylierung der DNA zu Veränderungen in diesem Muster, wobei der Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist (Paroush et al. 1990; Weiss et al. 1997). Die DNA-Methylierung hängt mit Histonmodifikationen und dem Vorhandensein akzessorischer Proteine zusammen. Darunter befinden sich DNA-Methylbindende Proteine wie zum Beispiel das Methyl-CpG-bindende Protein MeCP2 (Nan et al. 1993).

### **1.2.1.2 Methyl-CpG-bindendes Protein (MeCP2)**

MeCP2 ist ein hoch konserviertes Protein dessen Bindung bereits an einem einzelnen, symmetrisch methylierten CpG-Dinukleotid erfolgt und durch seine methyl-CpG-bindende Domäne (MBD) vermittelt wird (Wade 2001). Es wurden verschiedene Interaktionen von MeCP2 mit Chromatinproteinen nachgewiesen. Darunter fallen Komponenten des SWI/SNF-Chromatinremodelling Komplexes (Brahma), Histondeacetylasen (HDACs), der Transkriptionsfaktor TFIIB, DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt1) und die Histon-Methyltransferase Suv39H1. All diese Interaktionen stellen ein Zusammenspiel in der Stilllegung von Genen dar. Beispielsweise führt die Rekrutierung von HDACs zu einer Deacetylierung von H3K9, was wiederum notwendig für eine Methylierung der gleichen Aminosäure ist. Dieses Umschalten zwischen epigenetischen Modifikationen führt zur Bindung von HP1 an das methylierte H3K9 und bewirkt somit eine Remodulation des Chromatins in den betroffenen Regionen (Fuks et al. 2003). MeCP2 scheint eine Schlüsselrolle in der neuronalen Entwicklung und der Muskeldifferenzierung zu spielen. Es wurde gezeigt, dass die MeCP2-Proteinmenge während beider Differenzierungsprozesse zunehmen (Brero et al. 2005; Jung et al. 2003).

In Mauszellen lokalisiert MeCP2 im perizentrischen Heterochromatin (Chromozentren), da sich hier ungefähr die Hälfte der gesamten 5-Methylcytosine des Mausgenoms befindet (Fuks et al. 2003). Dort vermittelt die Transkriptions-Repressions-Domäne (TRD) die Stilllegung bestimmter Genen (Wade 2001). Während der terminalen Muskeldifferenzierung führt die zunehmende Expression von MeCP2 zu einer Fusion der Chromozentren, wofür lediglich die MDB nötig ist. Diese Reorganisation des perizentrischen Heterochromatins durch MeCP2 führt zum Aufbau und/oder der Aufrechterhaltung eines spezifischen transkriptionellen Programms (Brero et al. 2005) und stellt eine Verbindung von DNA-Methylierung und Methyl-Cytosin-bindenden Proteinen mit Differenzierungsprozessen her.

### **1.2.1.3 Imprinting**

Unter Imprinting versteht man eine genetische Prägung durch differentielle DNA-Methylierung des paternalen und maternalen Allels eines Gens, was in einer Stilllegung des methylierten Allels resultiert. Das wohl am besten untersuchte Beispiel von Imprinting ist der *Igf2*-Genlocus. Dort liegt dem *Igf2*-Gen nachgeschaltet eine differentielle Methylierungsdomäne (DMD), vorauf das *H19*-Gen folgt. Bei *H19* handelt es sich um eine nichtkodierende RNA mit bisher unbekannter Funktion und es wird lediglich über eine mögliche Tumorsupressorfunktion spekuliert (Park et al. 2004). An der DMD bindet das Zinkfingerprotein CTCF (CCCTC-Bindungsfaktor) im nicht methylierten maternalen Allel und verhindert somit die DNA-Methylierung in dieser Region. Durch diese Bindung entsteht eine Chromatingrenze, welche verhindert, dass das *Igf2*-Gen mit nachgeschalteten Enhancern interagiert. Dies resultiert in der zur Expression von *H19* vom maternalen Allel.

Im paternalen Allel verhindert die bereits bestehende DNA-Methylierung eine CTCF-Bindung und führt zur Ausbreitung der DNA-Methylierung auf den *H19*-Promoter (Delaval et al. 2004). Dies

ermöglicht die *Igf2*-Expression und reprimiert *H19*. Unklar ist, ob die Methylierung des paternalen Allels standardmäßig erfolgt, oder zusätzliche Faktoren die DNA-Methylierung zur DMD dirigieren (Delaval et al. 2004).

### 1.2.2 Histone

Bei Histonen handelt es sich um evolutiv hoch konservierte, sehr basische Proteine. Diese kann man in die Nukleosomenkernhistone und die H1 Histone (Linker-Histone) einteilen. Ein charakteristisches Merkmal von Histonen ist, dass ihre Gene keinerlei Introns enthalten und die mRNA von Nukleosomenkernhistonen nicht polyadenyliert wird. Jedes Histon besitzt zwei funktionelle Domänen: einen globulären C-Terminus, der sowohl für Histon-Histon- als auch Histon-DNA-Interaktionen verantwortlich ist und einen basischen N-Terminus, der mit DNA und Nichthistonproteinen interagieren kann (Wolffe 1992).

#### 1.2.2.1 Kernhistone und Kernhistonvarianten

Die Kernhistone sind unterteilt in die Hauptgruppen H2A, H2B, H3 und H4. Jeweils zwei Proteine einer Gruppe bilden zusammen den Nukleosomenkern. Ein wichtiger Mechanismus zur Remodulation des Chromatins während der frühen Differenzierung ist der Austausch von Kernhistonen durch spezifische Histonvarianten. Unter den Kernhistonen besitzt H2A die größte Anzahl Varianten (H2A.Z, MacroH2A, H2A-Bbd, H2AvD, and H2A.X) (Kamakaka et al. 2005). H2A.Z wird in der frühen Differenzierung der Maus exprimiert, in das perizentrische Heterochromatin eingebaut und führt durch den Umbau der Chromatinarchitektur und die Rekrutierung bestimmter Proteine zum Aufbau spezieller perizentrischer Domänen (Rangasamy et al. 2003). H2A.X Moleküle, die benachbart zu einem DNA-Doppelstrangbruch lokalisieren, werden durch ATM- und ATR-Kinasen phosphoryliert. Diese als  $\gamma$ -H2A.X bezeichnete Variante ist essentiell für die Rekrutierung von Komponenten der DNA-Reparaturmaschinerie (Kamakaka et al. 2005). Somit tragen diese beiden H2A-Varianten zur genomischen Stabilität und einer reibungslosen Entwicklung bei.

CenpA, eine H3-Variante ist für den reibungslosen Ablauf der Chromosomensegregation nötig. Es trägt zum Aufbau der proteinösen Kinetochorstruktur bei und unterstützt die Positionierung der mitotischen Spindel, sowie die Rekrutierung von Kohäsinkomplexen, welche die Schwesterchromatiden zusammenhalten (Foster et al. 2005; Kamakaka et al. 2005).

Der Austausch von Histonvarianten im Chromatin wird über ATP-abhängige Chromatin Remodelling-Komplexe oder Histonchaperone vermittelt (Hake et al. 2004; Loyola et al. 2004). Der Chromatin assembly factor-1 (CAF-1) agiert als Replikations-abhängiges Histonchaperon und trägt aufgrund seiner Interaktion mit HP1 $\alpha$  und Methyl-CpG-bindenden Proteinen zur Modulation des Heterochromatins bei (Loyola et al. 2004). „histone repressor A“ (HIRA) führt zusammen mit „anti silencing function-1“ (Asf-1) zu einem Replikations-unabhängigen Einbau von Histon H3.3 in das Chromatin (Zhang et al. 2007).

### **1.2.2.2 Das Linker-Histon H1**

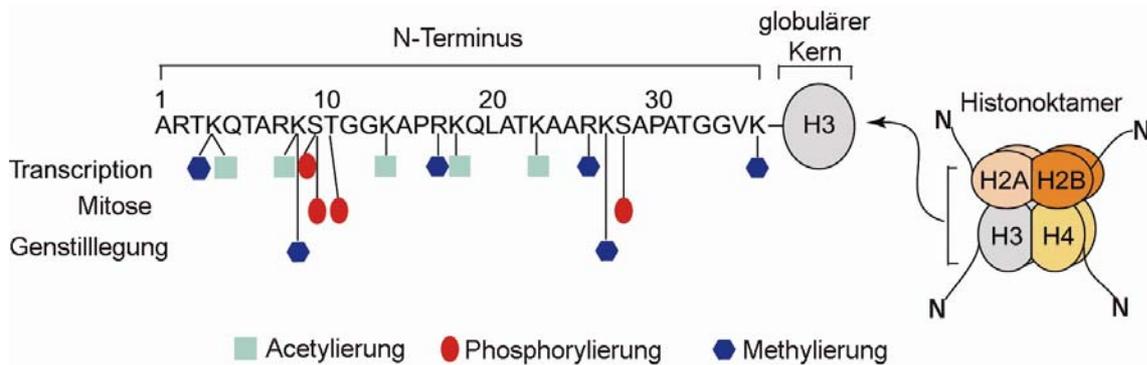
Das Linker-Histon H1 ist an den Ein- und Austrittstellen der DNA im Nukleosom mit seiner globulären Domäne gebunden (Woodcock et al. 2006). Diese Bindung führt zu einer stärkeren Kondensation des Chromatins (Th'ng et al. 2005; Woodcock et al. 2006). Bis heute sind in Säugern acht verschiedene entwicklungs- und gewebsspezifische Histon H1-Subtypen bekannt. Darunter fallen die somatischen Varianten H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 und H1.5, die Gonosomen-spezifischen Varianten H1t (t = testis), sowie H1oo (oo = oocyte), deren Expression lediglich in Spermatozyten beziehungsweise in Oozyten zu finden ist und das Histon H1.0, welches in einer Vielzahl terminal differenzierter Zellen exprimiert wird. Im Gegensatz zu den Kernhistonen ist die mRNA von H1 polyadenyliert (Wang et al. 1997).

Eine Depletion drei verschiedener H1-Varianten in embryonalen Mausstammzellen führte zur Verringerung globaler Nukleosomenabstände, sowie der Chromatinkompaktierung und Kernhistonmodifikationen. Des Weiteren trägt es zum Aufbau und der Aufrechterhaltung eines spezifischen DNA-Methylierungsmuster bei und nimmt somit an der epigenetischen Regulation bestimmter Gene teil (Fan et al. 2005). In *Xenopus laevis* resultiert das Fehlen von H1 in morphologischen Veränderungen der Chromosomen und einer Störung der Chromosomensegregation (Maresca et al. 2005).

Über die verschiedenen Histonvarianten und -subtypen hinaus beeinflussen weitere Chromatinproteine die Kompaktheit und Integrität, Zugänglichkeit und Genaktivität, sowie die Dynamik des Chromatins (1.3.4).

### **1.2.3 Der Histon-Code**

Auf der Ebene des nukleosomalen Chromatins sind Histonmodifikationen die wesentlichen epigenetischen Regulationsmechanismen. Diese Modifikationen finden im Wesentlichen an definierten Aminosäuren innerhalb der aus dem Nukleosom ragenden N-Termini statt. Darunter befinden sich unter anderem die Acetylierung beziehungsweise Mono- (me1), Di- (me2), oder Trimethylierung (me3) an Lysinen und die Phosphorylierung von Serinen oder Threoninen. Man spricht dabei auch vom Histon-Code. Als Beispiel sind in Abb. 1-3 die N-terminalen Modifikationsmöglichkeiten von Histon H3 dargestellt.



**Abb. 1-3: Potentielle posttranslationale Modifikationsstellen im N-Terminus von Histon H3**

Rechts: Histonoktamer aus H2A, H2B, H3, H4 (Nukleosom). Links: Schematische Darstellung von Histon H3 mit der globulären Domäne (grau) und der Aminosäuresequenz des N-Terminus. Hellblaue Quadrate stellen Acetylierungen, rote Kreise Phosphorylierungen und blaue Hexagone Methylierungen dar. Die unterschiedlichen Modifikationen sind zusätzlich nach ihrer Funktion unterteilt (links). Verändert nach Nowak et al. 2004

Die Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 spielt zum Beispiel eine entscheidende Rolle in der Kondensation und Segregation von Chromosomen während der Mitose. Des Weiteren nimmt die Phosphorylierung von H3K9 Einfluss auf die Methylierung derselben Aminosäure und somit auf die Heterochromatinbildung und die Transkriptionsaktivierung (Johansen et al. 2006; Nowak et al. 2004). Bei der DNA-Reparatur kommt die Phosphorylierung des Histon H2A.X ( $\gamma$ -H2A.X) zum tragen. Eine Phosphorylierung von Histon H1 durch die Cyklin-abhängige Kinase 2 (CDK2) ist entscheidend für das Fortschreiten im Zellzyklus, unterbindet eine Interaktion von Histon H1 mit HP1 während der Interphase und stellt somit einen möglichen Mechanismus für eine interphasische Dekondensation des Chromatins dar (Hale et al. 2006).

Bestimmte Modifikationsmuster sind charakteristisch für ein aktives Chromatin. Darunter die Acetylierung mittels Histonacetyltransferasen (HATs). Dies führt zu einer Ladungsneutralisierung und Verringerung der elektrostatischen Bindung zwischen DNA und Histonen. Daraus resultiert eine Auflockerung der Nukleosomalen DNA und somit eine erhöhte Zugänglichkeit des Chromatins für andere Proteine, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren (Clayton et al. 2006). Acetylierte Lysine werden über die Bromodomäne von Chromatin assoziierten Proteinen erkannt. Darunter befinden sich ATP-abhängige Chromatin-remodulierende Komplexe (SWI/SNF) und verschiedene HATs, welche durch ihre Bindung zu einer Aufrechterhaltung der Acetylierung beitragen (Clayton et al. 2006; Loyola et al. 2004). Eine Inaktivierung von Genen wird durch Deacetylierung von Histonen über Histon-Deacetylasen (HDACs) unterstützt. Aus Experimenten in Muskelzelllinien weiß man, dass die Regulation der Histon-Acetylierung über HATs und HDACs essentiell für den korrekten Ablauf der zellulären Differenzierung ist (McKinsey et al. 2001; McKinsey et al. 2002). Die Methylierung von H3K4, H3K36 und H3K79 führt beispielsweise zu aktivem Chromatin (siehe Tab. 1-1).

Inaktives Chromatin dagegen ist durch die Methylierung von H3K9 und H4K20 gekennzeichnet (siehe Tab. 1-1). Dabei ist H3K9me3 und H4K20me3 in perizentrischem Heterochromatin angereichert, während H3K9me1/2 und H4K20me1/2 im Euchromatin zu finden sind (Martin et al. 2005). Andere Modifikationen werden mit der Regulation der Expression bestimmter Gene in Verbindung gebracht. Darunter die Trimethylierung von H3K27 (H3K27me3), die für verschiedene Stilllegungsmechanismen, wie die Repression von homöotischen Genen und der Inaktivierung des weiblichen X-Chromosoms verantwortlich ist (Martin et al. 2005).

**Tab. 1-1: Histon-Lysin-Methylierungen, deren Bindungspartner und die Funktion im Chromatin**

Die Einteilung zeigt die möglichen Histon-Lysin-Methylierungen in Verbindung mit dem ihnen zugesprochenen Chromatinstatus. Die Aufgeführten Methyltransferasen sind lediglich Beispiele aus Säugern. Daneben sind Proteine aufgeführt, welche an die beschriebenen Modifikationen rekrutiert werden und darauf folgen die Bindungs-vermittelnden Domänen (CD = Chromodomäne, TD = Tudordomäne, WD40 = WD40-Sequenzwiederholung). Die Interaktionen sind lediglich für den Menschen dargestellt. Ausnahme ist Crb2 (*S.p.* = *Schizosaccharomyces pombe*). Nach Martin et al. 2005

		Methyltransferasen	Protein	Domäne
Offenes, transkriptionell aktives Chromatin	H3K4	SET1, MLL, SET7/SET8, SMYD3	Chd1, WDR5	CD, WD40
	H3K36	NSD1		
	H3K79	Dot1L	53BP1	TD
Kondensiertes, transkriptionell inaktives Chromatin	H3K9	SUV39h1, SUV39h2, ESET, G9a, GLP, RIZ	HP1	CD
	H3K27	EZH2	PcG- Proteine	CD
	H4K20	SUV4-20h1/2, SET8/PR-SET7, NSD1	Crb2 ( <i>S.p.</i> )	TD

Lange Zeit galten Histon-Lysin-Methylierungen als stabile Modifikationen. Kürzlich wurden allerdings verschiedene Proteine mit Histon-Demethylaseaktivität entdeckt. Auch diese besitzen eine Spezifität, sowohl für bestimmte Histone als auch bestimmte Methylierungsstufen. Darunter fällt zum Beispiel das Protein LSD1, welches H3K4 Mono- und Dimethylierungen (H3K4me1/2) entfernt, aber H3K4me3 nicht beeinflusst. Eine weitere Familie an Enzymen sind die mit einer Jumonji C-Domäne (JmjC) ausgestatteten Demethylasen von H3K36me1/2 und H3K9me2/3. Es ist zu erwarten, dass in naher Zukunft weitere Histon-Lysin-Demethylasen (zum Beispiel aus der großen Familie der Jmj-Proteine) entdeckt werden (Trojer et al. 2006). Ein Gleichgewicht im Zusammenspiel von HMTs und Histon-Demethylasen ist demzufolge entscheidend für die Genregulation und die Steuerung von Entwicklungsprozessen.

Die Modifikationsmuster bei Histonen stellen eine Interaktionsplattform für verschiedene Proteine dar, was zu einer funktionellen Strukturierung des Chromatins führt. Diese Interaktion erfolgt über verschiedene Proteindomänen (Tab. 1-1).

Beispiele hierfür sind die Tudordomäne, eine so genannte WD40-Sequenzwiederholung und die Chromodomäne von HP1 und Proteinen des Polycomb-Komplexes (Martin et al. 2005). Letzterer stellt eine Verbindung zwischen H3K9- und DNA-Methylierung her und spielt eine wichtige Rolle in der zellulären und embryonalen Differenzierung aufgrund epigenetischer Regulation spezifischer Gene.

### 1.2.4 Der Polycomb-Komplex – Zusammenspiel von DNA- und Histonmethylierung

Transkriptionsrepression verhindert zeitlich und räumlich unangebrachte Genexpression und bewirkt ein einzigartiges Expressionsmuster, das essentiell für die Ausprägung und Aufrechterhaltung der Zellidentität ist (Francis et al. 2001). Ed Lewis beschrieb 1978 als erster die Rolle des Polycomb Gens (*Pc*) in der Regulation homöotischer Gene (Lewis 1978). Die *Drosophila* Polycomb group (PcG)-Proteine reprimieren beispielsweise die Transkription von HOX-Genen und sind somit an der Segmentierung und am Aufbau der antero-posterioren Körperachse beteiligt (Simon et al. 1992). Verschiedene PcG-Proteine bilden zusammen Polycomb reprimierende Komplexe (PRC1, PRC2 und PRC3). Enhancer of zeste (Ezh1 und Ezh2) sind Proteine, welche in Säugern in den Komplexen PRC2 und PRC3 vorkommen. Ezh2 assoziiert mit dem Transkriptionsregulator Yin Yang 1 (YY1) und diese beiden Proteine wiederum interagieren mit der Histondeacetylase HDAC1 (Caretti et al. 2004). Des Weiteren vermittelt Ezh2 über seine intrinsische SET-Domäne die Methylierung von H3K27 (Czermin et al. 2002) und kontrolliert CpG-Methylierung der DNA über direkten Kontakt mit DNA-Methyltransferasen (Martin et al. 2005; Vire et al. 2005).

Weitere Proteine des PRC2 sind „Embryonic ectoderm development“ (Eed) und „Suppressor of zeste 12 (Su(z)12). Eed interagiert mit Ezh2 und ist an der H3K27me-vermittelten Inaktivierung des X-Chromosoms beteiligt (Plath et al. 2003). Su(z)12 interagiert sowohl mit Ezh2, als auch direkt und spezifisch mit HP1 $\alpha$  *in vitro* und *in vivo* (Yamamoto et al. 2004). Dabei findet die HP1 $\alpha$ -Su(z)12-Interaktion über die Chromoshadow-Domäne statt und erfolgt lediglich an HP1 $\alpha$ -Dimeren. Aufgrund dieses Zusammenspiels wird ihm eine Rolle in der Aufrechterhaltung von Heterochromatin und der HP1-vermittelten Genstilllegung sowie bei der „position effect variegation“ (PEV) (1.2.5) zugeschrieben (Yamamoto et al. 2004).

### 1.2.5 Heterochromatin-Protein 1 (HP1)

Das Heterochromatin Protein 1 (HP1) ist eines der häufigsten Heterochromatinproteine (Hediger et al. 2006) und ist evolutiv von *Schizosaccharomyces pombe* bis zum Menschen hoch konserviert. Es wurden erstmalig in *Drosophila* als nukleäres Proteine entdeckt, welches an den Chromozentren polytärer Chromosomen lokalisiert (Maison et al. 2004). Es besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 25 kDa. Wie auch in *Drosophila* existieren in Maus und Mensch drei HP1-Isoformen (HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$ , HP1 $\gamma$ ) (Hiragami et al. 2005). Diese gleichen sich in der strukturellen Organisation ihrer Domänen (siehe Abb. 1-4 folgende Seite).



**Abb. 1-4: Domänenstruktur von HP1 Proteinen**

HP1-Proteine bestehen aus einer aminoterminalen, globulären Chromodomäne (**Chromatinorganisations** **Modifikator**, CD, rot), gefolgt von einer variablen Hinge-Region (blau) und der C-terminalen, globulären **Chromoshadow**domäne (CSD, grün) (nach Maison et al. 2004). Die Aminosäuresequenzen der Säuger-CD und -CSD weisen 50-70% Identität zu den homologen *Drosophila*-Domänen auf. Die der Hinge-Region dagegen lediglich 25-30% (Hiragami et al. 2005).

HP1 $\alpha$  ist hauptsächlich in perizentrischem Heterochromatin anreichert. HP1 $\beta$  ist über weite Teile der Chromosomen verteilt und HP1 $\gamma$  lokalisiert hauptsächlich im Euchromatin (Brasher et al. 2000; Verschure et al. 2005). HP1 $\alpha$  und HP1 $\beta$  binden an das Chromatin als Homodimere, sind aber auch fähig Heterodimere zu bilden. Diese Fähigkeit zur Bildung von Homo- und Heterodimeren scheint zu Unterschieden im Verpackungsgrad des Heterochromatins beizutragen. In lebenden Zellen wird die globuläre Chromodomäne (CD) für die Bindung von HP1 im Heterochromatin benötigt. Dies wird durch die Hinge-Region und die Chromoshadow-Domäne (CSD) unterstützt (Cheutin et al. 2003). Die CSD vermittelt Interaktionen zwischen HP1 $\alpha$ -Molekülen selbst, zwischen HP1 $\alpha$  und HP1 $\beta$  oder weitere Faktoren, die zur Bindung von HP1 $\alpha$  im Heterochromatin beitragen (Eskeland et al. 2006; Maison et al. 2004). Die Interaktion der CD mit dem methylierten H3K9 stellt eine entscheidende Komponente in der Chromatinbindung von HP1 $\alpha$  dar (Lachner et al. 2001). Trotz der Notwendigkeit dieser Interaktion *in vivo*, ist sie *in vitro* nicht ausreichend und die HP1 $\alpha$ -Bindung an methyliertes H3K9 ist eher schwach (Eskeland et al. 2006). Dies ergab die Messung relativ hoher Dissoziationskonstanten (Jacobs et al. 2002; Nielsen et al. 2002). Daher wird vermutet, dass unterstützende Faktoren, wie RNA-Komponenten oder andere Chromatinproteine die Bindung von HP1 $\alpha$  am Chromatin stärken und dessen Verweildauer erhöhen (Eskeland et al. 2006).

Interaktionen von HP1 $\alpha$  wurde mit Transkriptionsvermittelnde Faktoren (TIFs) (Brasher et al. 2000), Suppressor of zeste (Su(z)12) (Yamamoto et al. 2004) und dem TATA-binding protein (TBP) assoziierten Faktor TAF<sub>II</sub>130 (Vassallo et al. 2002) detektiert. Darüber hinaus wurden Interaktionen mit Histonmethyltransferasen (HMTs) aus der Familie der Su(var)3-9-Proteinfamilie, Histondeacetylasen (HDACs) (Hiragami et al. 2005) und Chromatin assambly factor 1 (CAF1) (Murzina et al. 1999) festgestellt.

HP1 führt zu einer verstärkten Kondensation (Heterochromatinisierung) und der Stilllegung euchromatischer Gene. Im Gegensatz dazu fördert es die Expression von heterochromatischen Genen beziehungsweise ist dafür sogar notwendig. Für letzteres gibt es zwei mögliche Mechanismen. Zum einen könnte die verstärkte Chromatinkondensation dazu führen, dass entfernte regulatorische Elemente mit dem Promoter eines heterochromatischen Genes assoziieren. Alternativ könnte HP1 eine

vorteilhafte Chromatinkonfiguration in Promoter-nahen Regionen induzieren, oder Transkriptionsfaktoren rekrutieren (Hiragami et al. 2005).

Ein Beispiel dafür ist die Expression der heterochromatischen Gene *light* und *rolled* in *Drosophila*. Eine homozygote Mutation von HP1 in *Drosophila* ist letal (Lu et al. 2000).

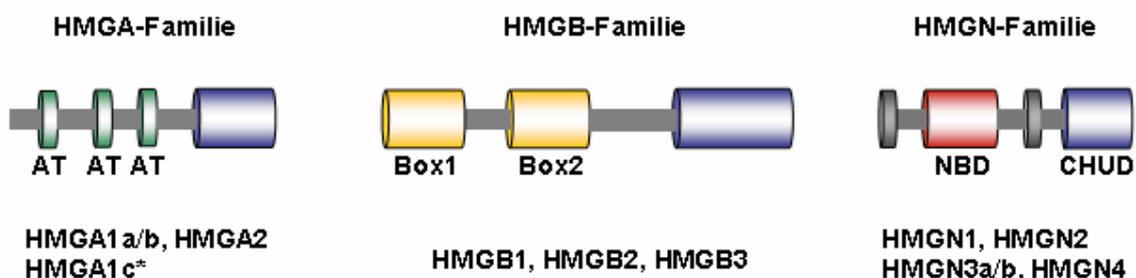
Die chromosomale Translokation eines Genes in die Nähe von centomerischem Heterochromatin führt zu dessen Repression. Dieser Vorgang wurde als „position effect variegation“ (PEV) bezeichnet. Erstmals wurde dies beim *white*-Gen in *Drosophila* entdeckt, welches für die einheitlich rote Pigmentierung des Auges verantwortlich ist. Das Säuger-Äquivalent zu PEV führt beispielsweise zur Stilllegung des T-Zell-Antigens CD2 (Festenstein et al. 1999). Die Überexpression von HP1 in *Drosophila* und in Säugern führt zu einer Verstärkung des Stilllegungseffektes auf translozierte Gene (Festenstein et al. 1999), wohingegen ein mutiertes HP1 eine geringere Stilllegung nach sich zieht (Eissenberg et al. 1990). Die Funktion von HP1 in der Heterochromatisierung und der daraus resultierenden Stilllegung euchromatischer und Aktivierung heterochromatischer Gene spielt eine entscheidende Rolle während der Entwicklung eukaryotischer Organismen (Eissenberg et al. 1993; Hiragami et al. 2005; Lu et al. 2000).

### **1.2.6 Einfluss von RNAi auf den Chromatinzustand**

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus zur Stilllegung von Genen und zum Schutz gegen Transposons, der sowohl in Protisten, Pflanzen, Pilzen, Tieren und Menschen auftritt. Man kennt drei Arten von RNAi-vermittelten Prozessen. Sie ermöglichen Degradation von mRNA (post-translationale Genstilllegung), Translationsrepression und Initiation von Heterochromatinbildung. Unter den kleinen RNAs gibt es zwei Hauptklassen. Die miRNA (microRNA) entsteht aus einem Transkript, welches eine Haarnadelstruktur ausbildet. Die siRNA (small interfering RNA) entsteht aus einem langen doppelsträngigen RNA-Transkript aus Viren, Transposons oder heterochromatischen Sequenzwiederholungen am Rande von Centromeren. Beide RNA-Strukturen werden daraufhin von Dicer, einem Ribonuklease-III-ähnlichem Enzym, in kleine RNA-Moleküle mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden gespalten. Diese werden dann von dem Protein Argonaut in leicht unterschiedlicher Art und Weise gebunden und bilden einen RNA-Protein-Komplex aus. Im Falle von miRNAs entsteht der „RNAi-induced silencing complex“ (RISC), bei siRNAs der „RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing“ (RITS)-Komplex. Die miRNAs des RISC-Komplexes werden einzelsträngig und vermitteln post-translationale Genstilllegung durch mRNA-Degradation. RITS bindet naszierende mRNA-Transkripte und führt zu lokaler Heterochromatisierung. Letzteres wird über die Initiation von H3K9-Methylierung vermittelt, was die Rekrutierung von HP1 (1.2.5) und DNA-Methyltransferasen (1.2.1.1) nach sich zieht, deren Aktivitäten sich wiederum gegenseitig verstärken. Dieses Phänomen tritt hauptsächlich in der frühen Ontogenese auf (Holmquist et al. 2006).

### 1.3 High-mobility-group (HMG)-Proteine

Neben den Histonen sind die High-mobility-group (HMG)-Proteine die zweithäufigste Proteinklasse am Chromatin (Bianchi et al. 2005). Diese wurde vor über 30 Jahren entdeckt und zeichnet sich dadurch aus, dass die Mitglieder kleine (<30 kDa) Kernproteine sind, die dynamisch und reversibel an Chromatin binden und sich mittels 350 mM Salz aus Kernen und vom Chromatin extrahieren lassen. Des Weiteren weisen sie eine Löslichkeit in 2-5% Perchloressigsäure, extensive post-translationale Modifikationen und eine hohe Mobilität während der Gelelektrophorese auf (Bianchi et al. 2005; Bustin et al. 1990). HMG-Proteine agieren als Komponenten eines kompetitiven und dynamischen Netzwerks verschiedener Chromatin-bindender Proteine und spielen eine wichtige Rolle in der direkten und indirekten strukturellen Modulation des Chromatins. Daher werden sie auch als Architekturfaktoren des Chromatins bezeichnet und nehmen Einfluss auf die Regulation von DNA-abhängigen Prozessen, wie Transkription, Replikation und DNA-Reparatur und epigenetische Modifikationen (Bianchi et al. 2005; Hock et al. 2007). Die HMG-Proteine werden in drei Familien eingeteilt: HMGA-Proteine, die über drei AT-Hook-Motive an AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche von B-Form-DNA binden. Die HMGB-Proteine binden an die DNA über zwei L-förmige HMG-Box-Motive aus drei  $\alpha$ -Helices. Die dritte Familie stellen die HMGN-Proteine, deren Chromatinbindung sequenzunabhängig direkt an den Nucleosomen mittels einer Nucleosomalen Bindungsdomäne (NBD) erfolgt. Alle Proteine der drei HMG-Familien besitzen einen sauren C-Terminus, der potentiell eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielt (Bianchi et al. 2005; Hock et al. 2007). Die Domänenstruktur der HMG-Proteine ist in Abb. 1-5 dargestellt.



**Abb. 1-5: Strukturelle Hauptmerkmale der HMG-Proteinfamilien**

Die einzelnen Familienmitglieder sind unter dem Diagramm aufgelistet. Alle HMGA-Proteine besitzen drei AT-Hooks (grün) und einen sauren C-Terminus (blau). Eine Ausnahme bildet HMGA1c mit nur zwei AT-Hooks. Die Mitglieder der HMGB-Familie besitzen alle zwei HMG-Boxen als DNA-Bindungsmotif (gelb) und einen erweiterten C-Terminus (blau). Typisch für HMGN-Proteine ist die positiv geladene Nucleosomale Bindungsdomäne (NBD, rot) und einer negativ geladenen C-terminalen Chromatin unfolding domain (CHUD, blau). Aus Hock et al. 2007.

### 1.3.1 Die HMGB-Proteine

HMGB-Proteine sind die häufigsten HMG-Proteine im Kern. In Mäusen gibt es drei verschiedenen HMGB-Proteine (HMGB1, HMGB2 und HMGB3), die alle in frühen Embryonen exprimiert werden. In der Embryonalentwicklung werden HMGB2 und HMGB3 gewebsspezifisch herunter reguliert, während HMGB1 sowohl in embryonalen, als auch in adulten Zellen exprimiert wird. Des Weiteren wird HMGB1 von Makrophagen und nekrotischen Zellen sekretiert und beeinflusst die Zellmigration, Tumor-Invasivität und wirkt als Cytokin bei Entzündungsreaktionen. In der frühen Embryogenese von *Xenopus* und *Drosophila* spielt HMGB1 eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur. In Mausfibroblasten führt ein HMGB1-knock out zu erhöhter Instabilität des Chromatins und *Hmgb1*<sup>-/-</sup>-Mäuse sterben sofort nach der Geburt an Hypoglykämie. *Hmgb2*<sup>-/-</sup>-Mäuse dagegen sind lebensfähig, aber die männliche Mäuse in ihrer Spermienproduktion beeinträchtigt. *Hmgb3*<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen Unterschiede in der Bildung von Blutzellen (Thomas et al. 2001) auf und in *Xenopus* beeinflusst eine veränderte *Hmgb3*-Expression Augen- und Gehirnentwicklung (Terada et al. 2006).

### 1.3.2 Die HMGN-Proteine

Die Familie der HMGN-Proteine ist in allen Säugern und der meisten Vertebraten zu finden und besteht aus fünf Mitgliedern (Catez et al. 2003): HMGN1, HMGN2, HMGN3a, dessen Spleißvariante HMGN3b und HMGN4. HMGN-Proteine spielen eine Rolle in der epigenetischen Modifikation von Histon H3. Zum Beispiel beeinflussen HMGN1 und HMGN2 die Phosphorylierung von H3S10 (Lim et al. 2004). Daraus resultiert die Aktivierung von „immediate early“ (IE) Genen (Bianchi et al. 2005). Daneben wurde auch gezeigt, dass beide HMGN-Proteine die Acetylierung an H3K14 unterschiedlich beeinflussen (Ueda et al. 2006). *HMGN1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung, da aufgrund der fehlenden Auflockerung des Chromatins den Reparaturproteinen des „nucleotide excision repair“ (NER)-Systems der Zugang zu geschädigten DNA-Sequenzen verhindert bleibt. Daraus resultiert eine Verdoppelung der Tumorfrequenz in diesen Tieren (Bianchi et al. 2005).

Der HMGN-Expressionslevel spielt eine entscheidende Rolle in der Differenzierung. In *Xenopus* beginnt die HMGN-Transkription mit der Midblastulatransition (MBT). Eine Veränderung des HMGN-Expressionslevels nach der MBT führt zu massiven Entwicklungsdefekten im Embryo (Korner et al. 2003). In der Maus werden die HMGN-Proteine während der Embryonalentwicklung zunehmend herunter reguliert, mit Ausnahme von sich ständig erneuernden Zellen, die eine aktive Differenzierung durchlaufen (Furusawa et al. 2006). In C2C12 Maus-Myoblasten inhibiert eine konstitutive Expression von HMGN-Proteinen die Myogenese (Pash et al. 1990). Für einen normalen Ablauf der Differenzierung wird also eine genau regulierte Expression der HMGN-Proteine benötigt.

### 1.3.3 Die HMGA-Proteine

HMGA-Proteine sind hoch konserviert und wurden bei der Hefe, in Insekten, Pflanzen und bei Vertebraten beschrieben (Reeves et al. 2001). Die Familie der HMGA-Proteine besteht aus HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c und HMGA2. In Säugern werden die HMGA-Proteine durch lediglich zwei Gene kodiert. Dabei stellen HMGA1a-c Spleißvarianten des *HMGA1*-Transkriptes dar, wohingegen HMGA2 von einem eigenen Gen kodiert wird. Über HMGA1c ist bisher nur wenig bekannt, deshalb wird auf diese Variante hier nicht näher eingegangen.

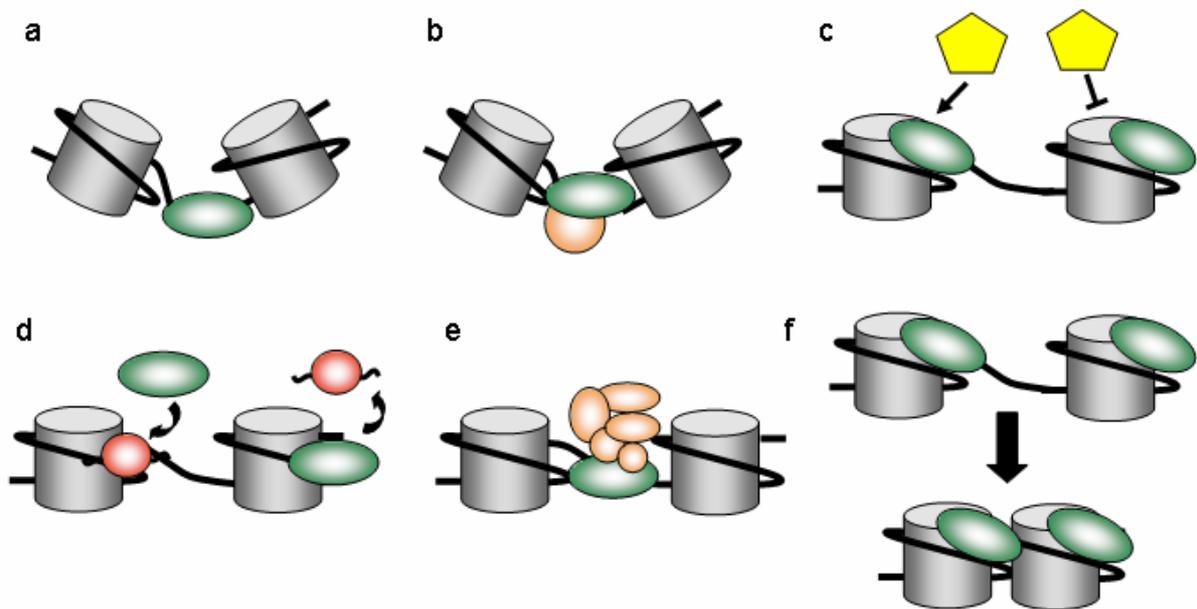
Eine Bindung an die DNA wird bei HMGA1a, HMGA1b und HMGA2 durch jeweils drei unabhängige, positiv geladene Konsensussequenzen, die AT-Hooks, vermittelt. Sie findet sequenzunabhängig in der kleinen Furche AT-reicher B-Form-DNA statt, wobei die AT-Hooks dabei vermutlich eine halbmondförmige Konformation annehmen (Reeves et al. 1990). In Metaphasechromosomen bei Mensch und Maus lokalisieren HMGA1-Proteine in den AT-reichen G/Q- und C-Banden (Disney et al. 1989) und sind in lebenden Interphasezellen im Heterochromatin angereichert (Harrer et al. 2004). AT-Hooks zeichnen sich durch die palindromische Aminosäureabfolge (Pro)-Arg-Gly-Arg-Pro (dabei sind Arg-Gly-Arg-Pro invariant) aus, welche von positiv geladenen Aminosäuren flankiert wird (Reeves et al. 1990). Sie stellen ein Motiv dar, das in der Evolution von Bakterien bis hin zum Menschen hoch konserviert ist und auch in nicht-HMGA-Proteinen vorkommt. Darunter beispielsweise Transkriptionsfaktoren oder Komponenten von Chromatin-Remodeling-Komplexen (Reeves 2001). Es wird vermutet, dass die AT-Hooks zusammen mit den sie umgebenden Nachbarsequenzen eine Oberfläche für Protein-Protein-Interaktionen darstellen (Yie et al. 1999).

Ein weiteres strukturelles Merkmal der HMGA-Proteine ist ihr saurer C-Terminus, dessen Funktion bis heute nicht vollständig geklärt ist. Diese Domäne vermittelt vermutlich verschiedene Protein-Protein-Interaktionen (Hock et al. 2007). Die Domänenstruktur von HMGA ist in Abb. 1-5 dargestellt. HMGA-Proteine unterliegen *in vivo* extensiven post-translationalen Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Poly-ADP-Ribosylierung (Reeves 2001; Reeves et al. 2001). Diese wirken sich auf die kinetischen Eigenschaften der HMGA-Proteine aus. Veränderungen im HMGA1-Phosphorylierungsmuster wurden in frühen apoptotischen Stadien festgestellt. Modifikationsunterschiede zeigten sich auch in metastatischen Zellen im Vergleich zu ihren nicht-metastatischen Vorläufern (Edberg et al. 2004). Generell tragen all diese Modifikationen dazu bei, die biologische Aktivität von HMGA-Proteinen und ihre zellulären Funktionen zu regulieren (Reeves 2001).

### 1.3.3.1 Biologische Funktion von HMGA-Proteinen

#### Modulation der Chromatinarchitektur

Die Bindung von HMGA-Proteinen an das Chromatin führt potentiell zu strukturellen Änderungen wie Streckung, Biegung, Schleifenbildung oder Auflockerung der DNA (Sgarra et al. 2004) und zur Rekrutierung weiterer Chromatinproteine beziehungsweise Protein-Komplexe (Hock et al. 2007). Die strukturellen Modulationsmöglichkeiten der Chromatinarchitektur durch die HMGA-Proteine sind in Abb. 1-6 dargestellt.



**Abb. 1-6: Veränderungen der Chromatinstruktur durch HMGA-Proteine**

Modelle zweier benachbarter Nucleosomen (grau mit DNA (schwarz)) und gebundenem HMGA (grün). (a) HMGA induziert Biegungen in der Chromatinstruktur. (b) HMGA-Proteine werden durch bestimmte regulatorische Faktoren (beige Kugel) an spezifische Zielorte rekrutiert und verändern dort die Chromatinstruktur. (c) HMGA vermittelt oder unterbindet die Bindung von weiteren Chromatin-modulierenden Faktoren (gelb). (d) HMGA konkurriert mit nukleären Proteinen (rot) um Chromatinbindungsstellen, dies ist zum Beispiel der Fall beim Linker-Histon H1. (e) HMGAs sind Teil von regulatorischen Multiproteinkomplexen (beige). Das prominenteste Beispiel ist die Förderung der Enhanceosom-Bildung durch die spezifische Bindung von HMGA an regulatorische Gensequenzen im Interferon- $\beta$  Gen. (f) HMGA führt zur Kompaktierung des Chromatins und unterstützt somit die Heterochromatinbildung. Verändert nach Hock et al. 2007.

Über diese Modulation der Chromatinarchitektur und verschiedene Protein-Protein-Interaktionen greifen HMGA-Proteine unter anderem in die Genregulation ein und beeinflussen darüber die Entstehung, Progression und Malignität von Tumoren, die zelluläre Seneszenz, Krankheiten wie Typ-II-Diabetes und die Regulation zellulärer und embryonaler Differenzierungsprozesse, wie Spermatogenese, Fettzellendifferenzierung und Myogenese (Hock et al. 2007).

### **Transkriptionsregulation**

Die HMGA1-Isoformen modulieren die Expression bestimmter Konstellationen an Genen, die in Signaltransduktion, Zellproliferation, Induktion der Angiogenese, sowie der Tumorinitiation, -invasion und -migration. Ein Paradebeispiel der Steuerung von Genexpression ist die Bindung von HMGA an den Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ )-Promoter. Dies führt zu einer kooperativen Rekrutierung von Transkriptionsaktivatoren wie NF- $\kappa$ B, ATF2/c-Jun und dem Interferon-regulierenden Faktor (IRF). Die Interaktion von HMGA1a mit diesen Faktoren führt zum Aufbau des Enhanceosoms. Das CREB-bindende Protein (CBP) nutzt dies als Bindungsplattform, was zur Transkriptionsaktivierung führt. CBP wiederum acetyliert HMGA1a, was einen Zerfall des Enhanceosoms bewirkt. Somit stellt HMGA1a einen sensitiven, molekularen Schalter zur Aktivierung und nachfolgenden Inaktivierung der IFN- $\beta$ -Genexpression dar (Bianchi et al. 2005; Yie et al. 1999).

### **Proliferation und Differenzierung**

HMGA-Proteine sind in Stammzellen und undifferenzierten Zellen früher Embryonen exprimiert. In terminal differenzierten Zellen dagegen nicht mehr zu detektieren (Fedele et al. 2001; Hock et al. 2007; Sgarra et al. 2004). In der frühen Mausentwicklung wurde eine sehr hohe HMGA1-Expression in allen embryonalen Geweben bis an Tag 8,5 detektiert. Während diesem Zeitraum finden die wichtigsten Ereignisse der Organentwicklung statt. Dabei sind HMGA1-Proteine in die Regulation entwicklungsrelevanter Gene, wie zum Beispiel Frizzled-5, Wnt-13, Wnt-10B und Notch-4 involviert (Reeves et al. 2001). In *Xenopus laevis* wird die HMGA2-mRNA während der Embryonalentwicklung umverteilt (Hock et al. 2007). Diese entwicklungsabhängige Expression beziehungsweise Verteilung spricht für eine spezifische Rolle in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen. In embryonalen Stammzellen (ES) ist HMGA1 notwendig für die lympho-hämatopoetische Differenzierung (Battista et al. 2003) und HMGA2 ist wichtig für die mausembryonale Stammzellendifferenzierung hin zu Skelettmuskelzellen (Caron et al. 2005). *HMGAI*<sup>-/-</sup>-Mäuse leiden an kardialer Hypertrophie (Fedele et al. 2006). *HMGA2*<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen einen so genannten Pygmäen-Phänotypen auf, da sie deutlich kleiner sind als wildtypische Mäuse (Zhou et al. 1995) und besitzen ein drastisch reduziertes Fettgewebe, da HMGA2 direkt in die Proliferation von Prä-Adipocyten-Vorläuferzellen involviert ist (Anand et al. 2000). Zusätzlich dazu sind männliche *HMGA2*<sup>-/-</sup>-Mäuse Spermatogenese-defizient (Chieffi et al. 2002). Eine Überexpression eines trunkierten HMGA2 führt zu größeren Mäusen (*giant*-Phänotyp) mit Fettleibigkeit. Außerdem entwickeln diese Tiere Lymphome (Baldassarre et al. 2001). HMGA1 führt auch zur Hochregulierung von Genen, welche in der Zellzyklusregulation und der Signaltransduktion involviert sind. Darunter befinden sich Cyclin A, C und D, Raf, JNK2 und p38 MAPK (Reeves et al. 2001).

### **Die Rolle von HMGA-Proteine bei der Entstehung von Krankheiten**

Da HMGA1 die Expression von Genen moduliert, die in der Signaltransduktion, Zellproliferation, Migration, Angiogenese, Tumorentstehung und Metastasenbildung involviert sind, spielt es eine entscheidende Rolle in der Differenzierung und der Tumorentstehung (Evans et al. 2004).

Eine HMGA-Überexpression ist ein Kennzeichen vieler maligner und gutartiger Tumore, wobei die HMGA-Proteinmenge mit deren Malignität und dem metastatischen Potential korreliert (Edberg et al. 2004; Reeves 2001). Die HMGA-Expression dient daher auch als Tumormarker in der Diagnostik (Sgarra et al. 2004). HMGA1 fördern auch den epithelial-mesenchymale Übergang (EMT), ein Vorgang der bei der Wanderung von embryonalen Zellschichten und der Metastasenbildung auftritt. Dabei wandeln sich polarisierte, epitheliale Zellen in bewegliche, mesenchymale Zellen um (Reeves et al. 2001). HMGA2 ist ein wichtiger Vermittler von Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Signalen, welche epitheliale Differenzierung, Tumorentstehung und Metastasenbildung kontrolliert (Thuault et al. 2006) und eine Überexpression von HMGA2 ist ausreichend um gutartige Tumore in Mäusen zu induzieren (Zaidi et al. 2006).

*HMGA1* spielt als Zielgen von c-Myc eine wichtige Rolle in der c-Myc-vermittelten neoplastischen Transformation (Dolde et al. 2002; Evans et al. 2004). HMGA1-Proteine führen zur Repression von Tumorsuppressorgenen wie *BRCA1* (Evans et al. 2004) und verhindern ein normales „nucleotide excision repair“ (NER) nach UV-induzierter Bildung von Thymidin-Dimeren. Dies resultiert in genomischer Instabilität und trägt zu neoplastischer Transformation und Tumorentstehung bei (Reeves et al. 2005). Unterstützt wird dies durch kürzlich beschriebene Interaktionspartner von HMGA, darunter der Nukleäre Faktor NF- $\kappa$ B und die Tumorsuppressoren p53 (Frasca et al. 2006) und pRB (Fedele et al. 2006; Fedele et al. 2006).

Neben ihrem offensichtlichen Einfluss auf die Tumorentstehung, wurde HMGA vor kurzem eine anti-proliferative Aktivität in myelo-lymphoproliferativen Störungen und während der zellulären Seneszenz zugeschrieben (Fedele et al. 2006; Narita et al. 2006), was einer malignen Transformation entgegenwirken würde. Während der Seneszenz trägt HMGA durch die Bildung von Seneszenz assoziierten Heterochromatinfoci (SAHF) zur globalen Modulation des Chromatins bei (Hock et al. 2007).

Studien in *Hmga1*<sup>-/-</sup>-Mäusen haben gezeigt, dass HMGA1a notwendig für eine einwandfreie Expression des Insulinrezeptors ist. Bei einigen Diabetespatienten, war die Deletion eines einzelnen Nukleotids in der 3' untranslatierte Region (3'-UTR) für eine drastische Reduktion der Halbwertszeit der HMGA1a-mRNA verantwortlich. In beiden Fällen resultierte die geringere HMGA1-Proteinmenge in einer abgeschwächten Insulinrezeptor-Expression, was zu Insulinresistenz und Typ-II-Diabetes führte (Foti et al. 2005).

### **1.3.3.2 Interaktionspartner von HMGA-Proteinen**

#### **Interaktion von HMGA-Proteinen mit Chromatin**

HMGA-Proteine erkennen vornehmlich die DNA-Struktur und weniger die spezifische DNA-Sequenz. Daher binden sie hauptsächlich an Substrate mit ungewöhnlichen strukturellen Eigenschaften. Darunter fallen gebogene und superhelikale DNA, synthetische „four-way-junctions“ (Hill et al. 1999), ungepaarte AT-reiche Sequenzen und eingeschränkte Regionen der DNA auf der Oberfläche von nukleosomalen Kernpartikeln (Reeves 2001).

Daneben interagieren HMGA-Proteine auch mit den Kernhistonen H3, H2A und H2B selbst. Dies wurde in Gel mobility shift assays (GMSA) gezeigt, in welchen eine zunehmende Konzentration an HMGA-Protein im Vergleich zu der Menge der Nukleosomen zu einer geringeren Mobilität Letzterer in der Gelelektrophorese führt (Reeves et al. 1993). Die Bindungsstellen von HMGA-Proteinen sind *in vitro* an den Ein- und Austrittsstellen der DNA an den Nukleosomen zu finden (Reeves 2001). Dabei vermitteln die gleichen Regionen der HMGA-Proteine, die auch für die Bindung AT-reicher DNA verantwortlich sind, die Interaktion mit den Nukleosomen (Banks et al. 2000). Hohe HMGA1a Konzentrationen führten *in vitro* dazu, dass bis zu 4 HMGA-Moleküle an ein isoliertes Nukleosom binden (Reeves et al. 1993).

Die strukturellen Veränderungen, die HMGA durch Bindung in der DNA erzeugt, können durch mehrere verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Erstens durch die lokale Neutralisierung negativer Ladungen im Phosphodiesterückgrat der DNA, zweitens durch die simultane Bindung aller drei AT-Hooks eines HMGA-Moleküls an voneinander entfernten DNA-Regionen, drittens durch eine simultane und kooperative Bindung mehrerer HMGA-Moleküle und viertens durch nicht-kovalente Vernetzungen unterschiedlicher DNA-Moleküle durch ein HMGA-Molekül (Reeves et al. 2001).

#### **Interaktion von HMGA-Proteinen mit nukleären Proteinen**

In früheren Untersuchungen wurden hauptsächlich Transkriptionsfaktoren unter den Interaktionspartnern der HMGA-Proteine identifiziert (Reeves 2001). Neuere Studien zeigen allerdings, dass die Mehrheit der Interaktionspartner gar keine Transkriptionsfaktoren sind. Dagegen lassen sie sich grundsätzlich in drei Klassen einteilen: mRNA prozessierende Proteine, DNA-prozessierende oder -modulierende Proteine und Strukturproteine (Sgarra et al. 2005).

HMGA1a bindet zum Beispiel an mRNA und das U1-70K-Protein, einer Komponente des U1-snRNP-Komplexes (small nuclear ribonucleoprotein particle) und verhindert damit das korrekte Spleißen der Presenilin-2-Prä-mRNA. Dies spielt bei der Entstehung von „sporadischem“ Alzheimer eine Rolle (Manabe et al. 2003). Es wurden weitere Interaktionspartner von HMGA-Proteinen unter den heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNP K, hnRNP H, hnRNP F und hnRNP M) und Spleißfaktoren (SF3a120) gefunden, die alle am Spleißen von Prä-mRNA beteiligt sind (Sgarra et al. 2005).

Unter den DNA-prozessierenden und -modellierenden Interaktionspartnern von HMGA befindet sich Ku80, eine Untereinheit der ATP-abhängigen DNA-Helicase II, RBBP-4 (eine Untereinheit des Chromatin assembly factor 1 (CAF1)) und RBBP-7, die Untereinheit 2 der Histonacetyltransferase B. Vermutlich stellen HMGA-Proteine Co-Faktoren in der Rekrutierung dieser Chromatinmodulatoren dar und fungieren aufgrund ihrer potentiellen post-translationalen Modifikationen als molekulare Schalter des Zusammenbaus und der Auflösung regulatorischer Komplexe (Sgarra et al. 2005). Des Weiteren sind unter den Interaktionspartnern von HMGA mit Tip49a und Tip49b Proteine, welche an der homologen Rekombination beteiligt sind (Sgarra et al. 2005). Die Hypothese über die Beteiligung von HMGA an rekombinatorischen Prozessen wird auch durch dessen Potential unterstützt *in vitro* an „four-way-junction-DNA“ zu binden (Hill et al. 1999).

Am INF- $\beta$ -Genlocus kommt es zur Interaktion von HMGA1a mit der DNA und Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B, IFN-regulierender Faktor 1 (IRF-1) und Aktivierender Transkriptionsfaktor 2 (ATF-2/cJun). Darüber hinaus wurde dort auch eine Interaktion von HMGA1a-Proteinen untereinander beschrieben. Für diese und die Interaktion mit NF- $\kappa$ B und IRF-1 ist der N-Terminus von HMGA1a unerlässlich, während der C-Terminus die Assoziation mit ATF-2/cJun vermittelt und zusätzlich die Affinität zu NF- $\kappa$ B und IRF-1 erhöht (Yie et al. 1999). Im Laufe der durch HMGA1a aktivierten IFN- $\beta$ -Genexpression kommt es auch zur Rekrutierung des SWI/SNF-Nukleosomenremodelling Komplexes. Der SWI/SNF-Komplex verändert die Nukleosomenstruktur nicht-kovalent und führt somit zu einer vorübergehenden Auflockerung des DNA-Histon-Kontaktes (Hake et al. 2004). Dies führt zur Demaskierung der TATA-Box und zur Bindung des TATA-Box-bindenden Proteins (TBP) und der Transkriptionsmaschinerie (Bianchi et al. 2005). Das Enhanceosomen-Model der Transkriptionsaktivierung des INF- $\beta$ -Gens zeigt deutlich, wie wichtig die kooperative Interaktion zwischen regulatorischen Proteinen, wie HMGA1 und dem Transkriptionsapparat ist.

### 1.3.4 Die Dynamik des Chromatins

Anfangs wurde angenommen, dass Chromatin von eher statischer Natur sei. Mit der Nutzung fluoreszierender Proteine und konfokaler *in vivo*-Mikroskopietechnik änderte sich dieses Bild. Die Interaktion von Proteinen mit dem Chromatin *in vivo* ist ein hoch dynamischer Prozess. Fotobleichtechniken, wie Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) demonstrierten, dass die meisten Chromatinproteine innerhalb des Säugerzellkerns hoch dynamisch sind und nur transient mit dem Chromatin interagieren (Kimura et al. 2001; Phair et al. 2004). Eine Ausnahme bilden die Kernhistone mit Verweildauern von mehreren Stunden oder Zellgenerationen (Kimura 2005; Meshorer et al. 2006). Linker-Histone weisen beispielsweise eine Verweildauer von 3-4 Minuten auf. HP1 verweilt dagegen lediglich ~5 Sekunden am Euchromatin und ~1 Minute am Heterochromatin (Cheutin et al. 2003; Lever et al. 2000; Misteli et al. 2000). HMGN-Proteine bleiben für ~30 Sekunden am Chromatin gebunden (Phair et al. 2000).

HMGA-Proteine weisen in Eu- und Heterochromatin unterschiedliche Dynamiken auf. Im Euchromatin zeigt HMGA1a eine Verweildauer von ~23 Sekunden. Im Heterochromatin steigt diese auf ~37 Sekunden und in Metaphasechromosomen sogar auf ~57 Sekunden an, was zeigt, dass Heterochromatin trotz seiner kompakten Struktur eine hohe Dynamik aufweist (Harrer et al. 2004).

Während Differenzierungsprozessen unterliegt die Chromatindynamik Veränderungen. Wichtige Chromatinarchitektur-Proteine sind in Stammzellen lediglich locker mit dem Chromatin assoziiert, während sie in vorprogrammierten oder differenzierten Zellen stabiler gebunden sind (Meshorer et al. 2006).

Die Stabilität des gesamten Chromatins und die korrekte Steuerung von zellulären und entwicklungsspezifischen Programmen unterliegt diesen dynamischen Prozessen, in welchen HMGA1 eine entscheidende Rolle spielt (Catez et al. 2006; Hiragami et al. 2005; Hock et al. 2007).

### **1.4 Aufgabenstellung**

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, besitzen die HMGA-Proteine eine wichtige Funktion bei der Festlegung des Entwicklungsschicksals während der Differenzierung (Caron et al. 2005; Hock et al. 2007). In dieser Arbeit sollte der Einfluss von HMGA auf einem definierten Entwicklungsprozess analysiert werden. Aufgrund ihrer Funktion als Architekturproteine des Chromatins, sollten mit Hilfe von EGFP-Fusionsproteinen ihre Rolle in der Zusammensetzung und Dynamik des Chromatins während des Differenzierungsprozesses *in vivo* beleuchtet werden. Dabei galt es die Auswirkungen auf die Expression differenzierungsrelevanter Gene, potentielle Interaktionen mit weiteren Chromatinproteinen und mögliche Veränderungen von Chromatinmodifikationen und epigenetischen Regulationsmechanismen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sollte diese Arbeit sowohl den globalen, als auch den detaillierten Einfluss von HMGA-Proteinen auf die Topologie, Stabilität und Plastizität des Heterochromatins aufdecken.

## 2 Material

### 2.1 Enzyme

Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, New England Biolabs
Taq-DNA-Polymerase	Promega, AG Seibel
Pfu-DNA-Polymerase	Promega, AG Seibel
Phusion Polymerase	New England Biolabs
Klenow-Fragment	MBI Fermentas
T4-Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas
Micrococcus-Nuklease	MBI Fermentas
Proteinase-K	Applichem
Reverse Transkriptase MMULV	Promega
Terminale Transferase	MBI Fermentas
T7-RNA-Polymerase	Roche
Ribonuklease Inhibitor	MBI Fermentas
RNase A	Serva
DNase I	Roche
Trypsin	Gibco/Invitrogen Life Technologies

### 2.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide für die spezifische Amplifikation von cDNA-Fragmenten wurden bei der Firma Thermo Electron beziehungsweise bei Biomers bestellt. Der für die Reverse Transkription verwendete Oligo(dT)-Primer wurde von der Firma Promega oder MBI Fermentas bezogen. Alle verwendeten Primer sind im Anhang (8.3) detailliert aufgelistet.

### 2.3 Größenstandards

#### 2.3.1 DNA

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Plus MBI Fermentas
Lambda DNA/EcoRI+HindIII, Marker 3	MBI Fermentas
Myo-PB-Marker	eigene Herstellung

#### 2.3.2 Protein

Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas
Prestained Protein Molecular Weight	Marker MBI Fermentas

## 2.4 Kits

ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
DIG RNA Labeling Mix, 10x conc.	Roche
ECL™ Detection Kit	Amersham Pharmacia Biotech
E.Z.N.A Plasmid Mini Präp Kit I	PEQLAB Biotechnologie GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit®	Qiagen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System	Promega

## 2.5 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien und Lösungsmittel in Analysequalität von folgenden Firmen bezogen:

Applichem  
Merck  
Roth  
Serva  
Sigma

## 2.6 Geräte

Biophotometer	Eppendorf
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus-Holding
Drystar Geltrockner	H. Hölzel GmbH
Feinwaage Mettler AC 100	Mettler
Flachbett-Scanner, X-Finity Pro 42	Quatographic AG
Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo HB050 mit Quecksilberlampe	Zeiss
Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SP2/AOBS	Leica Lasertechnik GmbH
Gewebekulturschalen	Corning
Heizblock Liebisch	Hartenstein

## Material

---

Homogenisator RW20 Janke & Kunkel	Hartenstein
Kippschüttler WS5	Laborgerätebau Edmund Bühler
Kühlzentrifuge Minifuge T	Heraeus
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments
Laborwaage Mettler PJ 3600 DeltaRange®	Mettler
Magnetrührer M35	GLW
Proteingelkammer Mini Protean II	BIO-RAD
Blotkammer Mini Trans Blot	BIO-RAD
pH-Meter WTW pH521	Hartenstein
Pipetten	Novoglas
Sequenzierer ABI PRISM <sup>™</sup> TR310 Genetic Analyser	
Perkin Elmer,	Applied Biotems GmbH
Sonifier B12	Branson Sonic Power Company
Stabilisiertes Netzgerät 500 V 1 A	Dipl. Ing. L. Fischer
Sterile Bank Steril GARD Hood Class III	Müller Labortechnik
The Denley Mixer A257, Multi Axle Rotator	Hartenstein
Thermocycler TECHNE PROGENE	Thermo-Dux
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
UV-Stratalinker	Stratagene Europe
Vortex L24	GLW
Wasserbad WTH 500	Hartenstein

### 3 Methoden

#### 3.1 Mikrobiologische Methoden

##### 3.1.1 Flüssigkultur von Bakterien

###### Lösungen:

- LB-Medium (1 L):
  - 10 g Trypton (AppliChem)
  - 5 g Hefe Extrakt (AppliChem)
  - 5 g NaCl (AppliChem)
  - pH 7,4 (NaOH)

Das LB-Medium wurde autoklaviert und unmittelbar vor Gebrauch mit dem gewünschten Antibiotikum versetzt.

###### Verwendete Antibiotika-Stammlösungen:

Antibiotikum	Stammlösung	Lösungsmittel	Lagerung	Arbeitskonzentration
Ampicillin (Natriumsalz)	50 mg/ml	H <sub>2</sub> O	4°C	50 µg/ml (1:1000)
Kanamycin	50 mg/ml	H <sub>2</sub> O	4°C	50 µg/ml (1:1000)
Tetracyclin	5 mg/ml	EtOH	-20°C	50 µg/ml (1:100)

###### Durchführung:

Für eine Übernachtskultur wurde der gewünschte Klon mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Agarplatte oder aus einer Glycerinkultur gepickt und in 10-20 ml LB-Medium in einem 50 ml-Röhrchen oder in 5-7 ml LB-Medium in einem 15 ml-Röhrchen bei 37°C über Nacht geschüttelt. Je nach Resistenz des kultivierten Klons wurde dem Medium ein Selektions-Antibiotikum zugesetzt. Für Flüssigkulturen mit größerem Volumen wurde wie beschrieben eine Übernachtskultur von 20 ml angesetzt und am nächsten Tag 200-400 ml Medium mit 10-20 ml der Übernachtskultur angeimpft.

##### 3.1.2 Fotometrische Bestimmung der Bakteriendicht einer Flüssigkultur

Zur Bestimmung der Bakteriendichte in einer Flüssigkultur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm fotometrisch (Eppendorf Photometer) ermittelt. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm  $8 \cdot 10^8$  Zellen/ml. Als Nullwert wurde nicht angeimpftes LB-Medium verwendet.

### 3.1.3 Glycerinkulturen

Für langfristige Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dafür wurden 800 µl Bakteriensuspension mit 600 µl Glycerin in einem Eppendorfgefäß sorgfältig vermischt und bei -70°C gelagert.

### 3.1.4 Bakterienkultur auf LB-Agarplatten

Für die Herstellung von ~20 Agarplatten wurden zu 500 ml LB-Medium 1,5% Agar (AppliChem) zugegeben und die Mischung autoklaviert. Nachdem der flüssige Agar auf etwa 50°C abgekühlt war, wurde Kanamycin (50 µg/ml) oder Ampicillin (50-70 µg/ml) zugegeben. Nach Vermischen wurde der Agar in sterile Petrischalen gegossen, und der Boden gleichmäßig bedeckt. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Platten umgedreht, um zu verhindern, dass Kondenswasser auf den Nährboden tropft und über Nacht bei RT zum Trocknen aufbewahrt. Zur kurzfristigen Lagerung (3-4 Wochen) wurden die Platten bei 4°C gelagert. Um aus einer Flüssigkultur eine Plattenkultur herzustellen, wurden 100-200 µl Kultur auf die Platte pipettiert und mit einem sterilen Drygalski-Spatel ausgestrichen.

### 3.1.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Transformation rekombinanter Plasmide benötigt man kompetente Bakterien, das heißt Bakterien, die die Fähigkeit besitzen, DNA aus ihrer Umwelt aufzunehmen. Neben natürlich vorkommenden kompetenten Bakterienarten, gibt es die Möglichkeit, Bakterien durch Behandlung mit chemischen Substanzen kompetent zu machen. Das Prinzip der Kompetenzbildung beruht auf einer Modifikation der Lipiddoppelschicht, die das Bakterium umgibt.

#### Lösungen:

- LB-Medium
- TSS: 10% PEG-3000 oder PEG-4000  
3% DMSO  
40 mM MgCl<sub>2</sub>

#### Durchführung:

Zur Herstellung kompetenter Bakterien des *E. coli*-Stammes XL1-blue wurden 2x 200 ml LB-Medium in einem 250 ml Erlenmeyer-Kolben mit je 10 ml Flüssigkultur (3.1.1) angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von ~0,3-0,4 bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde danach in 50 ml-Röhrchen bei 1000 g und 4°C 10 min pelletiert.

Die weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das Pellet wurde bei 4°C (Kühlraum) in 1/80 (2,5 ml) des Ausgangsvolumens (200 ml) eiskaltem TSS aufgenommen, zu je 100 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -70°C.

### 3.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

#### Lösungen:

- SOC-Medium (1 L):
  - 950 ml ddH<sub>2</sub>O
  - 20 g Trypton (AppliChem)
  - 5 g Hefe-Extrakt (AppliChem)
  - 0,5 g NaCl (Applichem)
  - pH 7,0 (NaOH)

Dem SOC-Medium wurden nach dem Autoklavieren in kaltem Zustand 5 ml einer 2 M MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung und 20 ml einer 1 M Glucose-Stammlösung zugegeben. Das komplettierte SOC-Medium wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

#### Durchführung:

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter Bakterien wurde mit 100-150 ng Plasmid-DNA oder einem kompletten Ligationsansatz (3.3.16.2) vermischt. Der Ansatz wurde 1 h auf Eis inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurden 900 µl SOC-Medium zugegeben und das Gefäß 1 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden zwei Verdünnungen auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen. Zunächst wurden 100 µl entnommen und ausgestrichen (<sup>1</sup>/<sub>10</sub>), der Rest wurde bei 3000 rpm für 2 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ~100 µl abgenommen, in denen das Pellet resuspendiert wurde. Diese wurden auf einer zweiten Platte ausgestrichen (<sup>9</sup>/<sub>10</sub>).

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Auftauen von Zellen

#### Durchführung:

Das für die Zelllinie verwendete Kulturmedium wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das aus dem Stickstoffbehälter entnommene Kryoröhrchen wurde vorsichtig im Wasserbad so lange aufgetaut, bis sich der noch gefrorene Rest herauslösen ließ. Anschließend wurde der Inhalt in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Medium gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei ~1000 rpm für 5 min (Universal/K2S; Hettich). Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem, vorgewärmtem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine TC25-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dem Anwachsen der Zellen wurde das Kulturmedium gewechselt, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen. Dem Zellwachstum entsprechend erfolgte das Passagieren.

### 3.2.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Die Kultivierung von Zellen wurde unter Einhaltung aller Sicherheitsmaßnahmen bei keimarmen Bedingungen durchgeführt. Das Zellwachstum wurde mit Hilfe eines Inversmikroskops mit Phasenkontrasteinrichtung überprüft. Grundsätzlich gelten die in Tabelle 3-1 angegebenen Richtwerte für die verwendeten Kulturgefäße.

**Tab. 3-1: Werte zu verwendeten Zellkulturflaschen und verwendete Volumina an Medium, PBS und Trypsin**

Gefäß	Fläche (mm <sup>2</sup> )	Zelldichte bei Konfluenz	Wachstums-Medium (ml)	PBS (ml)	Trypsin (ml)
TC25 (Flasche)	2500	$2,8 \cdot 10^6$	5	2	1
35 mm	962	$1,2 \cdot 10^6$	2,5	1	0,5
60 mm	2827	$3,2 \cdot 10^6$	5	2	1
100 mm	7854	$8,0 \cdot 10^6$	10	4	2
150 mm	17671	$20,0 \cdot 10^6$	20	6	4

Die Anzahl der Zellen bei Konfluenz war abhängig von den jeweiligen Zelltypen, die angegebenen Werte beziehen sich auf HepG2-Zellen.

## Lösungen

- PBS pH 7,4 (3.3.1), autoklaviert und vorgewärmt
- Zellkulturmedium, 37°C (Angaben zu den Zelllinien-spezifischen Medien sind im Anhang zu finden)
- Trypsin-EDTA-Lösung (0,06% Trypsin; 0,53 mM EDTA): 0,6 g Trypsin und 0,2 g EDTA wurden mit PBS auf ein Volumen von 1 Liter aufgefüllt und anschließend steril filtriert.

## Durchführung:

Die Zellen wurden bei einer optischen Konfluenz von ~70-95% gesplittet (alle 2-3 Tage). Je nach Proliferationsverhalten wurden die Zellen so ausgesät, dass sie nach 2-3 Tagen wieder die Konfluenz erreichten. Dafür wurde zuerst das Zellkulturmedium abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit dem in Tab. 3-1 angegebenen Volumen an warmem PBS gewaschen und mit Trypsinlösung überschichtet. Die Zellen wurden dann je nach Zelltyp etwa 1-3 min bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Durch leichtes Klopfen der Flasche wurde das Ablösen der Zellen unterstützt. In eine frische Flasche wurden inzwischen 4-5 ml Zellkulturmedium vorgelegt. Dann wurden die Zellen mit 5 ml warmem Zellkulturmedium vom Boden der Flasche abgespült und durch das im Medium enthaltene FCS wurde das Trypsin inaktiviert. Die frische Flasche wurde mit der unten angegebenen Menge (Tab. 3-2) der Zellsuspension angeimpft.

Eine Ausnahme beim Passagieren bildeten die 293T-Zellen. Diese wurden ohne die Zugabe von Trypsin nach entfernen des verbrauchten Kulturmediums mittels der Zugabe von frischem Medium von der Kulturschale abgespült, da diese keine feste Anhaftung aufwiesen.

**Tab. 3-2: Volumina und Verdünnungsverhältnisse beim Passagieren von Zellen**

Zelllinie	überführte Zellsuspension (ml)	Verdünnungsverhältnis
C2C12:	0,2-1 ml	(1:30-1:6)
293T:	0,4-1 ml	(1:15-1:6)
HepG2:	0,4-1 ml	(1:15-1:6)
Cos-7:	0,4-1 ml	(1:15-1:6)

### 3.2.3 Differenzierung von C2C12-Zellen

Bei C2C12-Zellen handelt es sich um einen Subklon (Blau et al. 1985) einer Maus-Myoblasten-Zelllinie, die ursprünglich von Yaffe und Saxel (1977) etabliert wurde (Yaffe et al. 1977). Diese Zellen können in Kulturmedium mit 2% Pferdeserum innerhalb weniger Tage zu kontraktile Myotuben differenzieren, welche spezifische Muskelproteine exprimieren.

Die Zugabe von 0,5 µg/ml BMP-2 zum normalen Kultivierungsmedium führt zur Differenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten (Katagiri et al. 1994). Die genaue Medienzusammensetzung der Differenzierungsmedien ist im Anhang (8.1) zu finden.

### 3.2.4 Kryokonservierung von Zellen

#### Lösungen:

- PBS pH7,4 (3.3.1), autoklaviert und vorgewärmt
- Zellkulturmedium, 37°C (siehe Anhang 8.1)
- Trypsin-EDTA-Lösung (3.2.2)
- Einfriermedium: Zellkulturmedium mit 40% FCS und 10% DMSO (siehe Anhang 8.1)

#### Durchführung:

Die Zellen einer 150 mm Schale wurden mittels Trypsin abgelöst (3.2.2) und in 5 ml Medium aufgenommen. Sie wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 12 ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1,8 ml der Suspension wurden dann in ein Kryoröhrchen gefüllt. Die Röhrchen wurden in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox gestellt und diese waagrecht in eine -70°C-Truhe platziert.

Die Einfrierbox bewirkt ein langsames Einfrieren der Zellen (~1°C Temperatursenkung pro 1 h), was die Bildung von tödlichen Kristallen verhindert. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen dann in flüssigem Stickstoff oder bei -70°C gelagert.

### 3.2.5 Transiente Transfektion von Kulturzellen

Transfektion bedeutet das Einbringen von DNA, speziell Expressionsvektoren, in eukaryontische Zellen. Genauso wie bei der Transformation muss die DNA die Zellmembran passieren und kann dann unabhängig von der Transfektionsmethode in den Zellkern gelangen. Dort wird die Information der DNA in mRNA umgesetzt, und es kann zu einer Expression der im Vektor kodierten Gene kommen. Zu den modernen Methoden gehört die Lipofektion, die Transfektion mittels kationischer Liposomen. Dabei wird die DNA in Lipidpartikel eingeschlossen, die dann mit der Zellmembran fusionieren und so die DNA in die Zelle einbringen. Es wurden die Systeme Effectene™ (Qiagen), FuGene® HD (Roche), MATra (IBA) und Transfectin (BioRad) verwendet.

Bei Doppel- oder Tripel-Transfektionen wurden die zu transfizierenden Plasmide in einem 1:1- beziehungsweise 1:1:1-Verhältnis gemischt, wobei die Gesamtmenge der gemischten DNAs den Angaben einer normalen Transfektion in den einzelnen Herstellerprotokollen entsprach.

### 3.2.5.1 Transfektion mit Effectene™

Effectene™ ist ein nicht-liposomales Lipid, welches unter spontaner Mizellenbildung die DNA in Lipidmoleküle hüllt. Nach Herstellerangaben soll dabei keine Größen- und Ladungsvarianz auftreten, wie dies bei liposomalen Transfektionen der Fall ist.

#### Lösungen:

- PBS, pH 7,4 (siehe 3.3.1)
- Zellkulturmedium (siehe Anhang)
- Effectene™, Enhancer, Puffer EC

#### Durchführung:

Für eine Transfektion mit Effectene™ wurde am Vortag in einer 35 mm-Schale, die 4 Deckgläschen enthielt,  $\sim 4 \cdot 10^5$  HepG2- oder Cos-7-Zellen ausgesät. Pro 35 mm-Schale wurden 400 ng DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit Puffer EC auf 100  $\mu$ l aufgefüllt, gemischt und mit 3,2  $\mu$ l Enhancer versetzt. Nach 3-minütiger Inkubation bei RT wurden 10  $\mu$ l Effectene™ zugegeben und vermischt. Während einer weiteren Inkubation von 7 min bei RT wurden die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1600  $\mu$ l Medium überschichtet. Dann konnte die Mischung aus DNA und Transfektionsreagenz mit 600  $\mu$ l Medium versetzt und tropfenweise auf die Zellen pipettiert werden. Die Inkubation mit dem Transfektionsreagenz erfolgte immer über Nacht.

Transfizierte Zellen wurden am nächsten oder übernächsten Tag für weitere Experimente verwendet, ohne dass das Medium zuvor gewechselt wurde. Bei den angewandten Inkubationszeiten konnte keine zelltoxische Wirkung beobachtet werden.

### 3.2.5.2 FuGene® HD (Roche)

FuGene® HD wurde neben Effectene ebenfalls für die Transfektion von HepG2- und Cos-7-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein Transfektionsreagenz auf Lipidbasis.

#### Lösungen:

- Opti-MEM I (Gibco)
- FuGene® HD

#### Durchführung:

Die Zellen wurden wie unter 3.2.5.1 beschrieben am Vortag ausgesät. Für die Transfektion wurden 2  $\mu$ g Plasmid-DNA (bei einer Doppeltransfektion ein Gemisch aus jeweils 1  $\mu$ g pro Plasmid) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 100  $\mu$ l Opti-MEM I gemischt, 3  $\mu$ l FuGene® HD zugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Lösung zur Komplexbildung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden 2 ml frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch den Zellen zugegeben und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.2.5.3 TransFectin (BioRad)

TransFectin wurde ausschließlich zur transienten Transfektion von C2C12-Zellen verwendet. Bei TransFectin handelt es sich um eine Gemisch aus einer kationischen Verbindung und einem Co-Lipid (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine).

#### Lösungen:

- DMEM 1g/L Glucose (ohne Zusätze)
- Kultivierungsmedium
- TransFectin

#### Durchführung

Die Zellen wurden 3.2.5.1 entsprechend ausgesät. Von der zu transfizierenden DNA wurden 2 µg in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, diese mit 500 µl DMEM (1 g/L Glucose) vermischt und anschließend 5 µl TransFectin zugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurde diese Lösung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden 2 ml frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch zu den Zellen gegeben und das ganze über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.2.5.4 MaTRA (IBA)

MATra unterscheidet sich von den konventionellen Transfektionsreagenzien. Hierbei handelt es sich um eine Suspension aus magnetischen Kügelchen, an die sich die DNA im ersten Schritt anlagert. Danach wird dieser komplex mittels eines Magneten, der unterhalb der Kulturschale angebracht wird auf die adhärenen Zellen gezogen und von diesen aufgenommen.

#### Lösungen:

- MATra-A Reagenz
- Serumfreies DMEM (1 g/L Glucose)
- 96-Magnet-Platte (IBA)

#### Durchführung:

Die 293T-Zellen wurden in einer 60 mm-Schale so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion ~60-80% konfluent waren. 6 µg DNA wurden in 1 ml serumfreiem DMEM verdünnt, mit 6 µl MATra-A-Reagenz versetzt und gut gemischt. Die Suspension wurde für 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden auf die 293T-Zellen 5 ml frisches Kulturmedium gegeben. Der DNA-MATra-A-Mix wurde danach zu den Zellen gegeben, durch kreisförmige Bewegungen der Schale verteilt und die Schale senkrecht auf die 96-Magnet-Platte gestellt.

Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Ein Mediumswechsel war nicht erforderlich und zeigte auch keine Unterschiede in der Transfektionsrate.

### 3.2.6 Transfektion von siRNA in C2C12-Zellen

Für siRNA-Knockdown-Experimente wurden 21 bp lange RNA-Oligonukleotide (Biomers) verwendet. Hierzu wurden zwei komplementäre RNA-Oligonukleotide mittels eines Thermocyclers in RNase-freier Lösung annealed und anschließend mit TransFectin (BioRad) in C2C12-Zellen transfiziert. Dabei wurden pro Knockdown-Experiment immer zwei verschiedene 21 bp lange siRNAs eingesetzt, um eine höhere Effizienz des Knock-downs zu gewährleisten.

#### Lösungen:

- ddH<sub>2</sub>O
- RNase Inhibitor (MBI)
- 5x Annealing Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
100 mM NaCl

#### Annealing der RNA-Oligonukleotide

Die getrockneten RNA-Oligonukleotide wurden in ddH<sub>2</sub>O mit 0,4 U/μl RNase-Inhibitor (MBI) so aufgenommen, dass sie jeweils in einer Konzentration von 50 μM vorlagen. Von den Verdünnungen der komplementären RNA-Oligonukleotiden wurden jeweils 30 μl in einem PCR-Reaktionsgefäß zusammen mit 15 μl des 5x Annealing Puffers gemischt. Dabei betrug die Endkonzentration der RNA-Oligonukleotid-Doppelstränge 20 μM. Die Mischung wurde in einem Thermocycler (Peqlab) für 2 min bei 95°C inkubiert und anschließend über 45 min schrittweise auf Raumtemperatur abgekühlt.

Denaturierung	2' bei 95°C	
Abkühlen	95-20 °C über 45-60 min hinweg	80 Zyklen

Die annealten siRNAs wurden bei -20°C gelagert. Ein Aliquot konnte bis zu 5x aufgetaut und wieder eingefroren werden.

#### Transfektion der doppelsträngiger siRNA

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf Deckgläsern in 35 mm-Schalen ausgesät. Für die Transfektion wurden jeweils 2,5 μl der beiden verschiedenen siRNAs gemischt mit 500 μl DMEM (1 g/L Glucose) versetzt und anschließend 5 μl TransFectin zugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurde diese Lösung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden 2 ml frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben.

Anschließend wurde das Transfektionsgemisch zu den Zellen gegeben und das ganze über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Endkonzentration der siRNA betrug 40 nM.

### 3.2.7 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

#### 3.2.7.1 Retrovirale Transduktion von C2C12-Zellen

Zur Herstellung von stabilen Zelllinien wurde ein ecotrophes, retrovirales System verwendet. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus drei Vektoren, die bei transienter Transfektion in die Helfierzelllinie 293T Retroviren produzieren, welche spezifisch Mauszellen infizieren. Aus diesem Grund konnten die Arbeiten unter Sicherheitsstufe S1 durchgeführt werden, da für Mensch und Umwelt keinerlei Gefahr einer Infektion bestand. Die verwendeten Vektoren waren zum einen pczMEE, der die kodierende Sequenz des mausspezifischen, ekotrophen Hüllproteins enthielt, pHIT60 auf dem das gruppenspezifische Antigen (*gag*) und die retrovirale reverse Transkriptase (*pol*) kodiert vorliegt. Des Weiteren diente das Basisplasmid pLIB als Shuttle für die stabil zu integrierenden DNA-Sequenzen, welche in diesen Vektor zuvor eingebracht wurden (3.3.16.2)

#### Lösungen:

- Kulturmedien von C2C12- und 293T-Zellen
- Na-Butyrat (n-Butyric Acid, Sodium Salt, Sigma B-5887), 500 mM Stammlösung in PBS, sterilfiltriert (0,2 µm), Lagerung bei 4°C
- Polybrene (Hexadimethrine Bromide, Sigma H-9268), 800 µg/ml Stammlösung in PBS, sterilfiltriert (0,2 µm), Lagerung bei 4°C
- MATra Transfektionsreagenz (3.2.5.4)

#### Durchführung:

Einen Tag vor der transienten Transfektion wurden  $2 \cdot 10^6$  293T Helfierzellen in einer 60 mm Schale ausgesät. Mittels MATra-A (3.2.5.4) wurde eine Tripel-Transfektion des retroviralen Vektorsystems durchgeführt. Am darauf folgenden Tag wurden 4 ml frisches Kulturmedium zu den 293T-Zellen gegeben und mit 80 µl 500 mM Na-Butyrat Stammlösung versetzt (Endkonzentration: 10 mM).

Nach 8 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das mit Na-Butyrat versetzte Medium abgesaugt und 3,5 ml frisches Kulturmedium zugegeben. Es erfolgte eine weitere Kultivierung der Zellen über Nacht. Für den Folgetag wurden  $\sim 1 \cdot 10^5$  C2C12-Zielzellen in einer 35 mm-Schale mit 4 Deckgläsern angesetzt.

Der Überstand der 293T-Zellen wurde am Folgetag mittels eines 45 µm-Filters steril filtriert und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, welches 30 µl Polyprene-Stammlösung enthielt (Endkonzentration 8 µg/ml). Nach 8 h erfolgte ein weiterer Mediumswechsel bei den C2C12-Zellen, um sie wieder in spezifischem Kultivierungsmedium wachsen zu lassen.

Darauf folgte eine Inkubation über Nacht und in den anschließenden Tagen eine optische Selektion der für EGFP- oder DsRed-Fusionsproteine positiven Zellen (3.2.7.2).

### **3.2.7.2 Selektion stabiler C2C12-Klone**

Nach der Transfektion wurden die C2C12-Zellen so in eine 150 mm-Schale passagiert, dass man zwischen 100 und 500 Zellen in der gesamten Schale hatte. Dies ermöglichte eine Kultivierung, bei der nach einigen Tagen Kolonien aus Einzelklonen herangewachsen waren. Diese Kolonien wurden unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop auf die Fluoreszenz und Lokalisation des Fusionsproteins überprüft. Von positiven Kolonien wurden mittels einer sterilen Pipettenspitze einige Zellen in eine frische 35 mm-Schale überführt und weiterkultiviert. Diese Reinkolonien wurden durch Subkultivierung vergrößert und kryokonserviert (3.2.4).

### **3.2.8 Glucosemessung in Zellkulturüberständen**

#### **Material:**

- Glucosemessgerät: GlucoTouch (LifeScan)
- Glucose-Messstreifen (LifeScan)

#### **Durchführung:**

Zur Messung des Glucosegehalts wurden C2C12- und C2A1a-Zellen in 60 mm-Schalen angesetzt und direkt nach anwachsen der Zellen sowie an den Differenzierungstagen 1, 3, 6 und 9 wurde jeweils 1 ml Zellkulturüberstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. An den Tagen 3 und 6 musste das Differenzierungsmedium gewechselt werden. Zur Messung wurden 12 µl des Überstandes auf die für die Messung vorgesehene Markierung des Glucose-Messstreifens pipettiert. Die gleichmäßige Verteilung des Mediums konnte an der Färbung eines Indikators auf der Rückseite des Messstreifens überprüft werden. Danach wurden die Messstreifen in das Gerät eingeführt, was den Messvorgang automatisch in Gang setzte. Der erhaltene Wert wurde in mg/dL angezeigt. Jeder Differenzierungstag wurde dreimal gemessen und anschließend wurde der Durchschnitt der ermittelten Messwerte berechnet. Die Mittelwerte wurden zusätzlich noch Zellzahl-bereinigt. Hierzu wurden die Zellen nach Entnahme der Messprobe abtrypsiniert und die Anzahl der in der Schale enthaltenen Zellen mit der Neubauer-Zählkammer (3.2.9) bestimmt. Der Mittelwert der Glucosemessungen wurde durch die Zellzahl geteilt und graphisch gegen die Differenzierungstage aufgetragen.

### 3.2.9 Bestimmen der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die geernteten Zellen oder homogenisierten Kerne in einem Standardvolumen von 10 ml (PBS oder WP) zunächst gut suspendiert. Dann wurden 8 µl auf die Neubauer-Zählkammer zwischen die Kammer und das Deckglas pipettiert.

Die Auszählung erfolgte dann unter dem Mikroskop. Im Mittelsteg dieser Kammer sind Zählnetze eingraviert. Diese bestehen aus vier Großquadraten, die jeweils in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Der Abstand zwischen dem gravierten Glassteg und dem aufgelegten eingeschliffenen Deckglas beträgt 0,1 mm. Die Fläche eines Großquadrates beträgt 1 mm<sup>2</sup>, somit ist das Volumen eines Großquadrates 0,1 µl. Es wurden stets vier Großquadrate ausgezählt, wobei darauf zu achten war, dass Zellen, die auf den Begrenzungslinien zwischen den Quadraten lagen, nicht doppelt gezählt wurden. Aus der Anzahl der gezählten Zellen konnte die Zellzahl im Gesamtvolumen mit folgender Gleichung ermittelt werden.

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Ø Zellzahl (aus 4 Großquadraten)} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Ausgangsvolumen}$$

### 3.2.10 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

#### Material:

- BD FACScan cell sorter
- BD FACSTflow™ Hüllstromflüssigkeit
- CellQuest Pro (Analysesoftware)
- PBS, FCS
- EtOH (-20°C), Propidiumjodid (1 mg/ml), RNase (10 mg/ml, Sigma)

#### Durchführung:

Die Zellen wurden in einer 60 mm-Schale ausgesät und bis zur ~80-90% Konfluenz kultiviert. Danach wurden die Zellen von der Schale abgelöst und in PBS ~10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal mit einer vorgewärmten 2%igen FCS-Lösung in PBS wiederholt. Schließlich wurden die Zellen in 1 ml 2% FCS/PBS aufgenommen. Anschließend wurden 3 ml eiskalter Ethanol unter kontinuierlichem Mischen tropfenweise zugegeben und die Zellen 1 h bei 4°C fixiert. Es folgten 2 Waschschrift mit PBS. Das Pellet wurde schließlich in 1 ml PBS aufgenommen. Es wurden 50 µl der Propidiumjodid- und 20 µl RNase-Stammlösung zugegeben und mit den Zellen für 30 min bei 37°C unter schütteln inkubiert. Die Proben wurden bis zur FACS-Messung bei 4°C gelagert.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Isolierung von RNA aus C2C12-Zellen

**Lösungen:**

- peqGOLD TriFAST™ zur Isolierung von RNA, DNA und Proteinen
- Chloroform
- Isopropanol
- PBS (pH 7,6): 140 mM NaCl  
2,6 mM KCl  
6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 75% Ethanol
- ddH<sub>2</sub>O (frisch, autoklaviert)
- RNase Inhibitor (MBI)

peqGOLD TriFast™ ist ein Reagenz für das sukzessive Extrahieren von RNA, DNA und Proteinen aus derselben Probe. Bei der von Chomczynski und Sacchi (1987) entwickelten Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe finden Zell-Lyse und RNA-Extraktion in einem Schritt statt. peqGOLD Tri-Fast™ enthält Guanidinisothiocyanat und Phenol in einphasiger Lösung. Im Anschluss an die Zugabe von Chloroform und darauf folgender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen, wobei die RNA in der oberen wässrigen Phase, die DNA vor allem in der Interphase und die Proteine in der unteren organischen Phase enthalten sind. Die Durchführung erfolgte nach Hersteller-Protokoll wie folgt: Kulturzellen einer 60 mm-Schale, wurden mit PBS gewaschen und mit 1 ml TriFast™ durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette lysiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugegeben, 15 s kräftig geschüttelt und weitere 7 min inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 12000 x g und 4°C. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µl Isopropanol versetzt und nach sorgfältigem Mischen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 12000 g und 4°C für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen (10 min bei 12000 g und 4°C). Das Pellet wurde ~5 min luftgetrocknet und anschließend in 50 µl H<sub>2</sub>O mit 0,4 U/µl RNase Inhibitor aufgenommen.

### 3.3.2 Isolierung von Zellkernen aus Kulturzellen

#### Lösungen:

- Waschpuffer (WP): 10 mM Tris/HCl pH 7,6

#### Durchführung:

C2C12-Zellen wurden diese auf 150 mm-Schalen ausgesät und unter den gewünschten Bedingungen kultiviert. Für die Isolation wurden die Zellen einmal mit Waschpuffer (WP) gewaschen. Danach wurden 5 ml WP in die Kulturschale gegeben, die Zellen mittels eines Zellschabers von der Schale abgelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die restlichen Zellen wurden von der Schale mit weiteren 5 ml WP abgespült und in das 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde 15 min auf Eis inkubiert. Bei diesem Vorgang quellen die Zellen aufgrund des hypotonischen Puffers auf. Mittels eines Glas-Teflon-Homogenisators wurden die Zellen homogenisiert. Unter dem Mikroskop wurde überprüft, ob die Zellkerne freigelegt waren. Wurden die Kerne zur Isolierung von Kernproteinen verwendet, wurde aus dieser 10 ml-Suspension die Gesamtkernzahl mittels Neubauer-Zählkammer (3.2.9) ermittelt. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Kerne entweder zur Isolierung der genomischen DNA (3.3.3), der Kernproteine (3.4.2) oder für einen Micrococcus-Nuklease-Verdau (3.3.10) verwendet

### 3.3.3 Isolierung genomische DNA aus Kulturzellen

#### Lösungen:

- Waschpuffer (WP): 10 mM Tris/HCl pH 7,6
- Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol Mix

Die isolierten Kerne (0) wurden in 50 µl Waschpuffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 100 µl des Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol Mixes zugegeben, der Ansatz 5 min geschüttelt und anschließend 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die obere, wässrige Phase (~40-50 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Danach wurde die DNA gefällt (3.3.17) und in 30-50 µl ddH<sub>2</sub>O (Abhängig von der Pelletgröße) aufgenommen.

### 3.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

#### 3.3.4.1 GTE-System

Eingesetzt wurde diese Methode (Li et al. 1997) vor allem zum schnellen Test von Klonen nach einer Ligation und Transformation oder wenn eine Kolonie-PCR keine schlüssigen Ergebnisse lieferte.

#### *Lösungen:*

- Lösung 1 (GTE-Puffer):
  - 50 mM Glucose
  - 10 mM EDTA
  - 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
  - + 1 Spatelspitze RNase A
  - Lagerung bei 4 °C
- Lösung 2 (Lysispuffer):
  - 0,2 N NaOH
  - 1% SDS (w/v)
- Lösung 3 (Kaliumacetatlösung):
  - 60 ml Kaliumacetatlösung (SL 5 M)
  - 11,5 ml Eisessig
  - 28,5 ml H<sub>2</sub>O bidest.
- 100% Ethanol (p.a., auf Eis vorkühlen)

#### **Durchführung:**

Zunächst wurde vom betreffenden Klon eine 7 ml-Übernachtskultur in LB-Medium hergestellt. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien für 10 min bei 3000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 µl GTE-Puffer aufgenommen und die Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 400 µl Lösung 2 zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Dabei muss die Lösung klar werden. Ist das nicht der Fall, wurde entweder zu viel Bakterienmaterial eingesetzt (führt zu einer stark reduzierten Plasmidmenge am Ende der Präparation), oder es liegt eine Kontamination mit Hefe vor (Geruchstest, einen Tropfen mikroskopieren). Zum Schluss wurden 300 µl Lösung 3 zugegeben und der Ansatz kurz aber kräftig geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm zum Pelletieren des Zelldebris wurden ~750 µl des Überstandes in ein frisches Gefäß überführt und 750 µl eiskaltes Ethanol (100%, p.a.) zugegeben. Beim Abnehmen des Überstandes war darauf zu achten, dass kein ausgefallenes SDS mit verschleppt wurde, weil dies nachfolgende Reaktionen stören könnte. Der Ansatz wurde kurz gemischt und dann 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Bei empfindlichen Restriktionsenzymen ist es empfehlenswert, ein bis zwei Waschschrte mit 75% Ethanol p.a. anzuschließen.

Danach wurde der Überstand abgenommen, das Pellet 5-10 min luftgetrocknet und in 30-100 µl (je nach Pelletgröße) H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde fotometrisch bestimmt.

### **3.3.4.2 Peqlab Plasmid Minipräp Kit I**

Diese Methode ist eine Kombination aus alkalischer Lyse und Adsorption der DNA an ein Silika-Gel unter Hochsalz-Bedingungen. Die DNA wird dabei nicht gefällt, sondern an das Gel gebunden und anschließend mit einem H<sub>2</sub>O eluiert. Die durch diese Methode gewonnene Plasmid-DNA besitzt eine sehr hohe Reinheit und ist somit auch für empfindlichere Reaktionen wie Sequenzierungen und Transfektion von Kulturzellen einsetzbar. Durchgeführt wurde die PEQLAB Plasmid-Mini-Präp nach Herstellerprotokoll, ausgehend von 10 ml Übernachtskultur. Eluiert wurde mit 50 µl doppelt destiliertem H<sub>2</sub>O, was normalerweise zu Konzentrationen zwischen 400 und 1000 ng/µl führte.

### **3.3.5 Fotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen**

Die Konzentration von RNA und DNA in wässriger Lösung wurde durch fotometrische Absorptionsmessung bestimmt. Dabei wird die Nukleinsäurekonzentration bei einer Absorption von 260 nm gemessen. Die Absorption bei 280 nm spiegelt den Anteil der Proteine in der Lösung wider und bei 230 nm liegt die Absorption von Kohlenhydrate, Peptide, Phenol oder aromatische Verbindungen. Die Nukleinsäuren wurden 2:60 in bidestiliertem H<sub>2</sub>O verdünnt, gegen einen entsprechenden Leerwert bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht etwa 40 µg/ml RNA beziehungsweise 50 µg doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis der OD 260/280 beziehungsweise OD 260/230 weist auf die Reinheit der Nukleinsäuren hin. Dabei sollten die Werte bei OD 260/280 bei ~1,8 liegen und bei OD 260/230 bei ~2,2.

### **3.3.6 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)**

Bei der RT-PCR wird isolierte mRNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. cDNA unterscheidet sich von genomischer DNA dadurch, dass sie lediglich aus Exon-Sequenzen besteht, da die Introns bereits durch Spleißen aus der mRNA entfernt wurden. Dabei macht man sich die Polyadenylierung der mRNA zunutze, indem ein Oligo-dT<sub>18</sub> (standardmäßig bestehend aus 18 Deoxy-Thymidinen) aufgrund seiner Komplementarität zum Poly-A-Signal der mRNA an dieses bindet und somit den Ausgangspunkt für die Gegenstrangsynthese durch die Reverse Transkriptase bildet. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Zufalls-Oligos (random primer). Dies ist ein Mix aus Hexanukleotiden mit einer beliebigen Abfolge von 6 Nukleotiden, die ebenfalls an ihre komplementäre Sequenz binden und damit einen Startpunkt für die Gegenstrangsynthese bilden.

### **Pipettierschema:**

Die RNA (1 µg) wurde mit Wasser, in welchen RNase Inhibitor (0,4 U/µl) enthalten waren auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, für 3 min auf 70°C erhitzt. und wieder abkühlen lassen. Danach erfolgte die Zugabe von:

- 1 µl dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)
- 4 µl 5x RT-PCR-Puffer (Promega)
- 1 µl Primer (Oligo-dT<sub>18</sub>, oder random primer) 10 mM je Nukleotid
- 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (Promega) (200 U/µl)

Der Ansatz wurde auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O (mit 0,4 U/µl RNase Inhibitor) aufgefüllt, gut gemischt und in einem Thermocycler 1 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase für 5 min bei 95°C. Für eine PCR-Amplifikation wurde immer 1 µl RT-Reaktion eingesetzt. Die fertige RT-Reaktion konnte über mehrerer Wochen bei 4°C gelagert werden.

## **3.3.7 PCR (polymerase chain reaction)**

### **3.3.7.1 Primerdesign**

PCR-Primer wurden *in silico* unter der Zuhilfenahme folgender Programme durchgeführt: Nach Selektion der gewünschten Primersequenz wurde die Schmelztemperatur des Primers über die Errechnung der physischen Parameter mittels eines von Thermo Scientific ([www.thermohyaid.de/cgi-bin/oligos-new/order.py](http://www.thermohyaid.de/cgi-bin/oligos-new/order.py)) zur Verfügung gestellten Programmes nach der „Nearest Neighbour“ Methode bestimmt. Diese wurde in den meisten Fällen zwischen 55°C und 61°C gewählt. Mit FastPCR (Institute of Biotechnology, Universität Helsinki, Finnland) wurde eine mögliche Primer-Dimerbildung überprüft. Die Sequenzen aller verwendeten Primer sind im Anhang zu finden (8.3)

### **3.3.7.2 Kolonie-PCR**

Um nach der Transformation eines Ligationsansatzes die Bakterienkolonien auf das gewünschte Ligationsprodukt hin untersucht. Hierzu eignet sich die Kolonie-PCR in zweierlei Hinsicht. Sie ist eine schnelle Methode und ermöglicht die Überprüfung der Orientierung des Inserts in einem Plasmid. Letzteres wird durch die Wahl der Primer gewährleistet, wobei einer komplementär zu einem Ende des Inserts und der andere komplementär zur Plasmidsequenz sein muss und bei korrekter Orientierung des Inserts auf dem Gegenstrang liegt. Als Template wurde statt isolierter DNA etwas Bakterienmaterial verwendet.

**Pipettierschema:**

- 0,5 µl dNTP Mix (10 mM je Nukleotid, MBI)
- 0,5 µl 5'-Primer (biomers)
- 0,5 µl 3'-Primer (biomers)
- 2,5 µl 10x Taq-Reaktionspuffer
- 1,5 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,2 µl Taq-Polymerase
- 19,3 ddH<sub>2</sub>O

**Durchführung:**

Zunächst wurde je nach Anzahl der zu testenden Klone ein „Master-Mix“ pipettiert, der auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt wurde (jeweils 25 µl Endvolumen). Die zu testende Bakterienkolonie wurde von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Mit der Pipettenspitze wurde ein Teil des Bakterienmaterials auf eine neue Replika-Agarplatte übertragen und anschließend bei 37°C inkubiert. Der Rest des Bakterienmaterials in der Pipettenspitze wurde mit dem PCR-Ansatz vermischt. Positive Klone wurden für Flüssig- und Glycerinkulturen, sowie DNA-Minipräps verwendet. Das Standardprogramm für den Thermocycler wurde wie folgt eingestellt:

Initiale Denaturierung	5' bei 95°C	} 25 Zyklen
Denaturierung	30'' bei 95°C	
Annealing	30'' Primerspezifischer Annealingtemperatur	
Elongation	1' pro 1000 Basen (Taq) bei 72°C	
Final Elongation	10' bei 72°C	
Kühlung	∞ bei 4-8°C	

Anschließend wurde die PCR-Reaktion auf einem 1%igen Agarosegel auf Produkte in der zu erwartenden Größe überprüft.

**3.3.7.3 Expressions-Test-PCR**

Um die Expression verschiedener Gene (auf mRNA-Ebene) zu testen, wurde aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben (3.3.6). Um die korrekte Herstellung der cDNA zu überprüfen, wurde eine PCR mit Primern gegen das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) durchgeführt und auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Eine gleichmäßige Gapdh-Expression in allen Proben zeigte an, dass die mRNA überall zu gleichen Teilen in cDNA umgeschrieben wurde. Diese cDNA wurde für die Expressionsanalyse spezifischer Gene eingesetzt.

Die Primer für die Expressions-Test-PCR wurden so gewählt, dass das Amplifikat innerhalb der letzten 4000 Nukleotide vor dem Poly-A-Schwanz der mRNA lag, um zu gewährleisten, dass die zu amplifizierende Sequenz auch von der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde.

### **Pipettierschema:**

- 1 µl dNTP Mix (10 mM je Nukleotid, MBI)
- 1 µl 100% DMSO (Roth)
- 0,5 µl 5'-Primer (biomers) (100 pmol)
- 0,5 µl 3'-Primer (biomers) (100 pmol)
- 5 µl 10x Taq-Reaktionspuffer
- 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 µl Taq-Polymerase
- 37,5 µl ddH<sub>2</sub>O

Mit diesem Schema wurde ein Mastermix für 17 Ansätze gemacht, dieser gut gemischt und davon in 15 PCR-Reaktionsgefäße je 49 µl vorgelegt. Zum Schluss wurde je 1 µl der entsprechenden cDNA zugegeben. Das Standardprogramm des Thermocyclers entsprach dem der Kolonie-PCR. Spezifische Primersequenzen und PCR-Bedingungen sind im Anhang aufgelistet (8.1). Die PCR wurde auf einem 1%igen Agarosegel analysiert.

### **3.3.7.4 Phusion-PCR**

Die Phusion-Polymerase vereint Geschwindigkeit und Kontrolle der eingebauten Nukleotide miteinander (High-Fidelity-DNA-Polymerase), da sie eine 5' → 3' DNA-Polymerase-Aktivität und eine 3' → 5' Exonuklease-Aktivität aufweist. Aufgrund dessen wird bei einer PCR unter Verwendung der Phusion-Polymerase ein Produkt mit glatten Enden erzeugt, welches für eine Klonierung verwendet werden konnte. Die Annealingtemperatur konnte bei der Phusion-PCR höher angesetzt werden (bis 3°C über der Primer-Schmelztemperatur), als bei einer PCR mit *Taq*-Polymerase.

### **Material:**

- Phusion.Polymerase 2U/µl (Finnzyme/NEB)
- 5x HF-Puffer
- 100% DMSO

**Pipettierschema:**

10 µl 5x HF-Puffer  
1 µl 10 mM dNTPs  
2,5 µl 5'-Primer (biomers) (10 pmol)  
2,5 µl 3'-Primer (biomers) (10 pmol)  
1,5 µl DMSO  
1 ng Template DNA (Plasmid) oder 1 µl cDNA aus einer RT-PCR (3.3.6)  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 49 µl aufgefüllt  
0,5 µl Phusion-Polymerase (2U/µl)

**PCR:**

Initiale Denaturierung	30'' bei 98°C	} 25-35 Zyklen
Denaturierung	10'' bei 98°C	
Annealing	30'' Primerspezifischer Annealingtemperatur	
Elongation	15-30'' pro 1000 Basen bei 72°C	
Final Elongation	10' bei 72°C	
Kühlung	∞ bei 4-8°C	

Die Wahl der Basiselongationszeit war vom jeweiligen Template abhängig. 15'' wurde für DNA mit geringer Komplexität (Plasmide), 30'' bei cDNA verwendet. Die PCR-Produkt wurden über ein 1%iges Agarosegel aufgereinigt (3.3.15).

**3.3.8 Herstellung methylierter DNA mittels PCR**

Um das Bindungsverhalten von HMGA1a an methylierte DNA zu testen, wurde methylierte DNA-Fragmente von 1954 bp hergestellt. Hierzu wurde die Differentielle Methylierungsdomäne (DMD) aus dem IGF-2-Genlokus mittels Phusion-PCR (3.3.7.4) aus genomischer DNA von C2C12 Zellen amplifiziert. Die Primersequenzen wurden aus Drewell (2002, PMID: 11861904) übernommen. Das PCR-Produkt wurde über ein 1%iges Agarosegel aufgereinigt und in pCR2.1-TOPO<sup>®</sup> ligiert. Positive Klone wurden über Kolonie-PCR (3.3.7.2) ermittelt.

Ausgehend von diesem Plasmid (pDMD-Topo) wurde über PCR unmethylierte, hemimethylierte und vollständig methylierte DNA hergestellt. Dazu wurden einzelne 100 mM dNTPs auf 10 mM verdünnt und anschließend in den in Tab. 3-4 aufgeführten Verhältnissen gemischt:

**Tab. 3-4: Zusammensetzung der dNTP-Kombinationen zur Herstellung methylierter DNA**

Die Angaben beziehen sich auf die Verhältnisse zwischen den einzelnen dNTPs. Dabei entsprach ein Wert von 1 einem pipettierten Volumen von 2,5 µl. Die einzelnen Nukleotid-Stammlösungen (MBI) wurden 1:9 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt und anschließend nach dem unten aufgeführten Schema gemischt.

DNA-Methylierung	dATP	dTTP	dGTP	dCTP	dm <sup>5</sup> CTP
unmethyliert	1	1	1	1	-
hemimethyliert (~50%)	1	1	1	0,5	0,5
methyliert (100%)	1	1	1	-	1

**PCR-Pipettierschema:**

- 1,0 µl dNTP Mix (siehe Tab. 3-4)
- 1,0 µl 5'-Primer (biomers)
- 1,0 µl 3'-Primer (biomers)
- 5,0 µl 10x Taq-Reaktionspuffer
- 3,0 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 µl Taq-Polymerase
- 1,0 µl pDMD-Topo (1 ng/µl)
- 37,5 µl ddH<sub>2</sub>O auffüllen

Das verwendete Thermocycler-Programm wurde ausgehend von 3.3.7.2 modifiziert. Dabei wurden 35 Zyklen für die Amplifikation verwendet. Mit zunehmender dm<sup>5</sup>CTP-Konzentration verringerte sich die Produktmenge, was darauf schließen lässt, dass methyliertes dCTP die Effizienz Polymerase aufgrund seiner Struktur herabsetzt.

Die Amplifikate wurden über Gelextraktion aufgereinigt und für einen Gel-Mobility-Shift-Assay (GMSA) (3.3.9) eingesetzt.

**3.3.9 Gel-mobility-shift-assay (GMSA)****3.3.9.1 Vorbereitung der Proben**

Von den hergestellten, unterschiedlich methylierten *Igf2*-DMD-Fragmente (3.3.8) wurden 400 ng für 15 min mit 0, 100, 250 beziehungsweise 500 ng rekombinantem HMGA1a-His-Tag (hergestellt von Monika Schütz) bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Auftrennung im Acrylamidgel.

### 3.3.9.2 Acrylamid-DNA-Gelelektrophorese für GMSA

Die Auftrennung erfolgte in einem 4%igen Acrylamidgel wahlweise unter kooperativen (Laufpuffer 2x TBE) oder nicht-kooperativen (Laufpuffer 0,2x TBE) Bedingungen. Das Gel wurde analog zu einer SDS-PAGE (siehe 3.3.12) gegossen, jedoch ohne Sammelgel. Als Marker wurde eine 100 bp-Leiter (GeneRuler) verwendet. Das verwendete Acrylamidgel setzte sich wie folgt zusammen:

- 1,25 ml Acrylamid 19:1
- 2 ml 10x TBE
- 6,25 ml ddH<sub>2</sub>O
- 40 µl 10 % APS
- 10 µl TEMED

Vor der Gelelektrophorese wurde für mindestens 30 min auf Eis ein Vorlauf durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte auf Eis der eigentliche Lauf für 2 h bei einer konstanten Spannung von 80 V und einer Stromstärke von 14-15 mA (fällt während des Laufs auf 7-10 mA). Nach der Ethidiumbromid-Färbung (10 min in 100 ml H<sub>2</sub>O bidest. + 10 µl Ethidiumbromid aus einer SL mit 5 mg/ml) konnten die Banden sofort unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Videokamera mit angeschlossenem Videoprinter oder einer Polaroid-Kamera dokumentiert werden.

### 3.3.10 Micrococcus-Nuklease-Verdau von Chromatin

Mit Hilfe der Micrococcus-Nuklease wurde Chromatin aus Zellkernen transfizierter Zellen verdaut, um den Zustand des Chromatins zu überprüfen. Die Micrococcus-Nuklease besitzt die Fähigkeit, DNA zu schneiden. Dies geschieht aber nur an Positionen, an denen die Nuklease freien Zugang hat. Bei intaktem Chromatin entstehen so ca. 146 bp-Fragmente oder ein Vielfaches davon und man kann diese DNA-Fragmente aufgetrennt in einem Agarosegel an einem typischen Leiter-Muster erkennen. Ist das Chromatin aber durch assoziierte Proteine unzugänglicher, z.B. durch die Bindung von Linker-Histon H1, bzw. werden Bereiche zugänglicher, zum Beispiel durch Bindung von HMGN-Proteinen, die das Chromatin auflockern, kann man im Vergleich zu einem „wildtypischen“ ein verändertes Verdauungsmuster erkennen.

### 3.3.10.1 Micrococcus-Nuklease-Verdau

#### Lösungen:

- Waschpuffer 10 mM Tris/HCl  
15 mM NaCl  
60 mM KCl  
0,5 mM Spermidine  
0,15 mM Spermine  
1 mM PMSF (SL 200 mM in MetOH; vor Gebrauch zugeben)
- Waschpuffer + 1 mM CaCl<sub>2</sub>
- Verdaupuffer: Waschpuffer + 1 mM CaCl<sub>2</sub> + 1,5 U/μl MNase (MBI, 300 U/μl)
- Stopplösung: 80 mM Tris/Cl pH 8,0  
80 mM EDTA  
2 % SDS
- RNase-Lösung 10 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O
- Proteinase K-Lösung 10 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

Nach der Homogenisation wurden die Kerne bei 1000 x g pelletiert, in 250 μl Waschpuffer resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Kerne wurden 1 x mit Waschpuffer gewaschen und 1 x mit Waschpuffer + 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Danach wurden die Kerne jeweils für 10 min bei 8000 rpm in der Kühlzentrifuge pelletiert und schließlich so in Verdaupuffer aufgenommen, dass in 25 μl 500 000 Zellkerne waren. Bei den Waschschrritten gingen oft sehr viele Kerne verloren. Deshalb sollte man sehr sorgfältig pipettieren und die Größe des Pellets beobachten. Pro Ansatz wurden fünf 25 μl-Aliquots pipettiert und der Verdau jeweils nach 1, 4, 8 und 16 min gestoppt. Um mehrere Verdaus parallel laufen zu lassen, wurde eine Liste angelegt, in der notiert wurde, zu welchem Zeitpunkt ein Verdau gestartet wurde. Zeitversetzt wurden dann die anderen Verdaus gestartet und gemäß der Liste auch abgestoppt. Der Verdau wurde beendet durch die Zugabe von 1 Volumen Stopplösung. Der Ansatz wurde gut gemischt und dann mit 1 μl RNase-Lösung versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Danach wurden 2,5 μl einer Proteinase K-Lösung zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert.

### 3.3.10.2 Phenol-Chloroform-Extraktion des MNase-Verdaus

Die Proben wurden mit 200 μl eines fertigen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (BD Biosciences) versetzt und 5 min geschüttelt. Dann wurde 5 min bei 12000 rpm in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA.

### **3.3.10.3 Fällung des MNase-Verdaus**

Die Fällung erfolgte nach Standardprotokoll durch Zugabe von 10 % (Endkonzentration) 3 M Natriumacetat (pH 4,9) und 2,5 Volumen 100% EtOH (p.a.). Der Ansatz wurde gut gemischt und über Nacht bei -20°C gelagert. Anschließend wurde bei 13000 rpm 20 min in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das weiße, poröse Pellet wurde 2 x mit 75%igem EtOH p.a. gewaschen und schließlich in 10 µl 1x EcoRI-Restriktionspuffer aufgenommen.

### **3.3.10.4 Gelelektrophorese des MNase-Verdaus**

Die gefällte DNA, gelöst in 1x EcoRI-Restriktionspuffer wurde mit  $\frac{1}{6}$  6x DNA-Laufpuffer versetzt und in einem 1%igen Agarosegel ohne Ethidiumbromid aufgetrennt.

### **3.3.11 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an definierten Sequenzen Hydrolysieren und somit zu einem Doppelstrangbruch der DNA an dieser spezifischen Stelle führen. Abhängig vom Enzym entstehen dabei glatte (blunt), oder kohäsive (sticky) Enden. Die überhängenden Enden können sich wieder mit komplementären Sequenzen, die vom selben Enzym geschnitten wurden, zusammenlagern, was man in Ligationsreaktionen nutzt.

#### **Standard-Ansatz (Gesamtvolumen 20 µl):**

- 2-3 µg Plasmid-DNA
- 2 µl 10x Restriktions-Puffer (MBI)
- 1 µl Restriktionsenzym (MBI)
- mit dd H<sub>2</sub>O auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt

Sollte ein Plasmid gleichzeitig mit zwei Enzymen verdaut werden wurde zuerst ein geeigneter Puffer ermittelt, der beiden Enzymen eine möglichst hohe Aktivität ermöglichte. Der Hydrolyseansatz wurde wie oben beschrieben pipettiert unter Zugabe beider Enzyme.

Bei Verwendung eines größeren Volumens an DNA-Suspension wurde der Ansatz entsprechend aufgestockt. Nach sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz, 1-3 h bei 37°C inkubiert (es war auch eine Restriktion über Nacht möglich) und dann in einem 1%igen Agarose-Gel analysiert.

Handelte es sich bei der DNA um ein linearisiertes Plasmid, welches später für die Ligation eingesetzt wurde, wurde in den letzten 30 min des Restriktionsverdaus eine Dephosphorylierungsreaktion (3.3.16) eingeschlossen. Dazu wurde der Verdau mit 6x Beladungspuffer vermischt, dass dieser einfach konzentriert vorlag und das gewünschte Volumen auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in SB-Puffer für 10-15 min bei 200-400 V (konstant).

### 3.3.12 Auffüllen von Restriktionsschnittstellen mit 5'-Überhängen und Entfernen von 3'-Überhängen

Das große Fragment der E.coli-DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) ermöglicht es, durch seine 5'-3'-Polymerase-Aktivität den zum 5'-Überhang komplementären Strang aufzufüllen, oder einen 3'-Überhang durch seine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität zu entfernen. Dadurch erhält man „glatte“ Enden für eine blunt-Ligation.

#### Standard-Ansatz (20 µl):

- 100 ng bis 3 µg DNA
- 2 µl 10x Klenow-Puffer (MBI)
- 0,5 µl dNTPs (Mix, 10 mM je Nukleotid, MBI) Zugabe lediglich bei Auffüllreaktionen
- 0,5 µl Klenow-Enzym (10 U/µl, MBI)
- mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 20 µl auffüllen

#### Durchführung:

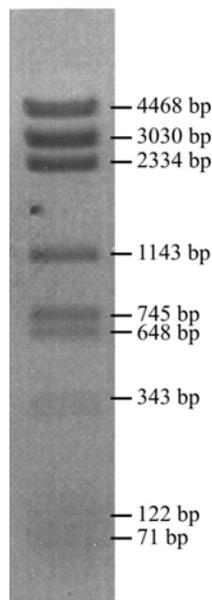
Der Ansatz wurde gemischt, 30 min bei 37°C inkubiert und 10 min bei 70°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde die DNA über ein Agarosegel aufgetrennt und durch Gelextraktion wieder gewonnen.

### 3.3.13 Herstellung des DNA-Größenstandards MyoBP

Hierzu wurde das Plasmid pZF\_MyoD\_5/TO (von Toni Wagner, Physiologische Chemie, Würzburg) mittels einer GTE-Plasmidpräp (3.3.4.1) aus einer Bakterienflüssigkultur isoliert. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde photometrisch bestimmt und die Lösung auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Die DNA eines Ansatzes wurde mit Hilfe der Reastriktionsendonuklease *Bgl*II, die des anderen mit *Pvu*II über Nacht hydrolysiert (3.3.11). Dabei wurde pro 100 µg Plasmid-DNA 1 µl Restriktionsenzym (10 U/µl) eingesetzt. Danach wurden von jedem Ansatz 2 µl gemischt und davon 1 µl beziehungsweise 2 µl jeweils auf 10 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt, mit 2 µl 6x Beladungspuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel auf einen vollständigen Verdau getestet. Dabei wurde gleichzeitig das später aufzutragende Volumen an DNA-Lösung festgelegt.

Nach diesem Test wurden die Restriktionsenzyme für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert und die beiden Reaktionen 1:1 gemischt, und entsprechend dem festgelegten Volumen für die Verwendung mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Am Ende wurde 1/6 Volumen des 6x Ultra Fast-Puffers zugegeben. Die MyoBP-Ladder wurde bei 4°C gelagert. In der Gelelektrophorese wurden standardmäßig 5-8 µl der MyoBP-Ladder verwendet.

### MyoPB-Ladder



**Abb. 3-1: MyoBP-DNA-Ladder**

Von der MyoBP-Ladder wurden zwischen 6 und 8  $\mu$ l pro Spur aufgetragen.

### 3.3.14 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

#### DNA-Beladungspuffer für die Gelelektrophorese

Der kommerzielle DNA-Beladungspuffer Marker III ( $\lambda$  EcoRI/HindIII, MBI) mit Bromphenolblau und Xylencyanol wurde zur optischen Quantifizierung von DNA-Fragmenten im Gel herangezogen. Die cDNAs der meisten HMG-Proteine haben eine Länge zwischen 300 und 500 Basenpaaren und laufen genau im selben Bereich des Gels wie Bromphenolblau (läuft bei  $\sim$  300 bp im 1%igen Agarosegel). Das ist störend beim Fotografieren der Gele und auch bei der Gelextraktion. Anstelle des Bromphenolblaus wurde deshalb Orange G verwendet (6x Ultra Fast), das etwa auf einer Höhe von 50 Basenpaaren läuft. Es kann gut zur Markierung der Lauffront eingesetzt werden.

#### 6x Ultra Fast-Beladungspuffer

- 6x DNA-Beladungspuffer: 60% Glycerin  
30% 0,2 M EDTA  
10% ddH<sub>2</sub>O
- 4% Orange G (in 6x Beladungspuffer gelöst)

### **Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese**

Nukleinsäuren besitzen bei neutralem pH negative Ladungen an ihren Phosphatgruppen. Deshalb wandern sie im elektrischen Feld auf die positiv geladene Elektrode zu. Als Matrix für die Wanderung dient ein Agarose-Gel, das die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe auftrennt. Die Trennschärfe eines Gels hängt davon ab, wie porös die Matrix ist. Je weniger Agarose für die Herstellung des Gels verwendet wurde, umso größere Poren besitzt das Gel.

Große Fragmente werden stärker zurückgehalten als kleine. In den meisten Laboratorien werden standardmäßig TBE- oder TAE-Puffer verwendet. Eine effizientere Auftrennung wird jedoch durch die Verwendung des SB-Puffers (siehe unten) erreicht.

#### **Lösungen:**

- 20x SB-Stammlösung: 10 mM NaOH (Plätzchen) (8 g/L) (AppliChem)  
pH 8,0-8,5 mit Borsäure eingestellt (~50 g/L) (AppliChem)
- Laufpuffer: 1x SB-Puffer
- 6x DNA-Beladungspuffer
- Ethidiumbromid-Stammlösung 10 mg/ml (Serva)

#### **Durchführung:**

Standardmäßig wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Dafür wurde pro Gel 0,5 g Agarose (Peqlab) in 50 ml SB-Puffer über dem Bunsenbrenner aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen (~40 °C) des Gels unter ständigem Schwenken wurden 2 µl Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben und vermischt. Der Gelschlitten wurde mittels Klebeband abgedichtet und mit einem Kamm versehen. Danach wurde das Gel in den Schlitten gegossen und gewartet, bis es polymerisiert war.

Die aufzutragende DNA wurde mit 1/6 Volumen des 6xBeladungspuffers gemischt und das gewünschte Volumen auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde entweder der Marker III von MBI oder die selbst hergestellte MyoBP-Ladder (3.3.13) verwendet.

### **3.3.15 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die an die dabei eingesetzten Säulen gebundene DNA wurde mittels 50 µl ddH<sub>2</sub>O in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert. Die DNA-Konzentration der eluierten Fragmente wurde über ein 1%iges Agarosegel unter Verwendung des Größenstandards Marker III (MBI) optisch abgeschätzt.

### **3.3.16 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren**

#### **3.3.16.1 pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> und pDrive**

Der Vektor pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> ist Teil eines Kits, das eine schnelle Klonierung Taq-amplifizierter PCR-Produkte erlaubt. Der Plasmid-Vektor liegt im linearisierten Zustand vor und besitzt als besondere Merkmale einzelsträngige 3'-Thymidin-Überhänge, sowie das kovalent an den Vektor gebundene Enzym Topoisomerase I. Taq-Polymerase hat eine terminale-Transferase-Aktivität, welche dazu führt, dass an die 3'-Enden von PCR-Produkten Desoxyadenosin-Überhänge angefügt werden. Diese können effizient mit den Thymidinüberhängen des Vektors ligieren.

Gleichzeitig wird die Fähigkeit der Topoisomerase genutzt, Insert mit Vektor kovalent zu verbinden, sowie den geschnittenen Vektor in einem „aktivierten“ Zustand zu halten. Der pDrive-Vektor basiert ebenfalls auf dem TA-Klonierungsprinzip, kommt aber ohne die Topoisomerase aus und besitzt 3'-Uridin-Überhänge.

Diese Vektoren wurden verwendet, um PCR-Produkte direkt oder nach Aufreinigung zu klonieren. Aufgrund der in beiden Vektoren enthaltenen Restriktionsschnittstellen eigneten sie sich ideal für Zwischenklonierungen, um deren Insert von dort aus in verschiedene andere Plasmide zu ligieren.

Die Ligation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und anschließend wurde der komplette Ligationsansatz in kompetente *E. coli* XL1-blue transformiert (3.1.6).

#### **3.3.16.2 Klonierung in Expressionsvektoren**

##### **Isolierung von Vektor und Insert**

Für Klonierungen von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren wurden die Vektoren zuvor mit der gewünschten Restriktionsendonuklease linearisiert (3.3.11). Das Insert entstammte entweder einem Restriktionsverdau eines bereits vorhandenen Plasmides (blunt oder sticky), einer PCR (blunt), oder einem Restriktionsverdau eines aufgereinigten PCR-Produktes (sticky). Der Vektor wurde nach der Linearisierung dephosphoryliert (siehe unten). Grundsätzlich wurden das zu klonierende Insert und der Vektor vor der Ligation aus einem 1%igen Agarosegel extrahiert (3.3.15).

##### **Phosphorylierung des Inserts**

Nach einem Restriktionsverdau sind die 5'-Enden des Inserts bereits mit Phosphatgruppen versehen, welche für die kovalente Bindung an die 3'-OH-Gruppe des Vektors bei der Ligation benötigt werden. Ein PCR-Produkt besitzt aufgrund der nicht-phosphorylierten Primer keine 5'-Phosphatgruppen. Diese werden unter Verwendung der T4-Polynukleotidkinase von ATP auf die 5'-Enden des PCR-Produktes übertragen.

### **Standard-Ansatz:**

- 150-300 ng aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1 µl ATP (10 mM)
- 1 µl 10x PNK-Puffer (MBI)
- 1 µl T4-Polynukleotidkinase (PNK) (MBI)
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl auffüllen

Bei Bedarf wurde das Ansatzvolumen angepasst. Der Ansatz wurde gut gemischt, abzentrifugiert und bei 37°C für 30 min im Wasserbad inkubiert. Danach wurde das Enzym 10 min bei 70°C hitzeinaktiviert und komplett für einen Ligationsansatz eingesetzt.

### **Dephosphorylierung der Plasmid-DNA**

Nach einer Linearisierung von Plasmid-DNA liegen die Restriktionsschnittstellen noch mit einer 5'-Phosphatgruppe vor. Dies würde bei einer anschließenden Ligation zu einer Autoligation des Vektors, ohne eine Integration des Inserts führen. Um dies zu verhindern mussten linearisierte Plasmide dephosphoryliert werden. Dabei wurde das 5'-Phosphat durch die Shrimp alkalische Phosphatase (SAP) entfernt.

### **Standard-Ansatz:**

- 20 µl Restriktions-Ansatz
- 0,5 µl 10x SAP-Puffer (MBI)
- 1µl Shrimp alkalische Phosphatase (SAP) (MBI)
- 3,5 µl ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließens 15 min bei 70°C hitzeinaktiviert. Darauf folgte eine Gelextraktion des linearisierten Plasmids. Anschließend wurde die DNA-Konzentration des extrahierten Plasmides unter Zuhilfenahme des Markers III (MBI) optisch in einem Agarosegel abgeschätzt.

### **Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren**

#### **Standard-Ansatz:**

- 150-300 ng linearisiertes Plasmid
- 150-300 ng Insert
- 2 µl 10x T4-Ligase-Puffer (MBI)
- 1 µl T4-Ligase (MBI)
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt

Der Ansatz wurde gut gemischt und 1-2 h bei 22°C (Klimakammer) inkubiert. Bei Ligationen von DNA mit glatten Enden (blunt) wurde der Ansatz über Nacht bei 12-16°C inkubiert, was die Effizienz der Ligation verbesserte. Danach wurde der Ligationsansatz vollständig in kompetente *E. coli* XL1-blue transformiert (3.1.6) und die erhaltenen Klone wurden am nächsten Tag mittels Kolonie-PCR (3.3.7.2) analysiert.

### **3.3.17 Präzipitation von DNA**

Manchmal war es nötig DNA aus einer wässrigen Lösung zu präzipitieren (Fällung), um zum Beispiel Salze eines Puffers zu entfernen. Für eine Fällung wurde die DNA-Lösung zunächst mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Dann wurden 10% (Endkonzentration) 3 M Natriumacetat pH 4,9 und 3 Volumen eiskaltes 100% Ethanol (p.a.) zugegeben und gut vermischt. Der Fällungsansatz wurde für 30 min bei -70°C inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend 15 min bei 13000 rpm und 4°C in einer Sigma-Tischzentrifuge zentrifugiert. Dabei wurde die DNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2x mit 75% Ethanol (p.a.) sorgfältig gewaschen, um die co-präzipitierten Salze zu entfernen. Die 75%ige Ethanollösung wurde auf das DNA-Pellet pipettiert und 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand wiederum verworfen und die gefällte DNA luftgetrocknet (ca. 10 min). Anschließend konnte das Pellet in der gewünschten Menge ddH<sub>2</sub>O oder entsprechendem Puffer aufgenommen werden.

### **3.3.18 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem 1977 entwickelten Prinzip nach Sanger und Coulson durchgeführt (Sanger et al. 1977). Sie beruht auf der enzymatischen Synthese von DNA-Strängen, die nach dem Einbau eines fluoreszenzmarkierten Dideoxy-Nukleosid-Triphosphat (ddNTP) abgebrochen wird. Die zu sequenzierende DNA wurde mittels des Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits und PCR linear amplifiziert, wobei durch den Kettenabbruch Fragmente unterschiedlicher Länge entstanden. Mittels eines Kapillarsequenziergerätes (ABI) wurden diese Fragmente ihrer Größe nach in einem Kapillargelsystem aufgetrennt. Die fluoreszenzmarkierten ddNTPs wurden durch einen Laser angeregt und die Emissionswellenlänge der Farbstoffe über ein Fotoelement detektiert.

#### **Lösungen:**

- Sequenzier-Premix: BigDye (Applied Biosystems)
- Template Suppression Reagent (TSR) (Perkin Elmer Biosystems) oder HiDi (Applied Biosystems)

**Pipettierschema:**

- 300-400 ng Plasmid-DNA
- 2 µl BigDye
- 50 pmol Primer
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt
- 200 ng Plasmid-DNA
- 5µl HiDi premix
- 50 pmol Primer
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt

Der Ansatz wurde gemischt und eine PCR nach folgendem Schema durchgeführt:

Initiale Denaturierung	2' bei 96°C	} 25 Zyklen
Denaturierung	30'' bei 96°C	
Annealing	15'' Primerspezifischer Annealingtemperatur	
Elongation	4' bei 60°C	
Kühlung	∞ bei 4-8°C	

Die DNA aus der Sequenzier-PCR wurde wie unter (3.3.17) beschrieben präzipitiert. Einmal mit 75% Ethanol für 10 min bei 13000 rpm gewaschen, kurz an der Luft getrocknet (5-10 min) und anschließend in 25 µl TSR beziehungsweise HiDi aufgenommen. In TSR musste der Ansatz 2 min bei 90°C inkubiert werden. In HiDi wurde die Lösung mindestens 1 h bei Raumtemperatur gelagert und dabei mehrmals mittels Laborschüttler (Vortex) gut durchgemischt. Anschließend wurde die Lösung in ein Sequenziergefäß überführt und bei 4°C bis zur Sequenzierung gelagert.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte *in silico* mit Hilfe des BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

### 3.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.4.1 Probenherstellung von Gesamtzellen für eine SDS-Gelelektrophorese

**Lösungen:**

- Trypsin-EDTA-Lösung (0,06% Trypsin; 0,53 mM EDTA)
- SDS-Probenpuffer: 10 mM Tris/HCl pH6,8  
10% Glycerin (v/v)  
1% SDS (w/v)  
25 mM  $\beta$ -Merkaptoethanol  
Eine Spatelspitze Bromphenolblau

**Durchführung:**

Um Proteine aus Gesamtzellen für die Westernblot-Analyse zu erhalten, wurden Zellen einer 150 mm-Schale einmal in PBS gewaschen und anschließend mit 4 ml Trypsin von der Schale gelöst. Um das Trypsin zu inaktivieren wurden, nachdem sich die Zellen gelöst hatten 8 ml Kulturmedium zugegeben. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1000 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurde die Gesamtzellzahl bestimmt (3.2.9), während die Zellen erneut pelletiert wurden. Das Pellet wurde mit einer Konzentration von  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen/ $\mu$ l in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Da die DNA im SDS-Polyacrylamidgel das Laufverhalten der Proteine nachhaltig beeinflussen und zu einem Schmier (shift) kommen würde wurde diese durch mehrmalig alternierendes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und wieder Auftauen bei 95°C fragmentiert. Für ein SDS-Polyacrylamidgel wurden von dieser Proteinsuspension 6  $\mu$ l pro Spur (entspricht  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen) aufgetragen. Bei zu hoher Viskosität wurden die Zellen im doppelten Volumen SDS-Probenpuffer aufgenommen und daraus resultierend 12  $\mu$ l/Spur auf das Gel aufgetragen.

#### 3.4.2 Probenherstellung aus isolierten Zellkernen für eine SDS-Gelelektrophorese

Das Pellet der isolierten Zellkerne (0) wurde in SDS-Probenpuffer so resuspendiert, dass die Konzentration  $2,5 \cdot 10^4$  Kerne/ $\mu$ l Probenpuffer betrug. Die Proben wurden wie unter 3.4.1 beschrieben mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut, um die DNA zu fragmentieren. Von einer Probe wurden standardmäßig 6  $\mu$ l pro Spur (entsprach  $1,5 \cdot 10^5$  Kernen) in der SDS-PAGE eingesetzt.

### 3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

#### Lösungen:

- Lösung A: 30% Acrylamid (4K; 37,5:1 Mix)
- Lösung B: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (Trenngelpuffer)
- Lösung C: 10% SDS
- Lösung D: 0,5 M Tris/HCl, pH6,8 (Sammelgelpuffer)
- Laufpuffer (1 L): 6,0 g Tris  
28,8 g Glycin  
1,0 g SDS
- 10% Ammoniumpersulfat (APS)
- TEMED (AppliChem)

#### Durchführung:

Für die Auftrennung von Proteinen wurden 18%ige Trenngele verwendet. Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels betrug immer 6%. Für die Gelelektrophorese wurde das System „MiniProtean II“ (BioRad) verwendet. Das System beinhaltet einen Gießstand, in dem das Gel gegossen werden kann, ohne dass man vorher die Glasplatten, zwischen die das Gel gegossen wird, abdichten muss. Die Glasplatten wurden mit den Spacern fest in eine Halterung geschraubt. Diese Halterung wurde dann in den Gießstand eingespannt. Die Unterseite der Glasplatten wurde nun so auf einen flexiblen Untergrund gedrückt, dass bei korrektem Aufbau nichts auslaufen konnte. Vor dem Gießen des Gels wurde die Apparatur aufgebaut und die Höhe des Trenngels auf den Glasplatten markiert. Das Trenngel wurde so hoch gegossen, dass sich unter den Taschenböden noch etwa 0,5 bis 1 cm Sammelgel befand. Die in Tabelle 3-5 angegebenen Mengen waren ausreichend für 2 Minigele.

**Tab. 3-5: Pipettierschema zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamid-Gels**

Trenngel		Sammelgel	
Lösung A	4,5 ml	Lösung A	1,5 ml
Lösung B	5,0 ml	Lösung D	2,55 ml
Lösung C	100 µl	Lösung C	100 µl
APS	100 µl	APS	100 µl
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl
H <sub>2</sub> O	300 µl	H <sub>2</sub> O	5,8 ml

Die Lösungen wurden in ein 15 ml Plastikröhrchen pipettiert, wobei zuletzt APS und TEMED zugegeben wurden, welche die Polymerisation starten.

Die Gellösung wurde sorgfältig gemischt und mit einer Pasteurpipette etwa 3 mm bis über die Markierung für die Höhe des Trenngels gegossen. Danach wurde sofort mit destilliertem Wasser überschichtet, da die Polymerisation am besten unter Luftabschluss abläuft. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Sammelgel konnte vorbereitet werden. Das Sammelgel wurde mit einer Pasteurpipette auf das Trenngel gegossen und dann der Kamm eingesetzt. Nach ~30 min wurde das Gel im Elektrophoretank mit Puffer überschichtet und beladen. Die Proteinproben wurden vor jedem Beladen 5 min bei 95°C erhitzt. Als Größenstandards wurden der „Protein Molecular Weight Marker“ oder der „Prestained Molecular Weight Marker“ (beide von MBI) verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte für 1,5 bis 2 h bei 100-120 V (U konstant). Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Danach wurde das Gel geblottet.

### 3.4.4 Färbung von SDS-Gelen

#### Lösungen:

- PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas)

#### Durchführung:

Um nach einem Westernblot die Effizienz des Proteintransfers zu überprüfen, konnte das SDS-Polyacrylamidgel nachträglich angefärbt werden. Dazu wurde das Gel ~30 min in PageBlue bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert und anschließend zweimal 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen.

### 3.4.5 Westernblot und enhanced chemiluminescence (ECL)

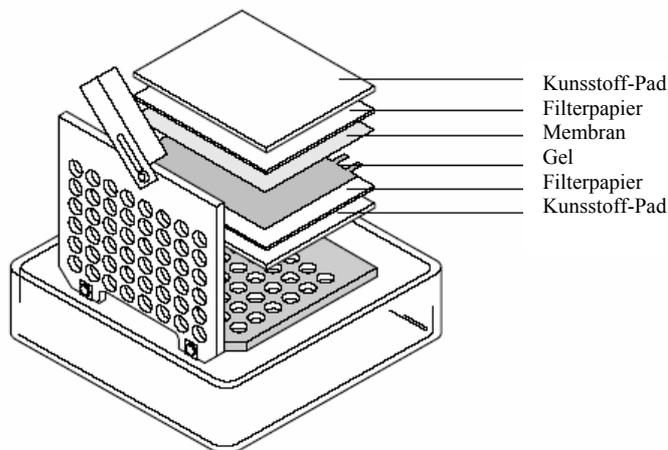
#### Material:

- Blottingpuffer: 10 mM CAPS, 10% Methanol; pH 11,0
- TBS: 150 mM NaCl  
10 mM Tris/HCl, pH 7,4
- TBST: TBS + 0,1% Tween-20
- Absättigungslösung: 3% BSA in TBST pH 7,4-7,6  
5% Milch in TBST pH 7,4-7,6
- Ponceau S (Applichem)
- ECL-Lösungen von PerkinElmer oder Amersham Biosciences
- Röntgenfilme (AGFA)

### **Durchführung:**

Das Sammelgel wurde mit Hilfe eines Filterpapiers entfernt. Das Trenngel wurde ~10 min in Blottingpuffer inkubiert. Währenddessen konnten Nitrozellulose und Whatmanpapier mit Hilfe einer Schablone auf Gelgröße zugeschnitten werden. Der Western Blot wurde im Mini-TransBlot-System der Firma BioRad durchgeführt. Es konnten 2 Gele gleichzeitig geblottet werden. Whatmanpapier und Nitrozellulose wurden mit Blottingpuffer getränkt, dann wurde der Blot wie in Abbildung 3-1 gezeigt aufgebaut.

Das Gel wurde verkehrt herum auf das untere Whatman gelegt, damit die Reihenfolge der Banden im Blot anschließend der auf dem Gel entspricht. Luftblasen wurden mit Hilfe eines Corex-Röhrchens aus dem Aufbau gedrückt. Das Sandwich wurde in die Blotkammer gegeben und die Kammer mit Blottingpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte 45-60 min bei 50 V (U konstant) und ~170 mA. Danach wurde der Blot abgebaut und die Nitrozellulose gut mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Der Transfer wurde durch eine Färbung mit Ponceau S überprüft. Dazu wurde der Blot in einer Glasküvette mit Ponceau S bedeckt und kurz unter Schütteln inkubiert (1-2 min). Ungebundenes Ponceau S wurde mit ddH<sub>2</sub>O abgespült. Die Markerbanden wurden mit einem weichen Bleistift markiert. Die gefärbte Membran wurde in einer Klarsichtfolie mittels eines Flachbettscanners eingescannt und anschließend dreimal 10 min in TBST gewaschen. Danach wurde der Blot in Absättigungslösung 1 h bei RT abgesättigt. Der Blot wurde erneut dreimal 10 min in TBST gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in entweder in 5% Milch/TBST oder 3% BSA/TBST verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C. Bei vielen polyklonalen Seren war es vorteilhaft, die Antikörper vor der Inkubation mit dem Blot für 20-30 min vorzuinkubieren. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Antikörper, deren Verdünnungen und Anwendungsbedingungen befinden sich im Anhang. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde der Blot dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Danach folgte je nach verwendetem Primärantikörper ein zweiter Absättigungsschritt in 5% Milch/TBST bei RT für 20-30 min. Die Absättigungslösung wurde dann gegen den in 5% Milch/TBST verdünnten Zweitantikörper ausgetauscht, der an Peroxidase gekoppelt war. Darin wurde der Blot 1,5 h bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Blot wiederum dreimal 10 min mit TBST gewaschen und konnte dann mit Hilfe von ECL (enhanced chemiluminescence) entwickelt werden. Hierzu wurde jeweils 0,4-1 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 in einer Plastikschaale vermischt und der Blot damit benetzt. Nach 2 min wurde der Blot mit einer Pinzette aus der Lösung genommen, abgetropft und faltenfrei in eine Klarsichthülle eingeschlagen. Er wurde in eine Bleikassette gelegt und ein Stück Röntgenfilm (AGFA) aufgelegt. Die Expositionszeit war abhängig vom verwendeten spezifischen Antikörper und betrug wenige Sekunden bis zu mehrere Stunden. Die Röntgenfilme wurden 3 min im Entwicklerbad entwickelt, kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend 3 min fixiert. Anschließend wurde der Film nochmals gut mit Wasser gespült und zum Trocknen aufgehängt. Für die Erstellung von Abbildungen wurden die Filme eingescannt und mit dem Programm Adobe Photoshop bearbeitet.



**Abb. 3-1: Aufbau des Blot-Sandwiches**

Westernblot mit dem Mini TransBlot-System (BioRad).

### 3.4.6 Strippen eines Westernblots

#### Lösungen:

- Strip-Puffer (50 ml): 100 mM Tris/HCl pH 6,7  
1 g SDS (entspricht 2%)  
390  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol
- TBS oder TBST (3.4.5)

#### Durchführung:

Der Blot wurde zunächst gut in TBST gewaschen, dann genau 30 min bei 50°C in Strip-Puffer inkubiert. Anschließend wurde der Blot sehr gründlich mit Wasser und TBST gewaschen (mindestens 1 h). Danach konnte der Blot erneut abgesättigt und mit einem neuen Antikörper hybridisiert werden.

## 3.5 Mikroskopie

### 3.5.1 Herstellung von Lebend-Beobachtungskammern

Um lebende Zellen an einem aufrechten Fluoreszenz- oder dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) zu beobachten, wurden Lebend-Beobachtungskammern hergestellt. Dazu wurde zunächst auf einen Objektträger mit Folienstift der Umriss eines Deckgläschens gezeichnet. Dieser Objektträger diente als Vorlage. Auf diese Vorlage wurden weitere Objektträger gelegt und dann mit Fixogum (ein elastischer Montagekleber der Firma Marabu) ein an einer Seite offener Ring mit der Größe eines Deckgläschens aufgetragen. Zur besseren Dosierung des Fixogum wurde eine abgeschnittene gelbe Spitze auf die Fixogum-Tube gesteckt. Nach einer Trockenzeit von 5-10 min konnten die Kammern benutzt werden. Dazu wurde ein tropfen Kulturmedium in die Mitte des gehärteten Fixogum-Ringes pipettiert und das zu beobachtende Deckgläschen auf den Ring gesetzt.

Um Das Deckglas wurde anschließend mit Fixogum abgedichtet. So konnten die Zellen für 30-45 min lebend mikroskopiert werden.

### **3.5.2 Detektion von alkalischer Phosphatase in Kulturzellen**

Als Marker für Differenzierung von C2C12-Zellen in Osteoblasten wurde die Expression von alkalischer Phosphatase (AP) überprüft. Das Enzym setzt 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP) in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) in einen violetten Farbstoff um. Dieser Farbumschlag wurde verwendet, um AP-positive Zellen zu detektieren.

#### **Lösungen:**

- PBS
- 2% Formaldehyd in PBS
- ALP-Puffer: 100 mM Tris/HCl pH9,5  
100 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>
- NBT (100 mg/ml in 70% Dimethylformamid (DMF)) (Roche)
- BCIP (50 mg/ml Dimethylformamid (DMF)) (Roche)
- Mowiol: 10 g Mowiol (HOECHST, Frankfurt) in 40 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-freiem PBS (pH 8,0) 16 h rühren; 20 ml Glycerin zugeben und nochmals 16 h rühren; ungelöste Partikel abzentrifugieren und Überstand aliquotiert bei -20°C aufbewahren.

#### **Durchführung:**

Die Zellen wuchsen auf Deckgläsern und wurden vor der Färbung 5 min in PBS gewaschen, dann 15 min in 2% Formaldehyd fixiert und danach zweimal 5 min in ALP-Puffer gewaschen. Die Färbelösung bestand aus 1 ml ALP-Puffer mit 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP. 30 µl dieser Färbelösung wurden auf jedes Deckglas gegeben und für ~5-10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine violette Färbung zu erkennen war. Die Zellen wurden wieder zweimal 5 min in PBS gewaschen und anschließend in einem Tropfen Mowiol auf Objektträgern eingebettet.

### 3.5.3 Immunlokalisation an Kulturzellen

#### Lösungen:

- PBS pH 7,6 (3.3.1)
- 2% Formaldehyd in PBS
- 0,1-0,5% Triton X-100 in PBS
- 100 mM Glycin in PBS
- Primärantikörper in PBS (Verdünnung und Konditionen siehe Anhang)
- Sekundärantikörper in PBS (Verdünnung und Konditionen siehe Anhang)
- Hoechst 33258 (Stammlösung: 10 mg/ml; Arbeitskonzentration: 20 µg/ml)
- Mowiol (3.5.2)

#### Durchführung:

##### 3.5.3.1 Fixierung, Permeabilisierung und Absättigung

Auf Deckgläschen kultivierte Zellen wurden 5 min in PBS gewaschen und dann für 15 min bei Raumtemperatur in 2% Formaldehyd in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut 5 min in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen folgte eine Inkubation mit einer 0,1-0,5% Tritonlösung in PBS für 5-15 min (Abhängig vom Zelltyp, siehe unten).

Zelllinie	Tritonkonzentration	Inkubation
C2C12	0,1-0,2% Triton/PBS	15 min bei RT
HepG2	0,5% Triton/PBS	5-7 min auf Eis

Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift für 5 min in PBS und optional eine Inkubation für 10 min in 100 mM Glycin, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und ein letzter Waschschrift.

##### 3.5.3.2 Antikörperinkubation

Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die Deckgläschen mit 25-30 µl Primärantikörper (in PBS) entweder 45 min bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimal 5 min in PBS wurde der Sekundärantikörper (in PBS) für 20-30 min bei RT appliziert. Bei Antikörpern mit starkem Hintergrundsignal konnte dieses durch einen zweiten Absättigungsschritt für 10 min in 100 mM Glycin verringert werden. Zu dem Sekundärantikörper wurden 10 µl Hoechst 33258 (20 µg/ml; 1:500 verdünnte Stammlösung) zugegeben, durch Schwenken verteilt und die Deckgläser weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach einmal 5 min in PBS wurden die Deckgläschen auf der Rückseite abgetrocknet um die Bildung einer störenden Salzkruste zu verhindern und anschließend in einem Tropfen Mowiol auf einem Objektträger eingebettet.

### 3.5.4 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)

Das von Tom Kerppola's Labor entwickelte Prinzip von BiFC ist die Verbindung zweier nicht fluoreszierender Fragmente eines Fluorophors, welche sich anschließend zu dem funktionellen, fluoreszierenden Fluorophor falten. Diese beiden Fluorophorfragmente werden mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert und eine Interaktion der beiden Proteine führt dazu, dass die Fluorophore in so engen Kontakt kommen, dass sie sich in ~60 sec zusammenlagern und einen intermediären Komplex bilden. Dieser reift in einem Zeitraum von ~50 min zum funktionellen Fluorophor. Dieser Prozess tritt in Konkurrenz mit alternativen Interaktionspartnern (endogene Proteine) auf, die sich gegenseitig ausschließen können (Kerppola 2006). Unter normalen Umständen ist die Bildung dieser Komplexe aus Interaktionspartnern irreversibel.

Die spektralen Charakteristiken des Bimolekularen Fluoreszenzkomplexes sind von denen des intakten Fluoreszenzproteins nicht voneinander zu unterscheiden. Fluoreszenzprotein-Fragmente, die nicht mit komplementären Fragmenten assoziiert sind, unterlaufen eine irreversibel falsche Faltung. Somit kann kein unspezifisches Signal aufgrund nicht gebundener Fusionsproteine entstehen. Das BiFC-System wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um Enzym-Substrat-Komplexe (Ubiquitin-Ligasen und Kinasen), den Einfluss von Interaktionen innerhalb von Signalkaskaden und die Rekrutierung von Proteinkomplexen zu verschiedenen Orten in der Zelle zu visualisieren (Kerppola 2006). Das BiFC-System besteht aus den zwei Plasmiden pBiFC-YN-155 und pBiFC-YC155. Die Vektorkarten sind auf der beigelegten CD zu finden. pBiFC-YN-155 besitzt vor der „multiple cloning site“ (MCS) einen Flag-Tag, der pBiFC-YC155 einen Hämagglutinin (HA)-Tag. Diese ermöglichen eine Immunlokalisation der Fusionsproteine innerhalb der transfizierten Zellen, um Transfektionseffizienz und relatives Expressionslevel der beiden potentiellen Interaktionspartner festzustellen.

#### Lösungen:

- Antikörper:
  - anti-HA (Ratte)
  - anti-Ratte-Cy5
  - anti-Flag (Maus)
  - anti-Maus-TexasRed

#### Durchführung:

Am Tag vor der Transfektion wurden HepG2-Zellen in 35 mm-Schalen auf 4 Deckgläsern (12 mm) ausgesät. Die zu transfizierenden Plasmidkombinationen (1 mg pro Plasmid) Eppendorf-Reaktionsgefäß sorgfältig gemischt (DNA-Menge insgesamt: 2 µg). Dieses Gemisch wurde wie unter 3.2.5.2 beschrieben mittels FuGene® (Roche) transfiziert und die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden 2 Deckgläser für Lebendbeobachtungen präpariert.

Die anderen beiden Deckgläser wurden fixiert und permeabilisiert wie unter 3.5.3 beschrieben. Danach erfolgte die Immunlokalisation der Flag- und HA-markierten Fusionsproteine nach folgendem Kurzprotokoll:

- 45 min Ratte anti-HA-Tag-Antikörper (1:50 in PBS)
- 2x 5 min PBS
- 45 min anti-Ratte-Cy5 (1:100)
- 2x 5 min PBS
- 45 min Maus anti-Flag-Tag (1:1000 in PBS)
- 2x 5 min PBS
- 35 min anti-Maus-TexasRed (1:100 in PBS)
- 10 min Hoechst 33258 (20 µg/ml)
- 2x 5 min PBS

Danach wurden die Deckgläschen auf der Rückseite abgetrocknet um die Bildung einer störenden Salzkruste zu verhindern und in einem Tropfen Mowiol auf einem Objektträger eingebettet.

### **3.5.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie**

Um ein höher auflösendes Bild über Proteinlokalisationen, zu bekommen wurden sowohl lebende Zellen, wie auch Immunfluoreszenzen mit einem Leica TCS SP2/AOBS Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Dies ermöglichte optische Schnitte durch die einzelnen Zellen zu legen. Dabei wurden folgende Einstellungen der Software standardmäßig verwendet:

- HCX Pl APO lbd.Bl. 63x 1.4 Ölimmersionsobjektiv
- Scangeschwindigkeit: 800 mW
- Pinhole: 1 AE
- Strahlenexpander: 6
- Zoom: 2x für Übersichten, 4x für einzelne Zellen
- Anzahl der Scans pro Bild: 6
- Argon-Laser-Level: Drehknopf stets auf ~10 Uhr eingestellt

**Tabelle 3-6: Verwendete Laserlinien und Einstellungen der Photomultiplier**

Detektion:	Laser	Laser Power	PMT-Detektionsbereich (nm)
Hoechst 33258 (PMT1)	405 nm (Diode)	25 %	410-550 nm
EGFP (PMT1)	488 nm (Argon)	25 %	500-580 nm
mRFP / TexasRed (PMT2)	561 nm (Diode)	50 %	570-680 nm
Cy5 (PMT2)	633 nm (HeNe)	50 %	650-750 nm
BiFC (YFP) (PMT1)	488 nm (Argon)	50 %	525-560 nm (525-600 nm in lebenden Zellen)
Interferenzkontrast (PMT Trans)	+ 488 nm	20 %	

Die Aufnahmen erfolgten im „sequential scan“-Modus, bei welchem jeweils spezifisch ein Fluorochrom angeregt wurde, um einen Nebensignaleffekt (crosstalk) der einzelnen Detektionskanäle zu vermeiden.

### 3.5.6 Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

FRAP ist eine Methode, die es ermöglicht, die Dynamik fluoreszenzmarkierter Proteine *in vivo* zu untersuchen. Dazu wird das markierte Protein in einer definierten Region mit einem intensiven Laserstrahl irreversibel ausgebleicht und die Erholung der Fluoreszenz in diesem Punkt beobachtet. Handelt es sich um ein mobiles Protein, werden die gebleichten Proteinmoleküle schnell durch fluoreszierende Proteinmoleküle aus der Umgebung ersetzt. Wurde dagegen ein immobiles Protein gebleicht, das lange an seinen Bindungsstellen sitzt, können die gebleichten Moleküle nicht durch fluoreszierende Moleküle ersetzt werden. Die Erholung der Fluoreszenz im Bleichpunkt ist also niedrig.

#### Durchführung:

Für FRAP-Messungen vorgesehene HepG2-Zellen wurden zwei Tage vor der Messung auf Deckgläser ausgesät und am Vortag der Messung mit FuGene<sup>®</sup> transfiziert (3.2.5.2). Bei FRAPs der stabilen C2C12-Zelllinien wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät und entweder am nächsten Tag in Lebend-Beobachtungskammern (3.5.1) analysiert oder durch Gabe von DM die Muskeldifferenzierung induziert. An dem zu untersuchenden Differenzierungstag erfolgte ebenfalls die FRAP-Analyse. Bei der Untersuchung von weiteren Fusionsprotein-Konstrukten (beispielsweise HP1 $\alpha$ -EGFP) in C2C12-Zellen erfolgte die FRAP-Analyse nach Transfektion der C2C12-Zelllinie mittels TransFectin (Biorad) (3.2.5.3) und der anschließend gewünschten Inkubationsdauer in Kulturmedium oder DM.

Die FRAP-Experimente wurden mit dem in der Leica Software integrierten „FRAP Wizard“ durchgeführt. Die Basiseinstellungen des Mikroskops waren:

- HCX PI APO lbd.Bl. 63x 1.4 Ölimmersionsobjektiv
- Scangeschwindigkeit: 800 mW
- Pinhole: 1 AE
- Strahlenexpander: 3
- Zoom: 8x
- aktivierter Fly-Mode
- Argon-Laser-Level: Drehknopf stets auf ~10 Uhr eingestellt (30-40%)

Innerhalb des Zellkerns wurde die zu untersuchende Fläche ( $\sim 0,8 \mu\text{m}^2$ ) markiert (ROI = region of interest). Beim FRAP wurde zuerst ein einzelner Scan bei 5% Laserpower durchgeführt, um die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen zu messen. Die Intensität wurde so gering gewählt, um ein vorzeitiges ausbleichen des Präparates zu vermeiden. Danach wurde 2-5x für 0,672 ms innerhalb der ROI geblichen.

Danach erfolgten 50-100 Scans (je 0,672 ms), durch welche die Erholung der Fluoreszenz innerhalb der ROI aufgrund der Diffusion von ungebleichten Fusionsproteinen bestimmt werden konnte. Bei FRAP von mRFP-Fusionsproteinen musste aufgrund der geringeren Laserintensität des 561 nm-Lasers im Vergleich zum Argonlaser ein Vergleichs-FRAP mit einem EGFP-Fusionskonstrukt des gleichen Proteins mit 1-2 Bleichschritten durchgeführt werden. Die Messungen wurden in Microsoft Excel übertragen, hintergrundbereinigt (beschrieben in Phair et al. 2000) und aus den Mittelwerten der durchgeführten Messungen wurden die Messkurven erstellt. Die statistische Signifikanz der Werte wurde über den Student's t-test ermittelt (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>).

In Tab. 3-7 auf der folgenden Seite sind die verwendeten Mikroskopeinstellungen bei FRAP-Messungen der einzelnen getesteten Konstrukte dargestellt.

**Tab. 3-7: Mikroskopeinstellungen für FRAP-Messungen**

Dargestellt sind die für die einzelnen fluoreszierenden Fusionsproteine mit ihren spezifisch verwendeten Mikroskopeinstellungen bei den durchgeführten FRAP-Messungen.

Konstrukt	Bleichschritte	Laser beim Bleichen	Laserintensität
HMGA1a-EGFP		458, 476, 488 nm	100%
HP1 $\alpha$ -EGFP		458, 476, 488 nm	100%
HP1 $\alpha$ -mRFP		561 nm	100%
MecP2-EGFP		458, 476, 488 nm	100%
MecP2-mRFP		561 nm	100%

Konstrukt	Post-bleach-Messungen	Laser beim Messen	Laserintensität
HMGA1a-EGFP	50 · 0,672 ms	488 nm	5%
HP1 $\alpha$ -EGFP	100 · 0,672 ms	488 nm	5%
HP1 $\alpha$ -mRFP	100 · 0,672 ms	561 nm	
MecP2-EGFP	100 · 0,672 ms	488 nm	5%
MecP2-mRFP	100 · 0,672 ms	561 nm	

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Einfluss von HMGA1 auf die Differenzierung von C2C12-Zellen**

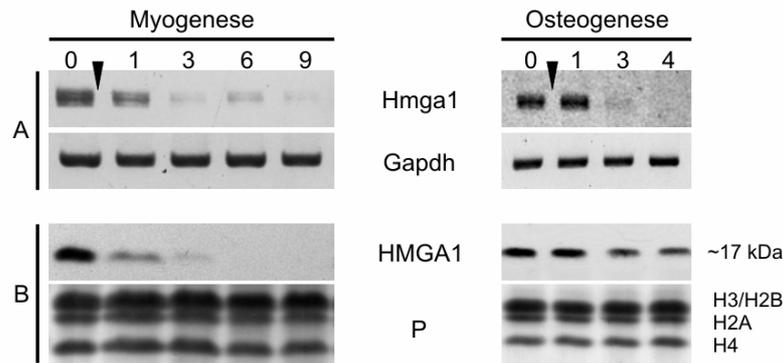
HMGA wird in embryonalen Zellen und Zellen mit teilweise vorprogrammiertem Entwicklungsschicksal exprimiert, dagegen ist es in ausdifferenzierten Zellen kaum oder überhaupt nicht zu detektieren (Fedele et al. 2001; Hock et al. 2006; Sgarra et al. 2004). In dieser Arbeit wurde als Schwerpunkt der Einfluss von HMGA1a auf die Differenzierung, mit speziellem Augenmerk auf der Myogenese, untersucht. Hierzu dienen C2C12 Mausmyoblastenzellen als Modellsystem (Bains et al. 1984; Yaffe et al. 1977). Der Vorteil dieser Zellen liegt darin, dass sie potentiell sowohl in Myotuben, als auch in Osteoblasten differenzieren können und somit eine Betrachtung zwei verschiedener Differenzierungswege ermöglichen. Als erstes wurde die HMGA1-Expression in C2C12-Zellen analysiert.

#### **4.1.1 Abnahme der HMGA1a Expression während der Myogenese und der Osteogenese**

Der Entzug von Wachstumsfaktoren aufgrund der Kultivierung in DMEM-Medium (4500 mg/L Glucose) mit 2% Pferdeserum führt bei C2C12-Zellen zur Induktion der Myogenese (Bains et al. 1984). In diesem Differenzierungsprozess finden die entscheidenden morphologischen Veränderungen an Tag 3 (Zellstreckung), Tag 6 (Zellfusion) und Tag 9 (Myotubenbildung bis hin zum Auftreten kontraktiler Muskelfasern) nach der Induktion statt. Daher wurden die Analysen der Myogenese in Zellen dieser Differenzierungstage und zusätzlich in nicht induzierten Myoblasten (Tag 0) und 24 h nach der Induktion (Tag 1) durchgeführt.

Eine Differenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten wurde durch die Zugabe von 0,5 µg/ml BMP-2 zum Kultivierungsmedium erreicht (Katagiri et al. 1994). Die Zeitpunkte zur Analyse der Osteogenese waren Tag 0 (nicht induziert) und Tag 1, Tag 3 und Tag 4 nach der Induktion.

An den angegebenen Differenzierungstagen der Myogenese und der Osteogenese wurde die HMGA1-Expression auf transkriptioneller und translationaler Ebene untersucht (Abb. 4-1). Dabei erkannten sowohl die PCR-Primer als auch der Antikörper beide Spleißvarianten des HMGA1 (HMGA1a und HMGA1b). Deshalb wird im Folgenden bei endogenem HMGA1 immer auf HMGA1 verwiesen, bei HMGA1a-EGFP dagegen die Isotypenbezeichnung HMGA1a verwendet.



**Abb. 4-1: Abnahme der HMGA1a-Expression in C2C12-Zellen während der Differenzierung**

C2C12-Zellen wurden in 60 mm-Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit DM beziehungsweise 0,5 µg/ml BMP-2 induziert. (A) Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen an den zu untersuchenden Differenzierungstagen isoliert, in cDNA umgeschrieben und diente als Template für eine PCR-Analyse mit spezifischen Primerpaaren für HMGA1 (siehe Anhang 8.3). Die Gapdh-Expression diente als Kontrolle der reversen Transkription. (B) Für die Analyse der HMGA1-Expression auf translationaler Ebene wurden die Zellen in 150 mm-Schalen ausgesät und bei Erreichen von ~80% Konfluenz wurde die Myogenese beziehungsweise Osteogenese induziert. An den unter 4.1.1 angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellkerne aus den Ansätzen isoliert. Aus diesen wurden die Proteinproben gewonnen, welche anschließend elektrophoretisch über ein 18%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Über Westernblot und enhanced chemiluminescence (ECL) wurde HMGA1 mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Ponceau-Färbung der Kernhistone (P) dienen als Beladungskontrolle. Das endogene HMGA1 wurde im Westernblot bei ~17 kDa detektiert. Die schwarzen Pfeile zeigen die Induktion der Differenzierung an.

In C2C12-Myoblasten (Tag 0) zeigten RT-PCR- und Westernblot-Analysen übereinstimmend eine deutliche Expression von HMGA1. Einen Tag nach Induktion der Myogenese kam es zu einer deutlichen Reduktion des mRNA- und Proteinlevels von HMGA1. Im Westernblot war nach drei Tagen lediglich noch eine schwache und an den Differenzierungstagen 6 und 9 keinerlei HMGA1-Expression mehr zu detektieren (Abb. 4-1, B, linke Spalte). Während der BMP-2 induzierten Osteogenese kam es ebenfalls zu einer starken Reduktion der HMGA1-mRNA an Tag 3 und einem Abfallen des Signals unter die Detektionsgrenze an Tag 4 (Abb. 4-1, A, rechte Spalte, Spur 0 und 1). Auf Proteinebene dagegen zeigte sich an diesen beiden Tagen eine geringfügig schwächere aber immer noch detektierbare HMGA1-Expression. Die Analyse der C2C12-Zellen ergab somit eine sukzessive Abnahme der HMGA1a-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene während der Myogenese. In der frühen Osteogenese hingegen blieb bei ebenfalls reduzierter HMGA1-Transkription, der Level der HMGA1-Proteine deutlich über der Detektionsgrenze erhalten. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass die HMGA1-Expression sowohl durch Entzug von Wachstumsfaktoren (Myogenese), als auch durch Induktion mit BMP-2 (Osteogenese) beeinflusst wird und es dabei zu Unterschieden in den beiden Differenzierungslinien kommt. Des Weiteren wurde erstmals die graduelle Abnahme der HMGA1-Expression während der Myogenese gezeigt.

## 4.1.2 Charakterisierung einer HMGA1a-EGFP exprimierenden C2C12-Zelllinie

### 4.1.2.1 Herstellung stabil transfizierter C2C12-Zelllinien

Diese initialen Ergebnisse führten zu der Frage, ob eine anhaltende HMGA1a-Expression auf die Differenzierungsprozesse in C2C12-Zellen Einfluss nimmt. Zu diesem Zweck wurde eine C2C12-Zelllinie etabliert, in welcher die kodierende Sequenz eines HMGA1a-EGFP-Fusionsproteins stabil im Genom integriert wurde. HMGA1a-EGFP-Fusionsproteine sind bezüglich ihres Bindungsverhaltens mit den endogenen HMGA1-Proteinen vergleichbar (Harrer et al. 2004). Ein vorgeschalteter CMV-Promotor gewährleistete die konstitutive Expression des Fusionsproteins. Als Kontrolle wurden weitere stabile C2C12-Zelllinien hergestellt. Eine exprimierte ein HMGA1a-EGFP-Fusionsprotein, dessen drei AT-Hooks durch Punktmutation verändert wurden, was zu einem fast völligen Verlust des DNA-Bindungspotentials des Proteins führt (Harrer et al. 2004). Die zweite Zelllinie enthielt die kodierende Sequenz eines HMGA1a-DsRed-Fusionskonstruktes. Das Fluorophor DsRed bildet in der Zelle Tetramere und führt somit zu einer geringeren Mobilität und einer längeren Verweildauer des HMGA1a-Fusionsproteins an seinen Bindungsstellen im Chromatin. Eine dritte Zelllinie exprimierte ein Histon H3-EGFP-Fusionsprotein, um die Spezifität der konstitutiven HMGA1a-Expression zu kontrollieren. Alle Zelllinien wurden durch retrovirale Transduktion hergestellt. Die retroviralen Vektorkonstrukte wurden kloniert, indem die kodierenden DNA-Sequenzen der einzelnen Proteine aus bereits vorhandenen Fusionsprotein-Vektoren (hergestellt von Monika Schütz) mittels der Phusion-Polymerase amplifiziert und anschließend in einen pLIB-Vektor ligiert wurden (Primer siehe Anhang 8.3; Vektorkarten siehe beiliegende CD). Nach der Transduktion erfolgte die Selektion positiver Klone an einem Fluoreszenzmikroskop und durch Isolierung einzelner Zellklonkolonien. Die erhaltenen Zelllinien und deren Nomenklatur sind in Tab. 4-1 erläutert. Im weiteren Verlauf werden lediglich die Kurzbezeichnungen verwendet.

**Tab. 4-1: Die Nomenklatur der etablierten Zelllinien wurde wie folgt festgelegt:**

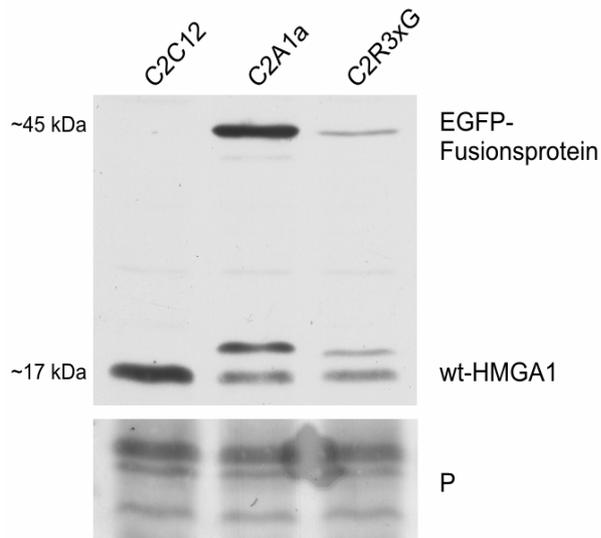
C2C12 Zellen und stabil integrierte Konstrukte	Kurzbezeichnung
C2C12 mit integriertem HMGA1a-EGFP	C2A1a
C2C12 mit integriertem HMGA1a-DsRed	C2A1aDsRed
C2C12 mit integriertem HMGA1a-R3xG-EGFP*	C2R3xG
C2C12 mit integriertem H3-EGFP	C2H3

\* R3xG bezeichnet eine Variante des HMGA1a, bei welcher die drei AT-Hooks durch den Austausch dreier Argininreste durch Glycinreste mutiert wurden (R28G, R60G, R86G), was eine DNA-Bindung des Proteins fast vollständig verhindert (Harrer et al. 2004)

Für die weiteren Untersuchungen wurden im Wesentlichen die C2A1a-Zelllinien genutzt. Gelegentlich wurden zum Vergleich die C2A1aDsRed-Zellen als Kontrolle herangezogen.

#### 4.1.2.2 Stabile HMGA1a-EGFP-Expression in C2C12-Zellen

Um die Expression des endogenen HMGA1 wie auch der HMGA1a-EGFP-Fusionsproteinkonstrukte zu überprüfen, wurden aus Myoblasten Gesamtzell-Proteinproben hergestellt. Anschließend wurden  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen in einem 18%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Transfer der Proteine auf Nitrocellulose mit einem spezifischen Antikörper gegen HMGA1 in einem Immunblot nachgewiesen



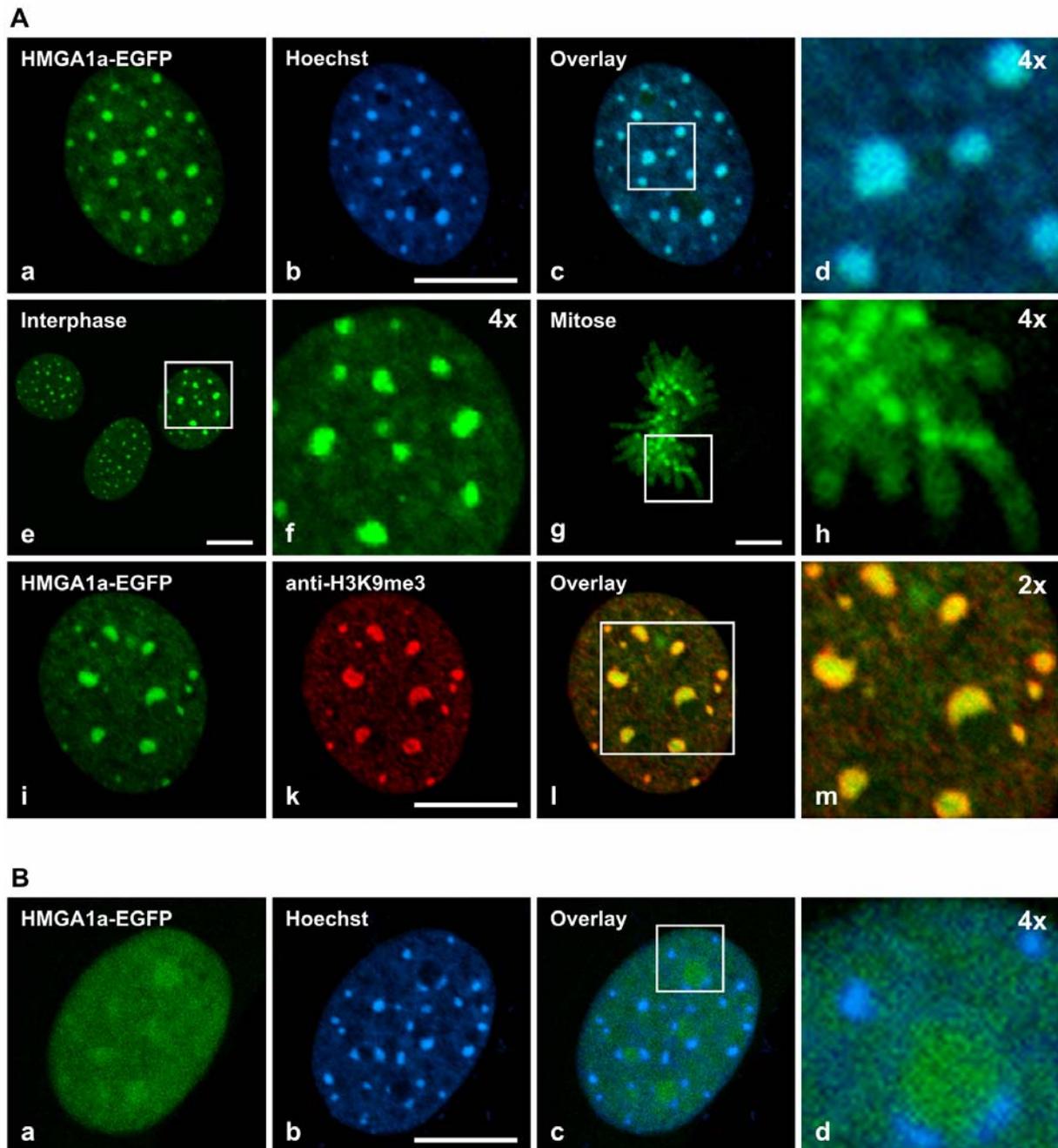
**Abb. 4-2: Expression von EGFP-Fusionsproteinen und endogenem HMGA1 in C2C12- und C2A1a-Zellen**

Pro Spur wurden  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Expression der EGFP-Fusionsproteine und des endogenen HMGA1 mit Hilfe eines HMGA1-spezifischen Antikörpers (Abcam) analysiert. Die apparenten Molekulargewichte sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Über den Spuren sind die analysierten Zelllinien angegeben. Die erste Reihe zeigt die EGFP-Fusionsproteine dargestellt, die zweite das endogene HMGA1 (wt-HMGA1a). Als Beladungskontrolle diente die Ponceaufärbung der nukleosomalen Histone (P).

Die EGFP-Fusionsproteine wurden in C2A1a- und C2R3xG-Myoblasten bei ~45 kDa und das endogene HMGA1 bei ~17 kDa detektiert (Abb. 4-2). Die Banden über dem endogenen HMGA1 resultieren vermutlich aus einer potentiellen Bruchstelle zwischen HMGA1a und dem EGFP durch ein aufeinander folgendes Aspartat (D) und Prolin (P) an der Aminosäure 122 des Fusionsproteins. In dem isolierten C2R3xG-Zellklon wies HMGA1a-R3xG-EGFP eine deutlich geringere Expression auf als HMGA1a-EGFP im isolierten C2A1a-Zellklon. Auffallend war, dass sowohl in C2A1a- als auch in C2R3xG-Zellen das endogene HMGA1 im Vergleich zu den wildtypischen C2C12-Zellen schwächer exprimiert wurde. Dies entspricht früheren Beobachtungen, bei welchen die Expression von exogenen HMGA-Proteinen die Expression endogener HMGA-Proteine beeinflusste (Reeves et al. 2001). Ein densitometrischer Vergleich ergab eine ~2,6-fache HMGA1a-Überexpression in C2A1a-Zellen (vergleiche 4.1.3.1 und Abb. 4-8).

#### 4.1.2.3 Lokalisation der HMGA1a-Fusionsprotein in C2C12-Zellen

Die Expression und Lokalisation der Fusionsproteine wurde in den Zellen mikroskopisch anhand der EGFP-Fluoreszenz überprüft (Abb. 4-3). Hierzu wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät und am darauf folgenden Tag entweder lebend analysiert, oder in 2% Formaldehyd fixiert, um sie zur Färbung der DNA oder für Immunlokalisationen einzusetzen.



**Abb. 4-3: Lokalisation der EGFP-Fusionsproteine in stabilen C2C12-Zelllinien**

(A) HMGA1a-EGFP (a) und die gegengefärbte DNA (Hoechst-33258, b) kolokalisieren in fixierten C2A1a-Zellen (c und d). In lebenden C2A1a-Zellen ist HMGA1a-EGFP in den Chromozentren während der Interphase (e und f) und im perizentrischen Heterochromatin mitotischer Chromosomen angereichert (g und h). HMGA1a-EGFP (i) und eine Immunlokalisation gegen die Histonmodifikation H3K9me3 (k) kolokalisieren in C2A1a-Zellen (l und m). (B) C2R3xG-Zellen. HMGA1a-R3xG-EGFP (a) zeigte mit der DNA (b) kaum eine Kolokalisation (c und d). Die quadratische Markierung ist jeweils im rechts daneben angeordneten Bild in der angegebenen Vergrößerung dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

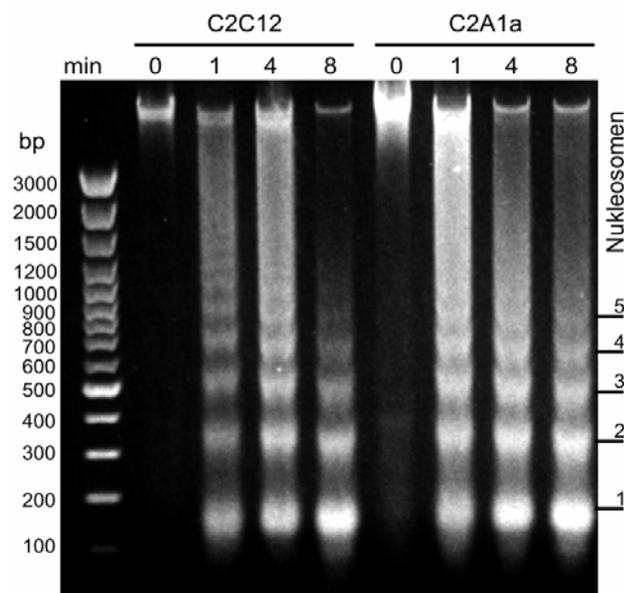
### HMGA1a-EGFP ist während der Interphase und der Mitose in Chromozentren angereichert

In C2A1a-Zellen zeigte HMGA1a-EGFP während der Interphase eine vollständige Kollokalisierung mit der DNA (Hoechst-33258) im Zellkern (Abb. 4-3). Dabei zeigte es eine diffuse Lokalisation im Euchromatin und war verstärkt in den Heterochromatin-Foci – den Chromozentren – angereichert. Diese Anreicherung im perizentrischen Heterochromatin wurde sowohl in lebenden Interphasezellen, als auch an mitotischen Chromosomen bestätigt (Abb. 4-3 A, Bilder e-h). Immunlokalisationen mit spezifischen Antikörpern, die Heterochromatin-typische Trimethylierung an Lysin 9 des Histon H3 (H3K9me3) erkennen, bestätigte die Akkumulation von HMGA1a im perizentrischen Heterochromatin. HMGA1a-DsRed in C2A1aDsRed-Zellen wies eine identische Lokalisation auf (nicht dargestellt). In C2R3xG-Zellen zeigten die HMGA1a-R3xG-EGFP-Fusionsproteine nur eine geringe Kollokalisierung mit der DNA (Abb. 4-3, B, Bilder c und d). Das Fusionsprotein war diffus über den gesamten Zellkern verteilt und trat zusätzlich verstärkt im Nukleolus auf. Diese Verteilung stimmte mit der zu erwartenden, reduzierten DNA-Bindung und bereits bekannten Lokalisation des HMGA1a-R3xG-EGFP in humanen Zellen überein (Harrer et al. 2004).

Die Ergebnisse zeigen erstmalig, dass HMGA1a in C2C12-Zellen in perizentrischen Heterochromatin lokalisiert und untermauern, dass funktionelle AT-Hook-Motive für eine Anreicherung der HMGA-Proteine im Heterochromatin essentiell sind.

#### 4.1.2.4 HMGA1a-Expression hat keinen Einfluss auf die Nukleosomenabstände

Da HMGA-Proteine in ihrer Funktion als Architekturelemente die Struktur des Chromatins beeinflussen, wurde überprüft, ob die konstitutive Expression von HMGA1a-EGFP zu einer Veränderung der Integrität des Chromatins führt. Hierzu wurden ein *Micrococcus*-Nuklease-Verdau des Chromatins aus C2C12- und C2A1a-Myoblastenkernen durchgeführt (Abb. 4-4).



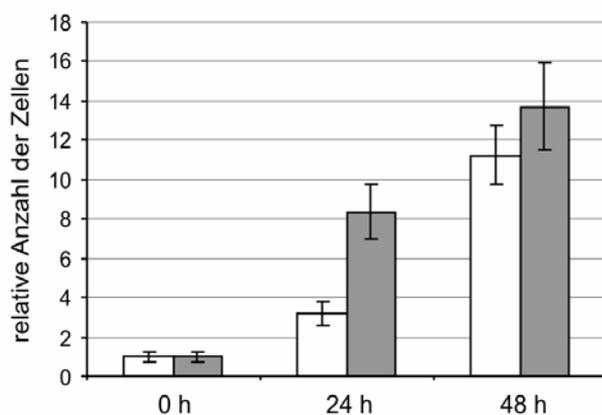
**Abb. 4-4: *Micrococcus*-Nuklease-Verdau von Chromatin aus C2C12- und C2A1a-Zellen**

Die isolierten Zellkerne wurden gezählt, das Chromatin mittels *Micrococcus*-Nuklease 1, 4 und 8 min verdaut. Die DNA des verdauten Chromatins wurde Phenol-Chloroform-extrahiert und über ein 1%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Über den Spuren sind die Verdauzeiten in Minuten angegeben. Die Scala auf der rechten Seite zeigt die Position von Mono- (1), Di- (2), Tri- (3), Tetra- (4) und Pentanukleosomen (5) im Gel. Als Größenstandard wurde die 100 bp DNA-Marker (MBI) verwendet (links)

Diese Ergebnisse zeigen, dass die HMGA1a-Überexpression den Grad des Verdauens und somit die Zugänglichkeit des Chromatins für Faktoren, wie die Microcococcus-Nuklease, nicht verändert. Auch die Nukleosomenabstände sind in C2C12- und C2A1a-Zellen identisch.

### HMGA1a führt zu einer erhöhten Zellteilungsrate in Myoblasten

Bei der Kultivierung der C2A1a-Myoblasten wurde im Vergleich der C2C12-Myoblasten eine erhöhte Teilungsrate beobachtet. Um eine Quantifizierung der Teilungsrate durchzuführen wurden C2C12- und C2A1a-Zellen in geringer Dichte auf Deckgläsern angesetzt. Nach 24 h und 48 h wurden die Zellen unter dem Mikroskop gezählt und die relative Zellzahl in Bezug auf die Ausgangsmenge berechnet (Abb. 4-5).



**Abb. 4-5: Proliferation von C2C12- und C2A1a-Myoblasten**

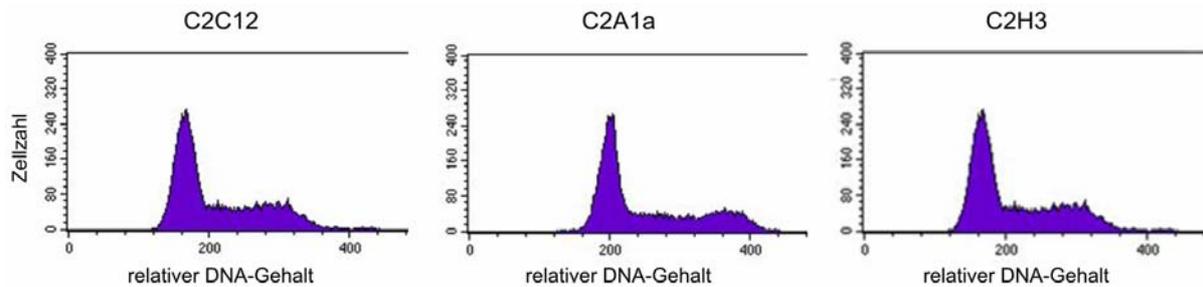
C2C12- (weiß) und C2A1a-Zellen (grau) nach dem Anwachsen (0 h), nach 24 h und 48 h in Wachstumsmedium. Die relativen Zellzahlen beziehen sich auf die Ausgangszellzahl, die im Diagramm auf 1 gesetzt wurde. Die Angaben stellen Mittelwerte aus jeweils 3 Auszählungen dar. Die Standardabweichungen der einzelnen Messungen sind jeweils angegeben.

Die Auszählung ergab, dass die C2C12-Zellen nach 24 h weniger als zwei Zellteilungen durchlaufen hatten, wohingegen sich die C2A1a-Zellen bereits zum vierten Mal geteilt hatten. Nach 48 h glichen sich die Zellzahlen einander wieder an, was auf Kontaktinhibition aufgrund des Erreichens der Konfluenz zurückzuführen war.

Die Ergebnisse zeigten, dass die HMGA1a-Überexpression ausreichend war, um die Proliferation der C2A1a-Myoblasten deutlich zu erhöhen. Dies steht in Einklang mit der Rolle der HMGA-Proteine bei einer Überexpression in Tumorzellen (Hock et al. 2007).

### HMGA1a-Expression hat keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen den C2C12- und den C2A1a-Myoblasten zu einer Akkumulation der Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus führte, wurden die Zellzyklusverteilung in C2C12- und C2A1a-Zellen mit Hilfe von Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) analysiert (Abb. 4-6). C2H3-Zellen dienten als Kontrolle, um auszuschließen, dass die Expression des EGFP-Fragmentes der Fusionsproteine für den Einfluss auf die Proliferation verantwortlich war.



**Abb. 4-6: FACS-Analyse von C2C12-, C2A1a- und C2H3-Zellen**

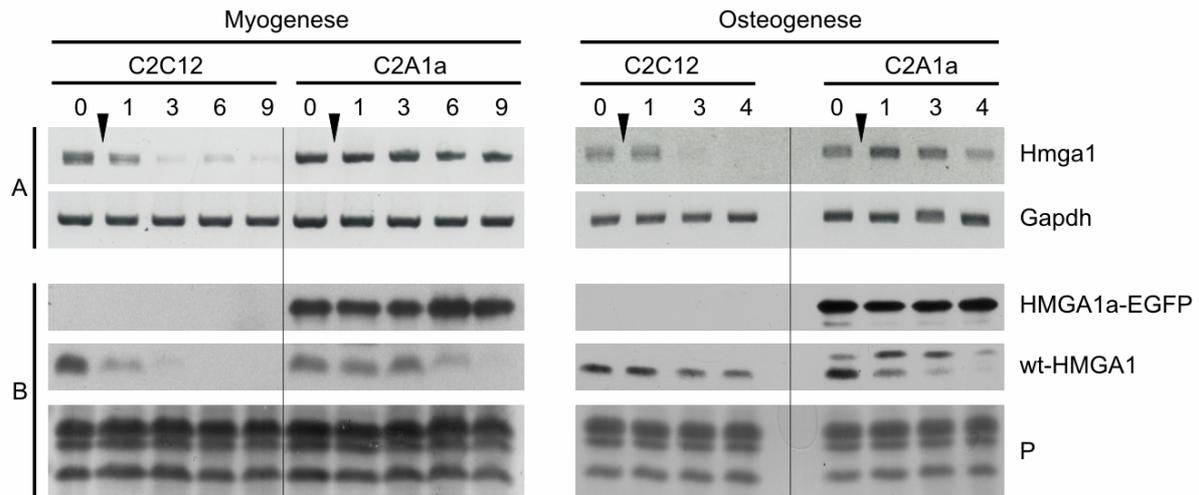
C2C12-, C2A1a- und C2H3-Zellen wurden in 60 mm-Schalen ausgesät, am folgenden Tag in PBS gewaschen und in Ethanol bei 4°C fixiert. Anschließend wurde die DNA mittels Propidiumjodid gefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des BD FACScan. Die Auswertungen der FACS-Analyse über die CellQuest Pro-Software ergaben, dass es in keiner der untersuchten Zelllinien zu einer Akkumulation der Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase kam.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Verteilung von Zellfraktionen in einzelnen Zellzyklusphasen in C2C12-, C2A1a- und C2H3-Zellen identisch waren. Zusammengefasst zeigte die Charakterisierung der C2A1a-Myoblasten, dass diese in der Grundintegrität des Chromatins und ihrer Zellzyklusverteilung nicht extrem von wildtypischen C2C12-Zellen abwichen. Somit konnte diese Zelllinie zu weiteren Untersuchungen über den Einfluss von HMGA1a auf die zelluläre Differenzierung herangezogen werden.

### 4.1.3 Einfluss konstitutiver HMGA1a-Expression auf die Differenzierung

#### 4.1.3.1 HMGA1-Expression in C2C12- und C2A1a-Zellen während der Differenzierung

Zur Bestätigung der stabilen Expression von HMGA1a-EGFP auch nach Induktion der Differenzierung, wurden RT-PCR- und Westernblot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden C2C12- und C2A1a-Zellen wie unter 4.1.1 beschrieben ausgesät. Am Folgetag wurde durch Zugabe von DM beziehungsweise BMP-2 die Differenzierung induziert. In der Myogenese wurde an den Differenzierungstagen 0, 1, 3, 6 und 9 und in der Osteogenese an den Tagen 0, 1, 3 und 4 Gesamt-RNA und Zellkerne isoliert. RT-PCR-Analysen mit HMGA1-spezifischen Primern und der cDNA aus den untersuchten Differenzierungstagen ergaben, dass die konstitutive Expression des HMGA1a bis an Tag 9 der Myogenese und Tag 4 der Osteogenese aufrecht erhalten blieb. Die Westernblot-Analysen bestätigten die anhaltende und gleich bleibende Expression des HMGA1a-EGFP-Fusionsproteins während der gesamten Differenzierung (Abb. 4-7).

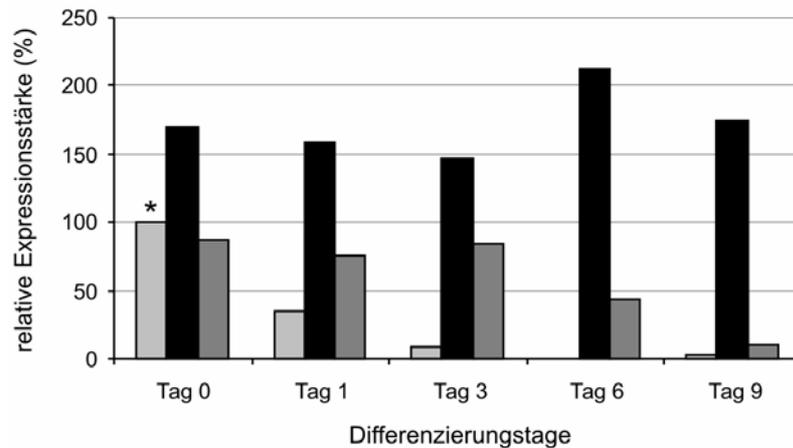


**Abb. 4-7: Expressionsanalyse von HMGA1 und in während der Myogenese**

(A) Aus C2C12- und C2A1a-Zellen der Differenzierungstagen 0, 1, 3, 6 und 9 während der Myogenese und den Tagen 0, 1, 3 und 4 während der Osteogenese wurde Gesamt-RNA isoliert. Die HMGA1-Expression wurde aus der hergestellten cDNA mittels spezifischen HMGA1-Primern über PCR ermittelt. Als Kontrolle der Transkription diente die Expression von Gapdh (B) An den unter A angegebenen Differenzierungstagen wurden Zellkerne aus C2C12- und C2A1a-Zellen präpariert, pro Spur  $1,5 \cdot 10^5$  Kerne in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Transfer auf Nitrocellulose die HMGA1-Expression mit Hilfe eines HMGA1-spezifischen Antikörpers (Abcam) nachgewiesen. Die obere Reihe zeigt die konstitutive HMGA1a-EGFP-Expression während der Differenzierungsprozesse. In der mittleren Reihe ist die Expression des endogenen HMGA1 dargestellt. Die Doppelbande in C2A1a-Zellen während der Osteogenese resultiert aus der Degradation des HMGA1a-EGFP. Als Beladungskontrolle diente die Ponceau-Färbung der Kernhistone (P).

Während der Myogenese hielt in C2A1a-Zellen im Gegensatz zu C2C12-Zellen die Expression des endogenen HMGA1 länger an. Eine Herunterregulierung erfolgte hier verspätet nach Tag 3 und erst an Tag 6 war weniger HMGA1 detektierbar. Während der Osteogenese scheint dagegen die Expression des endogenen HMGA1 in C2A1a-Zellen im Gegensatz zu C2C12-Zellen an Tag 3 heruntergeregelt zu werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit Daten, die zeigen, dass die Expression von exogenem HMGA1 Einfluss auf die Expression des endogenen Proteins nimmt (Reeves et al. 2001).

Eine Quantifizierung der relativen HMGA1-Expression mittels Densitometrie über den Zeitraum der Myogenese ergab eine  $\sim 2,6$ -fache HMGA1-Überexpression in C2A1a-Myoblasten (siehe Abb. 4-8). Diese nahm im Laufe der Myogenese wegen der geringer werdenden Proteinmenge des endogenen HMGA1 zu. An Tag 1 nach Induktion der Myogenese betrug die relative HMGA1-Überexpression bereits das  $\sim 6,8$ -fache des endogenen HMGA1 und steigerte sich an Tag 3 auf das  $\sim 26,8$ -fache. An Tag 9 wurde eine  $\sim 53,5$ -fache relative Überexpression von HMGA1 in C2A1a-Zellen festgestellt. In diese Werte wurde auch die länger anhaltende erhöhte Expression des endogenen HMGA1 mit eingerechnet. Die detektierte 30-50-fache Überexpression von HMGA1 ist vergleichbar mit Befunden aus vielen Tumorzellen, die eine 5-200-fache HMGA-Überexpression zeigten (Giancotti et al. 1987; Giannini et al. 2000; Johnson et al. 1988; Reeves et al. 2001; Tallini et al. 1999; Treff et al. 2004).



**Abb. 4-8: Relative HMGA1-Expression in C2C12- und C2A1a-Zellen während der Myogenese**

Zur densitometrischen Ermittlung der Expressionsstärke wurden Westernblots herangezogen und die Intensität der Banden *in silico* mit Hilfe der AlphaEase FC-Software (Alpha-Innotec) analysiert. Im Graph ist die relative Expressionsstärke (in Prozent) von HMGA1 in Bezug auf endogenes HMGA1 in C2C12-Myblastenzellen (\*) aufgetragen. Dargestellt sind die Messungen des endogenen HMGA1 in C2C12-Zellen (hellgrau), HMGA1a-EGFP in C2A1a-Zellen (schwarz) und von endogenem HMGA1 in C2A1a-Zellen (dunkelgrau).

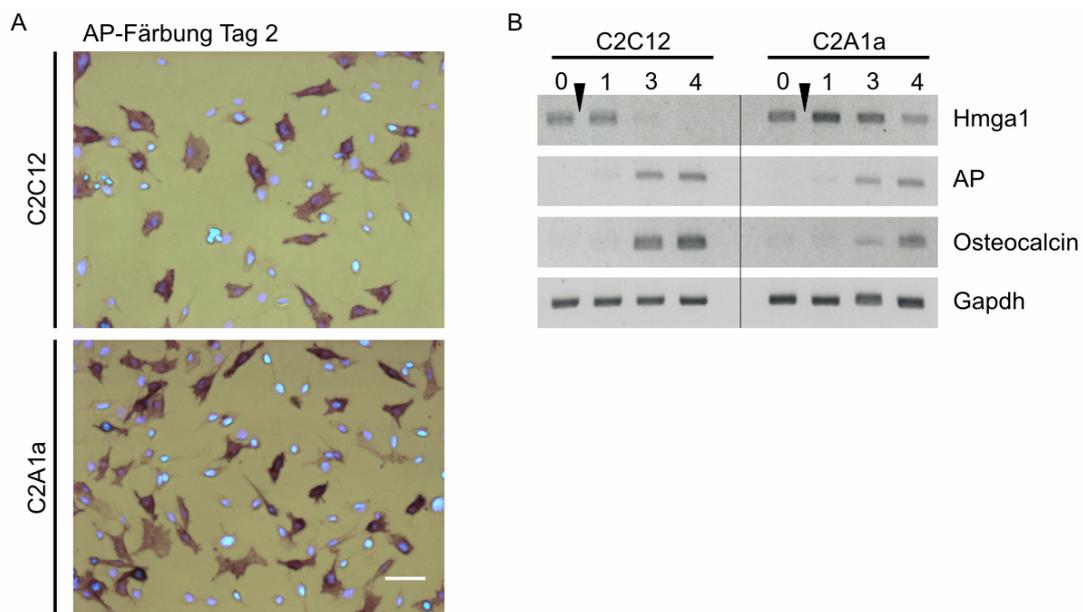
In initialen Differenzierungsexperimenten zeigte sich auch 9 Tage nach Induktion der Myogenese bei C2A1a-Zellen keinerlei morphologischen Veränderungen, während die C2C12-Zellen in dieser Zeit fast vollständig zu Myotuben differenzierten. Aufgrund dieser Beobachtung wurde genauer untersucht wie sich HMGA1a auf die Differenzierung auswirkt. Dabei sollten Antworten auf folgende grundlegenden Fragen gefunden werden:

1. Wie beeinflusst die konstitutive HMGA1a-Expression den Verlauf der Osteogenese und der Myogenese?
2. Wie entscheidend ist dabei die Herunterregulierung von HMGA1a während der frühen Myogenese auf deren weiteren Verlauf?
3. Wie greifen HMGA1a-Proteine in die Zellzykluregulation ein?
4. Welchen Einfluss nehmen HMGA1a-Proteine auf die Zusammensetzung und Topologie des Chromatins?
5. Wie beeinflussen HMGA1a-Proteine epigenetische Regulationsmechanismen?

#### 4.1.3.2 HMGA1a zeigt keinen offensichtlichen Einfluss auf den Beginn der Osteogenese

Zunächst wurde untersucht, ob die Beeinträchtigung der Myogenese durch die konstitutive HMGA1a-EGFP-Expression auch für die Osteogenese gilt. Hierzu wurde die Osteogenese in C2C12- und C2A1a-Zellen durch die Zugabe von 0,5 µg/ml BMP-2 zum Kultivierungsmedium induziert. Nach 2 Tagen wurde die für Osteoblasten typische Expression der alkalischen Phosphatase (AP) mittels Farbreaktion überprüft (Abb. 4-9, A).

Des Weiteren wurde an den Differenzierungstagen 0, 1, 3 und 4 Gesamt-RNA aus C2C12- und C2A1a-Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels spezifischer Primer die Expression der Differenzierungsmarker AP und Osteocalcin über PCR getestet (Abb. 4-9 B).



**Abb. 4-9: Expression von Osteogenesemarkern**

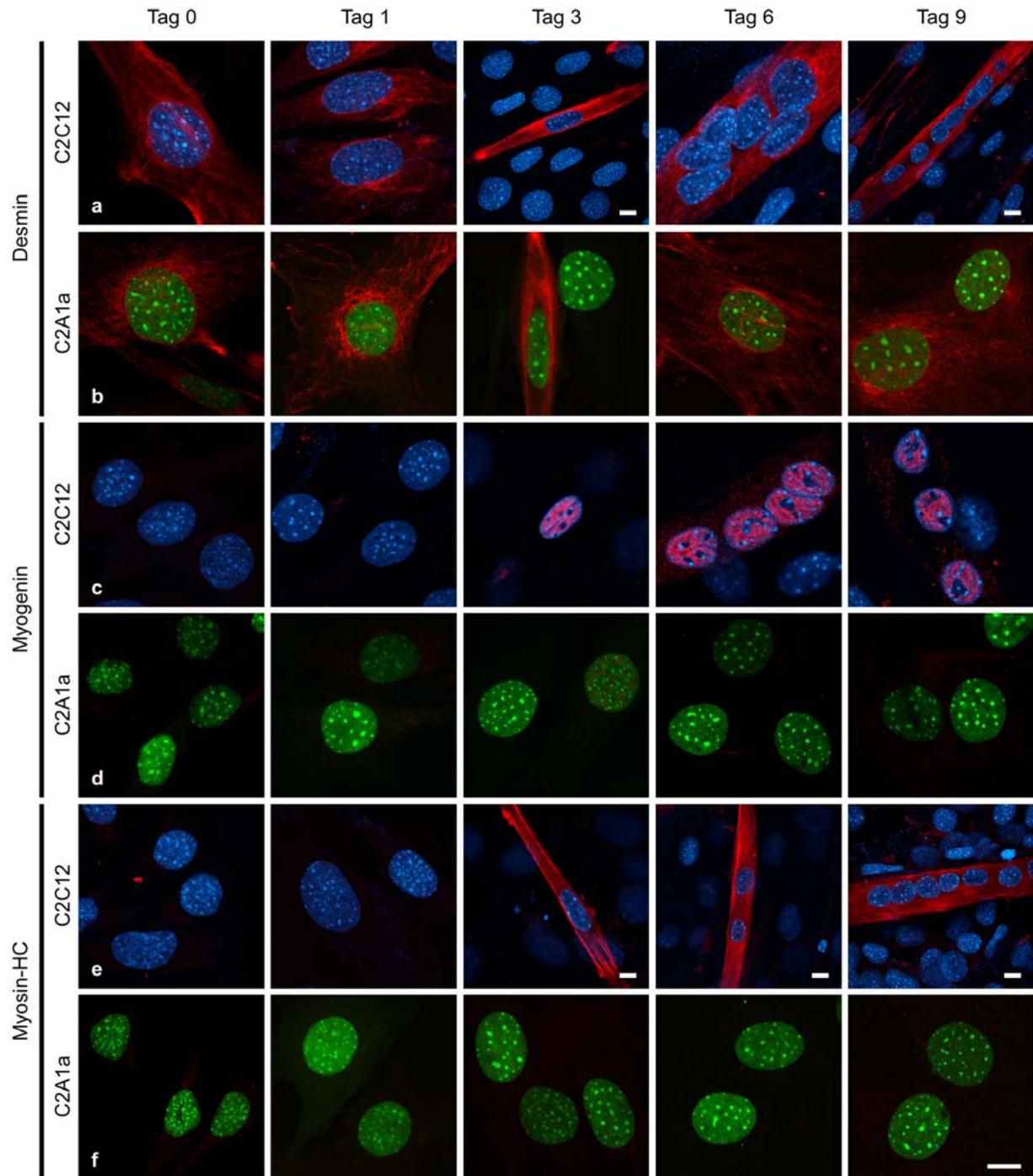
(A) Farbreaktion zum Nachweis der AP-Expression 2 Tage nach Induktion der Osteogenese. Gezeigt ist eine mikroskopische Hellfeldaufnahme der AP-Färbung zusammen mit der korrespondierenden Hoechst-33258 Färbung der DNA. Beiden Zelllinien zeigten in ~50% der Zellen eine AP-Färbung. Der Eichstrich entspricht 100µm (B) RT-PCR zum Nachweis der Expression von HMGA1, AP und Osteocalcin in C2C12- und C2A1a-Zellen an den Tagen 0, 1, 3 und 4 der Osteogenese. Gapdh diente als Kontrolle der reversen Transkription.

Es zeigte sich, dass eine konstitutive Expression von HMGA1a in C2C12-Zellen keinen maßgeblichen Einfluss auf den Beginn der Osteogenese hatte. Die C2A1a-Zellen wiesen eine AP-Färbung in gleichem Ausmaß wie die Kontrollzellen auf (Abb. 4-9 A). Auch die RT-PCR-Daten ergaben keine wesentliche Veränderung im Expressionsmuster der beiden Osteogenesemarkern AP und Osteocalcin (Abb. 4-9 B). Ob die konstitutive Expression von HMGA1a-EGFP Einfluss auf die weitere Differenzierung nimmt, wurde nicht im Detail untersucht.

#### **4.1.3.3 Konstitutive HMGA1a-Expression verhindert die Expression Myogenese-spezifischer Proteine**

Da eine anhaltende Expression von HMGA1a-EGFP offensichtlich spezifisch die Myogenese gezielt zu unterdrücken schien, wurde analysiert auf welcher Ebene diese Inhibition stattfindet. Dazu wurde zunächst die Expression prominenter Myogenesemarker mittels Immunlokalisation in C2C12- und C2A1a-Zellen während der Differenzierung untersucht. Dazu wurden spezifische Antikörper gegen Desmin, Myogenin und Myosin-HC (HC = heavy chain) eingesetzt. Desmin ist ein muskelspezifisches Intermediärfilament, welches in sämtlichen Muskelgeweben exprimiert und während der Muskeldifferenzierung nach oben geregelt wird (van de Klundert et al. 1994). Desmin scheint dabei unerlässlich für die Myogenese zu sein, da in Desmin-null Mutanten die Skelettmuskeldifferenzierung komplett inhibiert ist (Weitzer et al. 1995). Die Expression von Myogenin wird durch MyoD aktiviert. Myogenin gilt als ein früher Marker der Myogenese. Myogenin und Mef2 wiederum sind verantwortlich für die Expression später Muskelmarkergene (Ohkawa et al. 2006). Myosin ist als Komponente des dicken Filamentes das häufigste Protein des Sarkomers. Es ist dafür verantwortlich chemische in mechanische Energie umzusetzen. Die Expression von Myosin gilt auch als Marker für eine terminale Muskeldifferenzierung. Die Immunlokalisationen gegen Desmin, Myogenin und Myosin sind in Abb. 4-10 dargestellt.

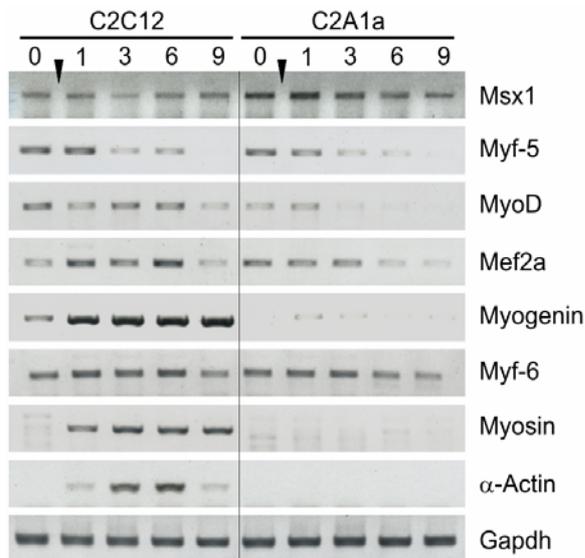
Desmin konnte in beiden Zelllinien beständig detektiert werden. Dabei waren die Fluoreszenzen in C2C12-Zellen ab Tag 3 kräftiger und es kam zu einer spindelförmigen Anordnung der Filamente um den/die Zellkern(e). In C2A1a-Zellen wurde lediglich eine schwache Desmin-Fluoreszenz auch nach Induktion der Myogenese detektiert. Während Myogenin und Myosin in C2C12-Zellen ab Tag 3 der Myogenese lokalisiert werden konnte, war in C2A1a-Zellen zu keiner Zeit ein Fluoreszenz-Signal festzustellen. Diese Ergebnisse deuteten an, dass es in C2A1a-Zellen zu einer Repression entscheidender Differenzierungsmarker kommt.



**Abb. 4-10: Immunlokalisationen in fixierten C2C12- und C2A1a-Zellen während der Myogenese**

In C2C12- und C2A1a-Myoblasten wurden auf Deckgläsern ausgesät. 24 h später wurde mittels DM die Myogenese induziert. An den Differenzierungstagen 0, 1, 3, 6 und 9 wurden Immunlokalisationen mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen Desmin (Reihe a und b), Myogenin (Reihe c und d) und Myosin (Reihe e und f) durchgeführt. Diese wurden durch konfokale Mikroskopie analysiert. Dargestellt sind jeweils die Übereinanderlagerungen des Immunlokalisations-Signals mit Hoechst-33258 im Falle der C2C12-Zellen und mit HMG1a-EGFP in den C2A1a-Zellen. Desmin wurde in beiden Zelllinien während der gesamten Differenzierung detektiert. Myogenin und Myosin hingegen konnten lediglich in C2C12-Zellen ab Tag 3 festgestellt werden, während in C2A1a-Zellen keinerlei Signal detektierbar war. Der Eichstrich entspricht jeweils 10  $\mu\text{m}$ .

Mit Hilfe von RT-PCR wurde die Expression weiterer Muskelmarker während der Differenzierung von C2C12- und C2A1a-Zellen überprüft. Neben Myogenin und Myosin wurden die Transkriptionsfaktoren Msx1, Myf-5, Myf-6, MyoD, Mef2a und als weiterer Marker der terminalen Differenzierung die Expression von  $\alpha$ -Actin überprüft (Abb. 4-11)



**Abb. 4-11: Analyse der Expression früher und später Muskelmarker in C2C12- und C2A1a-Zellen**

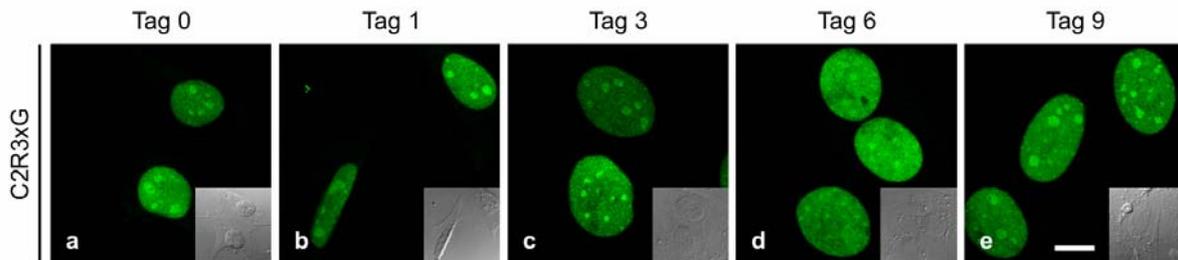
In C2C12- und C2A1a-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit DM die Myogenese induziert. Isolierte Gesamt-RNA der Differenzierungstage 0, 1, 3, 6 und 9 wurden in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Template für die PCR-Analyse der Expression von Msx1, der Myogeneseinitiatoren und frühen Differenzierungsmarker Myf-5, MyoD, Mef2a, Myogenin, Myf-6 und der Marker der späten Myogenese und terminal differenzierter Muskelzellen Myosin und  $\alpha$ -Actin. Gapdh diente als Kontrolle der reversen Transkription. Die schwarzen Pfeile markieren die Induktion der Myogenese durch die Gabe von DM.

Die Analysen in C2A1a-Zellen ergaben im Vergleich zur C2C12-Differenzierung eine abgeschwächte oder komplett fehlende Expression für Msx1, MyoD, Myogenin, Mef2a, Myosin und  $\alpha$ -Actin. Der Myogenese-Inhibitor Msx1 hingegen zeigte eine stärkere Expression in den C2A1a-Zellen bis an Tag 3. Aufgrund der gesteigerten Msx1-Expression, bildet sich vermutlich verstärkt ein repressiver Komplex aus Msx1 und H1b an der Kern-Enhancer-Region (CER) des MyoD-Gens und verhindert dessen Expression (Lee et al. 2004). Letzteres wird ebenfalls durch die Analyse der MyoD-mRNA unterstützt. Das Fehlen von MyoD als entscheidender Initiator der Myogenese ist vermutlich ein Hauptgrund für das Ausbleiben der Expression der muskelspezifischen Effektoren und Markergene Myogenin, Myosin und  $\alpha$ -Aktin. Da die Expression weiterer initialer Faktoren wie „myogenic factor 5“ (Myf-5) und „myogenic factor 6“ (Myf-6) von der konstitutiven HMGA1a-Expression unbeeinflusst blieben, scheint die Hemmung der Myogenese über die spezifische Inhibition der MyoD-Wirkkaskade vermittelt zu werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Überexpression von HMGA1a die Expression Myogenese-spezifischer Markergene unterdrückt, oder entscheidende Faktoren der Differenzierungsregulation, wie Msx1, erhöht. Letztere ist ein Indiz für die verminderte Expression von Schlüsselgenen, wie MyoD und Myogenin, die wiederum die fehlende Expression muskelspezifischer Strukturproteine wie Myosin und  $\alpha$ -Actin erklärt. Des Weiteren belegen diese Daten, dass in C2A1a-Zellen frühe und späte Differenzierungsschritte gestört sind. Die RT-PCR-Daten wurden in C2A1aDsRed-Zellen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.3.4 Hemmung der Myogenese durch HMGA1a ist unabhängig von dessen Verweildauer am Chromatin

Da die DNA-Bindung von HMGA1a für dessen Funktion als Architekturfaktor eine wichtige Rolle spielt, wurde untersucht, wie sich eine verminderte Verweildauer von HMGA1a am Chromatin auf die Myogenese auswirkt. Zu diesem Zweck wurde die Zelllinie C2R3xG auf ihr Differenzierungspotential hin analysiert (Abb. 4-12). Das in den AT-Hook DNA-Bindungsmotiven mutierte HMGA1a zeigt eine deutlich schwächere Bindung an die DNA als das wildtypische HMGA1a (Harrer et al. 2004).



**Abb. 4-12: Differenzierung von C2R3xG-Zellen**

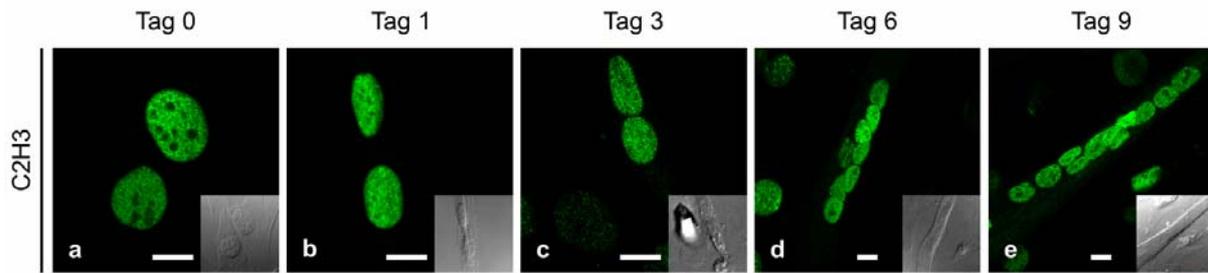
Die C2R3xG-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät. Am Folgetag wurde die Myogenese durch die Gabe von DM induziert. An den Differenzierungstagen 0, 1, 3, 6 und 9 wurde jeweils ein Deckglas fixiert und mittels konfokaler Mikroskopie auf die Bildung von Myotuben hin analysiert. In den C2R3xG-Zellen waren vereinzelt gestreckte Myocyten zu erkennen, es fand jedoch keine Myotubenbildung statt. Dargestellt ist die HMGA1a-EGFP-Fluoreszenz. Der kleine Ausschnitt zeigt die zugehörige Interferenzkontrast-Aufnahme. Der Eichstrich beträgt 10  $\mu\text{m}$ .

In C2R3xG-Zellen konnte zu keiner Zeit Zellfusion oder Myotubenbildung beobachtet werden. Somit zeigte die Überprüfung des Differenzierungspotentials in C2R3xG-Zellen, dass auch die Überexpression einer HMGA1a-Variante mit einer verringerten Verweildauer am Chromatin für die Inhibition der Myogenese ausreichend ist.

#### 4.1.3.5 C2H3-Zellen differenzieren zu Myotuben

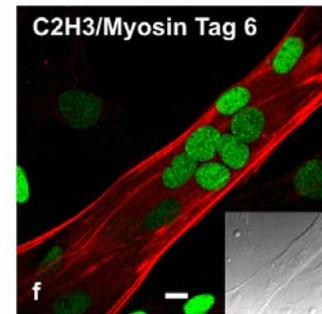
Als weitere Kontrolle wurde zusätzlich das Differenzierungspotential der C2H3-Zellen überprüft. Diese exprimieren ein stabil integriertes Histon H3-EGFP.

Wie Abb. 4-13 zeigt, wurde eine normale Differenzierung der C2H3-Zellen zu Myotuben beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellfusion an Tag 3 (Abb. 4-13 h), die Bildung von Synzytien an Tag 6 und Myotuben an Tag 9 (Abb. 4-13 d und e) und die Expression von Myosin (Abb. 4-13 f) von der Überexpression des H3-EGFP-Fusionsproteins unbeeinflusst blieben. Dieses Ergebnis bestätigt auch, dass der EGFP-Anteil der HMGA1a-EGFP-Fusionsproteine nicht zur Inhibition der Myogenese in C2A1a-Zellen beiträgt. Dass EGFP das Entwicklungspotential von C2C12-Zellen nicht beeinflusst, wurde bereits früher schon gezeigt (Simone et al. 2002).



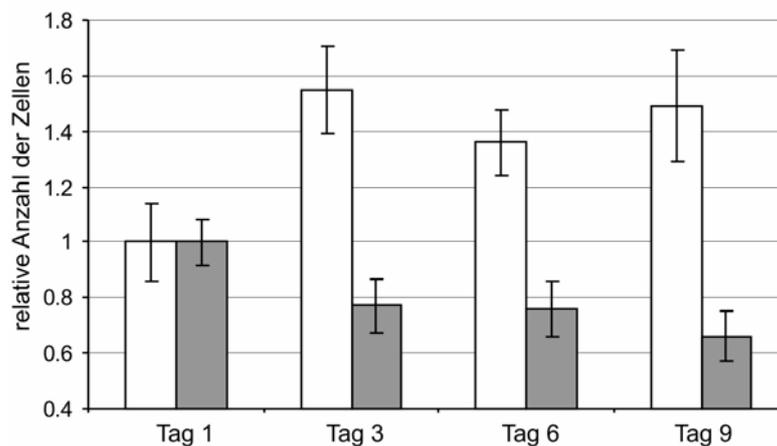
**Abb. 4-13: C2H3-Zellen bilden Myotuben und exprimieren Myosin**

Die C2H3-Zellen wurden entsprechend Abb. 4-12 angesetzt, differenziert und fixiert. Ab Tag 3 zeigte sich eine Fusion in einigen C2H3-Zellen (c) und im weiteren Verlauf der Myogenese kam es zur Bildung von Myotuben (d, e). Eine Immunlokalisierung von Myosin an Tag 6 zeigt ein mit C2C12-Zellen vergleichbares Fluoreszenzsignal (f, Übereinanderlagerung mit H3-EGFP). Die kleinen Ausschnitte zeigen die entsprechende Interferenz-Kontrast-Aufnahme. Die Eichstriche entsprechen 10 µm.



#### 4.1.3.6 Einfluss von HMGA1a die Proliferation während der Differenzierung

Da die HMGA1a-EGFP Überexpression zu einer erhöhten Proliferation in Myoblasten führte (Abb. 4-5), wurde die Wachstumsrate auch nach Induktion der Myogenese kontrolliert. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der C2C12-Zellen bis an Tag 3 weiterhin proliferierten und danach bis zur terminalen Differenzierung an Tag 9 relativ konstant in ihrer Zellzahl blieben. Im Gegensatz dazu kam es in den C2A1a-Zellen ab Tag 3 zu einem kontinuierlichen Rückgang der Zellzahl während des gesamten Differenzierungszeitraumes (Abb. 4-14).



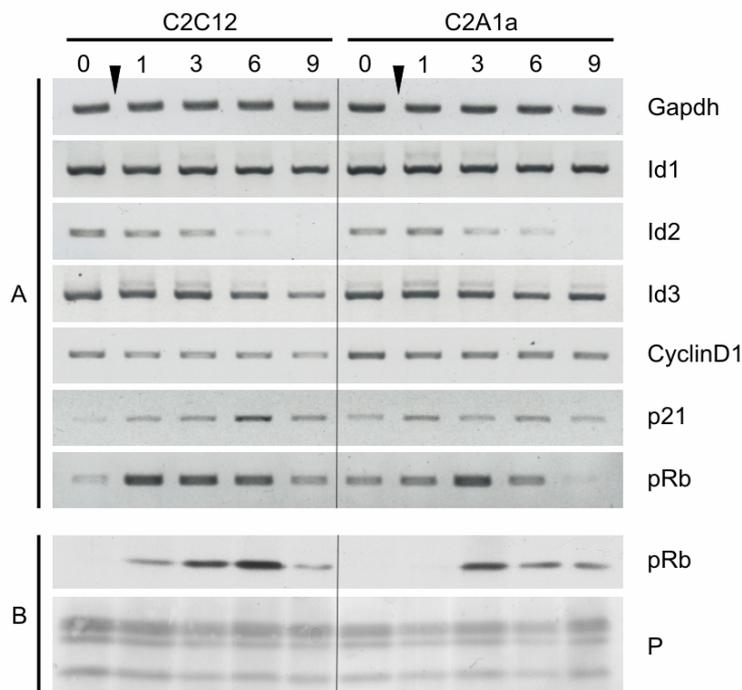
**Abb. 4-14: Bestimmung der Zellzahl in C2C12- und C2A1a-Zellen während der Myogenese**

C2C12- und C2A1a-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am Folgetag wurde durch die Gabe von DM die Myogenese induziert. An den Differenzierungstagen 1, 3, 6 und 9 wurde je ein Deckglas fixiert und die DNA mittels Hoechst-33258 gefärbt. Am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und sind relativ zu Tag 1 angegeben. Dabei wurde die Zellzahl an Tag 1 mit 1,0 festgelegt. C2C12-Zellen sind in weiß, C2A1a-Zellen in grau dargestellt. In den C2C12-Zellen konnte eine Zunahme der Zellzahl bis an Tag 3 Detektiert werden, danach erfolgte eine Stagnation der Proliferation. Die C2A1a-Zellen zeigten nach Induktion der Myogenese einen Rückgang in ihrer Zellzahl.

Diese Ergebnisse zeigen, dass HMGA1a, im Gegensatz zu den Beobachtungen in C2A1a-Myoblasten, nach Induktion der Differenzierung einen anti-proliferativen Effekt aufweist. Ähnliches wurde in Schilddrüsenepithelzellen bei Ratten beschrieben, wo es aufgrund der Überexpression von HMGA1b bestätigt zu einer Fehlregulation der S-Phase und einem verzögerten Eintritt in die G2/M-Phase kam (Fedele et al. 2001). Daraus lässt sich schließen, dass sich die Auswirkungen von HMGA1 auf die Proliferation in vorprogrammierten Zellen von jenen in differenzierenden Zellen generell unterscheiden scheinen.

### Einfluss von HMGA1a auf Proteine der Zellzyklusregulation

Aufgrund des veränderten Proliferationsverhaltens von C2C12-Zellen durch die konstitutive Überexpression von HMGA1a wurde die Expression verschiedener Zellzyklusregulatoren mittels RT-PCR untersucht. Dabei wurden die Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren „Inhibitor of DNA binding“ Id1, Id2 und Id3, die den Austritt aus dem Zellzyklus inhibieren, CyclinD1, der Cyclin-abhängige Kinase (Cdk) Inhibitor p21 und das Retinoblastoma-Protein pRb analysiert (Abb. 4-15 A). Die pRB-Expression wurde zusätzlich auf Proteinebene über Westernblot überprüft (Abb. 4-15 B).



**Abb. 4-15: Expression von Zellzyklusregulatoren in Myoblasten und während der Myogenese**

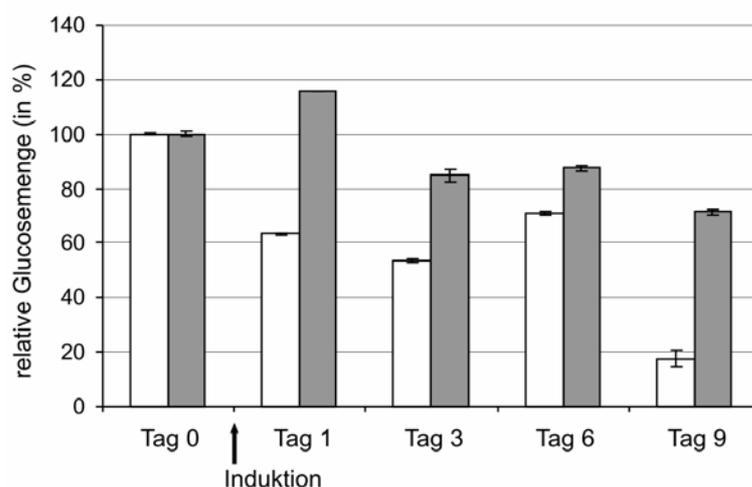
(A) C2C12- und C2A1a-Zellen wurden ausgesät und 24 h später mit DM induziert. An den Differenzierungstage 0, 1, 3, 6 und 9 wurde aus isolierter Gesamt-RNA cDNA hergestellt. Diese diente als Template für die PCR Expressionsanalyse mittels spezifischer Primer gegen die Id-Proteine (inhibitor of DNA binding) Id1, Id2 und Id3, sowie CyclinD1, p21 und pRb. Die Gapdh-Expression diente dabei als Kontrolle der reversen Transkription. (B) Isolierte Zellkerne der gleichen Differenzierungstage wurden elektrophoretisch aufgetrennt ( $1,5 \cdot 10^5$  Kerne/Spur) und auf Nitrocellulose transferiert. Mittels spezifischem Antikörper wurde die Expression von pRb auf Proteinebene nachgewiesen. Die Ponceau-Färbung der Histone ist als Beladungskontrolle gezeigt.

In der Expression der Id-Proteine traten keine markanten Veränderungen auf. Die CyclinD1-Expression war in den C2A1a-Myoblasten und während des gesamten Differenzierungszeitraumes etwas erhöht. Dagegen fand die in C2C12-Zellen detektierte schrittweise Zunahme der p21-mRNA in den C2A1a-Zellen nicht statt. Die pRb-Expression war in C2A1a-Zellen ebenfalls schwächer mit Ausnahme von Tag 3. Im Gegensatz zu C2C12-Zellen, fehlte in C2A1a-Zellen an Tag 1 die pRb-Expression (Abb. 4-15 B) und zeigte im Westernblot auch während der weiteren Differenzierung Unterschiede zu C2C12-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von HMGA1a nach Induktion der Myogenese zu einer Störung in der Expression verschiedener Zellzyklusregulatoren führt. In dieser veränderten Expression könnte die Ursache für den anti-proliferativen Effekt in induzierten C2A1a-Zellen zu suchen sein.

#### 4.1.3.7 Die Glucoseaufnahme in C2C12- und C2A1a-Zellen korreliert mit Zellzahl

Proliferation erfordert eine Zunahme in der Produktion von zum Beispiel Strukturproteinen und Enzymen, sowie Energie unter anderem für die DNA-Replikation. Diesen Energiebedarf deckt die Zelle durch die Aufnahme von Glucose. Hierzu wurde analysiert, ob sich das unterschiedliche Proliferationsverhalten von C2C12- und C2A1a-Zellen auf deren Glucoseaufnahmepotential auswirkt. Die Analyse des Glucosegehaltes im Medium ergab, dass die C2C12-Zellen pro Einzelzelle im Verlauf der Differenzierung mehr Glucose aufnehmen als die C2A1a-Zellen (Abb. 4-16). Diese Ergebnisse zeigen, dass die konstitutive Überexpression von HMGA1a während der Differenzierung zu einer Fehlregulation im Glucosehaushalt der Zellen führt.



**Abb. 4-16: Relativer Glucosegehalt im Medium von C2C12- und C2A1a-Zellen während der Myogenese**

Abbildungslegende siehe folgende Seite

**Abbildungslegende zu Abb. 4-16 vorherige Seite:**

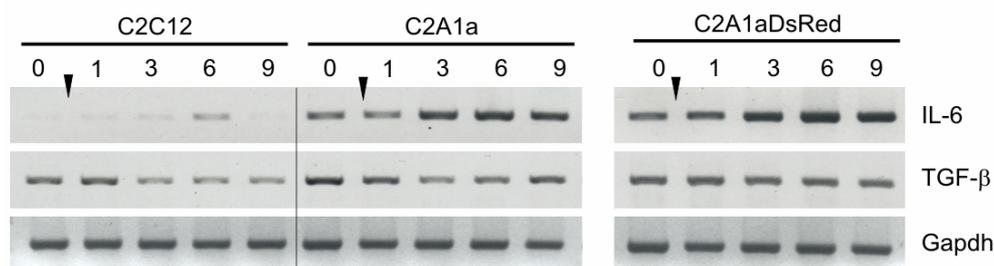
Zellen beider Zelllinien wurden in 60 mm-Schalen ausgesät. 24 h später wurde die Myogenese durch DM induziert (Pfeil). An den Differenzierungstagen 0, 1, 3, 6 und 9 wurde Medium abgenommen und Glucosegehalt des Kultur- beziehungsweise Differenzierungsmediums mit Hilfe des GlucoTouch-Messgerätes (LifeScan) bestimmt. Der im Kultur- beziehungsweise Differenzierungsmedium gemessene Glucosegehalt wurde Zellzahl-bereinigt und relativ zu Tag 0 in Prozent aufgetragen. Dabei spiegeln die Werte den verbliebenen Glucosegehalt im Medium pro Zelle wider. Messungen von C2C12-Zellen sind in weiß, von C2A1a-Zellen in grau dargestellt.

**4.1.3.8 Einfluss anhaltender HMGA1a-Expression auf spezifische Genexpression**

Der hemmende Einfluss der konstitutiven HMGA1a-Expression auf die Myogenese und die dabei auftretende Störung im Glucosehaushalt in Verbindung mit den veränderten Expressionsmustern verschiedener muskelspezifischer Markergene und Zellzyklusregulatoren gaben Anlass die Auswirkung von HMGA1a auf die Expression von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Genen des IGF-Systems zu untersuchen

**HMGA1a verstärkt die Expression von TGF- $\beta$  und IL-6**

In Patienten mit Fettleibigkeit und Typ-II-Diabetes wurden ein um das 2-3-fach erhöhter IL-6-Plasmalevel festgestellt und unter den Zytokinen weist IL-6 die stärkste Korrelation mit Insulin-Resistenz und Typ-2-Diabetes auf. In C2C12-Zellen wurde gezeigt, dass bei einem Anstieg der IL-6-Expression, sowohl die Expression des Glucosetransporters Glut4, als auch dessen Rekrutierung an die Plasmamembran vermindert ist (Jove et al. 2005). TGF- $\beta$ -Signale regulieren die Expression von HMGA-Proteinen in Differenzierungsprozessen und inhibiert die Zellfusion in C2C12-Zellen (Ebisawa et al. 1999; Olson et al. 1986). Aus diesen Gründen wurde die Expression von IL-6 und TGF- $\beta$  mittels RT-PCR in C2C12- und C2A1a-Zellen durchgeführt (Abb. 4-17).

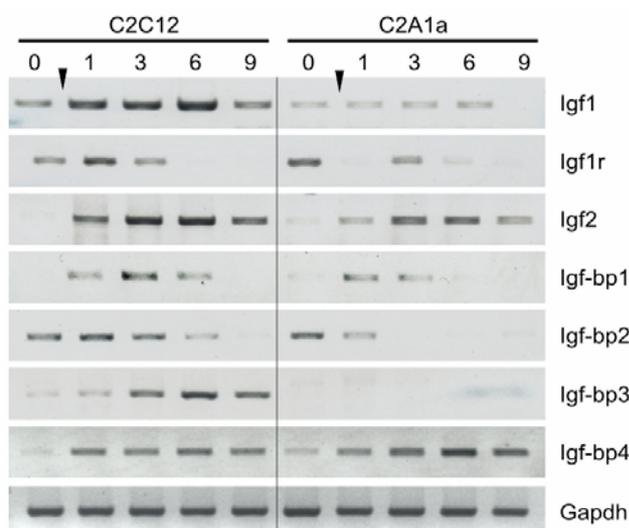
**Abb. 4-17: HMGA1a verändert die Expression von IL-6 und TGF- $\beta$** 

C2C12-, C2A1a- und C2A1aDsRed-Zellen wurden ausgesät, und die Myogenese mittels DM induziert. Isolierte Gesamt-RNA der Differenzierungstage 0, 1, 3, 6 und 9 wurde in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe spezifischer Primer die Expression von IL-6 und TGF- $\beta$  über PCR bestimmt. Die C2A1aDsRed-Zellen sollten Aufschluss über den Einfluss der HMGA1a-Verweildauer am Chromatin auf die Regulation der beiden Gene geben. Gapdh diente als Kontrolle der reversen Transkription.

Während IL-6 in C2C12-Zellen kaum exprimiert war, führte die HMGA1a-Überexpression in C2A1a-Zellen zu einer massiv erhöhten Expression des Zytokins (Abb 4-17 oben). Die TGF- $\beta$ -Expression erfuhr eine leicht verstärkte Expression in C2A1a-Zellen (Abb 4-17 unten). Der Einfluss auf die Regulation von IL-6 wird durch die Tatsache unterstützt, dass HMGA1a am Aufbau des Enhanceosomes des Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ )-Gens beteiligt ist (Yie et al. 1999) und IL-6 auch unter der Bezeichnung Interferon-beta-2 (IFNB2) bekannt ist. In C2A1aDsRed-Zellen trat dieser Effekt noch verstärkt auf (Abb. 4-17). Da HMGA1a-DsRed-Fusionsproteine eine längere Verweildauer am Chromatin besitzen (Schütz M., Dissertation), scheint in diesem Fall eine erhöhte Verweildauer von HMGA1a am Chromatin die IL-6-Expression noch zu verstärken. In C2A1a-Zellen könnte somit die gesteigerten IL-6-Expression eine Ursache für die geringere Glucoseaufnahme darstellen. In C2C12-Zellen inhibiert der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  die Fusion der Zellen (Olson et al. 1986). Somit ist die gesteigerte Expression von TGF- $\beta$  in C2A1a-Zellen eine mögliche Erklärung für die Inhibition der Fusion und der terminalen Differenzierung. Diese Experimente zeigen, dass HMGA1a massiven Einfluss auf die Regulation der Genexpression von IL-6 und TGF- $\beta$  nimmt und dies im Falle von IL-6 zusätzlich mit der Verweildauer von HMGA1a am Chromatin zusammenhängt.

### HMGA1a-Überexpression beeinträchtigt das IGF-System

Aufgrund der gestörten Glucoseaufnahme in C2A1a-Zellen während der Myogenese, wurden ausgewählte Komponenten des „insulin like growth factor“ (IGF)-Systems wegen ihrer regulatorischen Wirkung auf den Glucosehaushalt untersucht. Mit Hilfe von RT-PCR wurde die Expression von Igf1, Igf2, Igf1-Rezeptor (Igf1r) und der Igf-Bindungsproteine Igf-bp1, Igf-bp2, Igf-bp3 und Igf-bp4 analysiert. Die RT-PCR-Analyse ergab Veränderungen bei allen untersuchten Komponenten des IGF-Systems (Abb. 4-18).



**Abb. 4-18: HMGA1a-Überexpression verändert Expressionsmuster von Komponenten des IGF-Systems**

Entsprechend Abb. 4-17 diente cDNA aus C2C12- und C2A1a-Zellen der Differenzierungsstages 0, 1, 3, 6 und 9 als Template für die PCR-Analysen mit spezifischen Primern gegen Igf1, Igf1-Rezeptor (Igf1r), Igf2, und die Igf-Bindungsproteine Igf-bp1, Igf-bp2, Igf-bp3 und Igf-bp4. Dabei kam es bei allen untersuchten Genen zu einer Veränderung des Expressionsmusters. Die Gapdh-Expression diente als Kontrolle der reversen Transkription.

Beispielsweise kam es zu einer sehr starken Herunterregulierung der Expression von *Igf1* und *Igf2*, sowie der Igf-Bindungsproteine *Igf-bp1*, *Igf-bp2* und *Igf-bp3*.

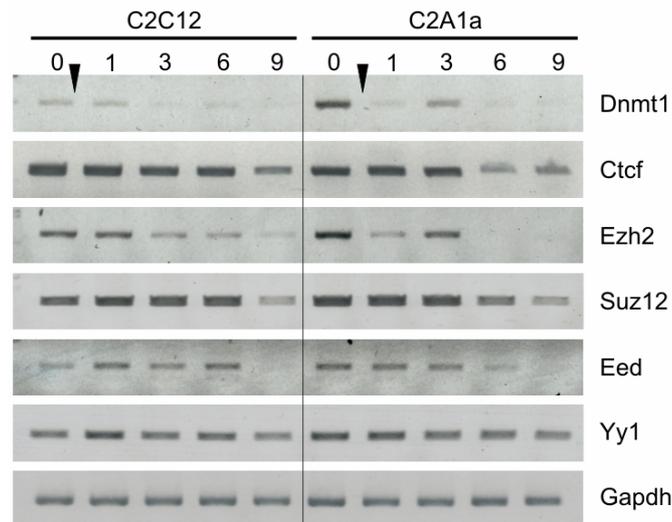
Der *Igf1*-Rezeptor (*Igf1r*) zeigte in C2A1a-Myoblasten eine stärkere, während der frühen Differenzierung jedoch eine schwächere Expression. In Kontrollexperimenten mit C2A1aDsRed-Zellen wurden diese Ergebnisse bestätigt. Interessanterweise waren die Effekte dabei wieder verstärkt (RT-PCR nicht dargestellt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von HMGA1a zu einer massiven und umfassenden Störung des IGF-Systems führen. Dies stellt eine Erklärung für die geringere Glucoseaufnahme in C2A1a-Zellen dar.

### **Einfluss von HMGA1a auf den Polycomb-Komplex**

Der Polycomb-Komplex verknüpft das Zusammenspiel von DNA- und Histonmethylierung mit der Repression bestimmter Gene und ist maßgeblich an der Regulation von *Igf2* beteiligt (Delaval et al. 2004). Aufgrund der beobachteten, HMGA1a-abhängigen verringerten Expression, des über Imprinting regulierten Genes *Igf2*, wurde überprüft, ob die anhaltende HMGA1a-Expression Auswirkungen auf die Expression einiger Komponenten des PCR2-Polycomb-Komplexes hat.

RT-PCR-Analysen zeigten, dass die anhaltende Expression von HMGA1a bei den PCR2-Komponenten *Dnmt1* und *Ezh2* zu deutlichen Veränderungen im Expressionsmuster führte. *Dnmt1* katalysiert die *de novo* DNA-Methylierung (Robertson 2005) und *Ezh2* ist für die Methylierung von H3K27 verantwortlich (Czermin et al. 2002). Beide Enzyme greifen maßgeblich in die epigenetische Regulationsprozesse von Genen ein. Eines der prominenteste Gene, dessen Expression über die DNA-Methylierung reguliert wird ist das *Igf2* (Delaval et al. 2004). Von *Ezh2* ist bekannt, dass es die Expression muskelspezifischer Gene und die Skelettmuskeldifferenzierung reguliert (Caretto et al. 2004). In beiden Fällen weisen die, durch die HMGA1a-Überexpression verursachten, Veränderungen im Expressionsmuster der modifizierenden Enzyme *Dnmt1* und *Ezh2*, auf eine weitere, mögliche Erklärung für die Fehlregulationen im IGF-System und der Expression muskelspezifischer Gene hin.



**Abb. 4-19: Expressionsanalyse bestimmter Komponenten des PRC2-Komplexes**

Mittels PCR wurde die Expression von einigen Komponenten des Polycomb-Komplexes PRC2 untersucht. Darunter die DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt1), der CCCTC-Bindungsfaktor CTCF, die Histon-Methyltransferase „enhancer of zeste“ (Ezh2), „suppressor of zeste“ (Suz12), Eed und der Transkriptionsfaktor YinYang1 (YY1). Als Template diente cDNA, die aus isolierter Gesamt-RNA von C2C12- und C2A1a-Zellen an den Differenzierungstagen 0, 1, 3, 6, und 9 über RT-PCR hergestellt wurde. Die PCR-Fragmente wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Änderungen traten im Expressionsmuster von Dnmt1 und Ezh2 auf. Diese waren in C2A1a- im Gegensatz zu C2C12-Myoblasten und an Tag 3 der Differenzierung stärker exprimiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Überexpression von HMGA1a in C2C12-Zellen zu einem veränderten Expressionsmuster von epigenetischen Regulator-Proteinen führt.

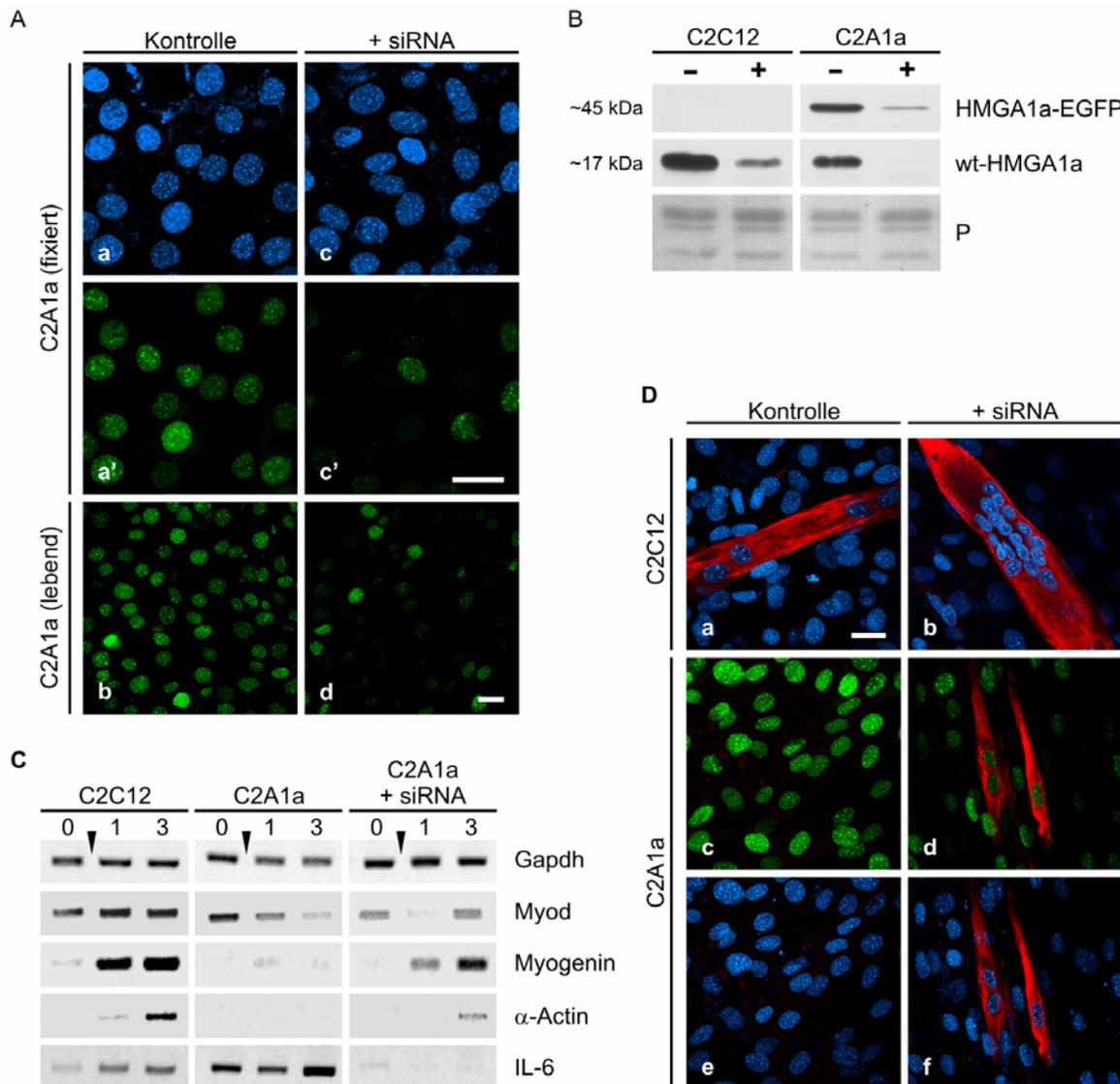
Die in dieser Arbeit vorgestellten RT-PCR-Untersuchungen zeigen, dass die anhaltende HMGA1a-Expression die Expression verschiedener Gene spezifisch beeinflussen kann. Dazu gehört die erhöhte Expression (CyclinD1, Dnmt1, Ezh2), die verringerte Expression (p21, pRb, Igf1, Igf2) und veränderte Expressionsmuster (IL-6, TGF- $\beta$ , Igf1-Rezeptor, den Igf-Bindeproteinen Igf-bp1, Igf-bp2, Igf-bp3 und Igf-bp4, Dnmt1, Ezh2) während der Differenzierung.

#### 4.1.3.9 Knock-down von HMGA1 ermöglicht den Wiedereintritt in die Myogenese

Um zu überprüfen, ob eine Herunterregulierung der HMGA1-Expression den Wiedereintritt in den Myogeneseprozess ermöglicht und die alleinige Ursache für die oben beschriebenen veränderten Expressionsprofile ist, wurde ein Knock-down von HMGA1 mittels siRNA durchgeführt. Hierzu wurden zwei verschiedene Sequenzmotive im Exon 5 des HMGA1-Gen als Zielsequenzen ausgewählt (siehe Anhang 8.3).

Nach dem Annealen der beiden komplementären RNA-Oligos wurden C2C12- und C2A1a-Zellen in 35 mm-Schalen ausgesät und mit jeweils 50 nM der beiden siRNA-Doppelstränge transfiziert und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der HMGA1-knock-down wurde 24 h nach der siRNA-Transfektion über den Rückgang der HMGA1a-EGFP-Fluoreszenz (Abb. 4-20 A) und mit Hilfe eines

spezifischen HMGA1-Antikörpers im Westernblot kontrolliert (Abb. 4-20 B). Die Auswirkungen der herunterregulierten HMGA1-Expression auf Differenzierungspotential wurde durch Analysen der Expression muskelspezifischer Gene, wie MyoD, Myogenin,  $\alpha$ -Actin und des Zytokins IL-6 mittels RT-PCR (Abb. 4-20 C) und durch Immunlokalisation von Myosin an Differenzierungstag 6 (Abb. 4-20 D) überprüft.



**Abb. 4-20: Analyse des HMGA1a-knock-downs in C2C12- und C2A1a-Zellen**

C2C12- und C2A1a-Zellen wurden ausgesät und am Folgetag mit doppelsträngigen siRNA-Oligos gegen HMGA1 transfiziert. (A) 24 h nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz in den C2A1a-Zellen anhand der Reduktion beziehungsweise des Fehlens der HMGA1a-EGFP-Fluoreszenz in fixierten (a, a', c, c') und lebenden (b, d) Zellen überprüft. Dabei zeigte sich in den siRNA-transfizierten Zellen eine deutliche Reduktion der HMGA1a-EGFP-Fluoreszenz (c', d). Die Eichstriche betragen jeweils 20  $\mu$ m. (B) 24 h nach siRNA-Transfektion wurden zusätzlich Proteinproben aus nicht-transfizierten (-) und siRNA-transfizierten (+) C2C12- und C2A1a-Gesamtzellen hergestellt und  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose wurde die HMGA1-Expression mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers überprüft. C2C12 zeigten nach siRNA-Transfektion eine deutlich geringere Proteinmenge des endogenen HMGA1 (~17 kDa). Fortsetzung der Bildlegende siehe folgende Seite.

### **Fortsetzung Bildlegende Abb. 4-20:**

In C2A1a-Zellen war die Proteinmenge von endogenem HMGA1 nicht mehr detektierbar und die des HMGA1a-EGFP stark reduziert. Die Ponceau-Färbung der Kernhistone wurde als Beladungskontrolle verwendet. (C) Nicht transfizierte C2C12- und C2A1a-Zellen und C2A1a-Zellen 24 h nach siRNA-Transfektion wurden mittels DM induziert. An den Differenzierungstagen 0, 1 und 3 wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression der muskelspezifischen Gene Myod, Myogenin und  $\alpha$ -Aktin, sowie des Zytokins IL-6 mit spezifischen Primern (siehe Anhang 8.3) über PCR analysiert. Dabei zeigte sich eine teilweise Wiederherstellung des wildtypischen Expressionsmusters der Gene in C2A1a-Zellen nach siRNA-Transfektion. Gapdh diente als Kontrolle der reversen Transkription. (D) Nicht transfizierte und siRNA-transfizierte C2C12- und C2A1a-Zellen wurden nach Induktion 6 Tage in DM kultiviert und anschließend wurde eine Immunlokalisierung von Myosin als Marker der terminalen Differenzierung mittels eines spezifischen Antikörpers durchgeführt. Einigen C2A1a-Zellen zeigten nach siRNA-Transfektion wieder eine Myosin-Expression (d, f).

Bei den HMGA1-knock-down-Experimente zeigte sich in C2A1a-Zellen 24 h nach siRNA-Transfektion reproduzierbar eine Reduktion beziehungsweise ein Fehlen der HMGA1a-EGFP-Fluoreszenz in den meisten Zellen (Abb. 4-20 A, Bild c', d), was auf einen effektiven HMGA1-knock-down hinwies. Dies wurde durch die Analyse der HMGA1-Proteinmenge im Westernblot bewiesen (Abb. 4-20 B), die zeigte, dass die Gesamtmenge an HMGA1 in C2C12- und C2A1a-Myoblasten deutlich unter der in nicht transfizierten C2C12-Zellen lag. Nachdem die Funktionalität des siRNA-knock-downs gezeigt wurde, konnten überprüft werden, wie sich der HMGA1-Entzug in C2A1a-Zellen auf die Expression muskelspezifischer Gene wie Myod, Myogenin, Myosin und  $\alpha$ -Aktin und des Zytokins IL-6 nach Induktion der Myogenese auswirkt (Abb. 4-20 C). Die RT-PCR-Analysen zeigten, dass es wieder zu einer detektierbaren Expression des Myogenese-Initiators Myod, des frühen Myogenesmarkers Myogenin und des späten Muskelmarkers  $\alpha$ -Aktin kam. Somit ist die HMGA1a-induzierte Repression der Myod-Expression vermutlich ein Hauptgrund für eine fehlende Induktion der Myogenese in C2A1a-Zellen. Auch die IL-6-Expression zeigte eine Reduktion, die sogar unter das Expressionniveau von IL-6 in wildtypischen C2C12-Zellen abfiel. Dabei wurden die normalen Expressionsmuster der Gene während der frühen Differenzierung fast vollständig wiederhergestellt (mit Ausnahme von Myod an Tag 1). Lediglich die Expressionsstärke fiel geringer aus. Dies deutet darauf hin, dass der Effekt des Knock-downs mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Transfektion wieder abnahm. Dies könnte an der begrenzten Stabilität der RNA-Oligos liegen, die für den Knock-down verwendet wurden. Es ist auch denkbar, dass die begrenzte Menge der RNA-Oligos, die von einem CMV-Promotor gesteuerte konstitutive HMGA1a-EGFP-Expression nicht auf Dauer kompensieren konnte.

Die Immunlokalisationen von Myosin an Tag 6 nach der Induktion zeigten, dass einige der C2A1a-Zellen nach HMGA1-knock-down auch wieder Myosin exprimierten. Eine effektive Fusion und die Bildung vielkerniger Synzytien blieben jedoch auch nach siRNA-Transfektion aus (Abb. 4-20 D, Bild c-f). In C2C12-Zellen hingegen führte die Herunterregulierung des HMGA1 sogar zu einer effektiveren Fusion von Myocyten mit einer tendenziell höheren Anzahl an Kernen innerhalb des Synzytiums (Abb. 4-20 D, Bild b).

In Wachstumsmedium proliferierten sowohl die C2C12- als auch die C2A1a-Zellen ohne Veränderung weiter und zeigten keine Differenzierungsmerkmale. Dies bewies, dass eine Differenzierungsinduktion durch den alleinigen Verlust von HMGA1, ohne jegliche äußeren Signale, in keiner der beiden Zelllinien möglich war.

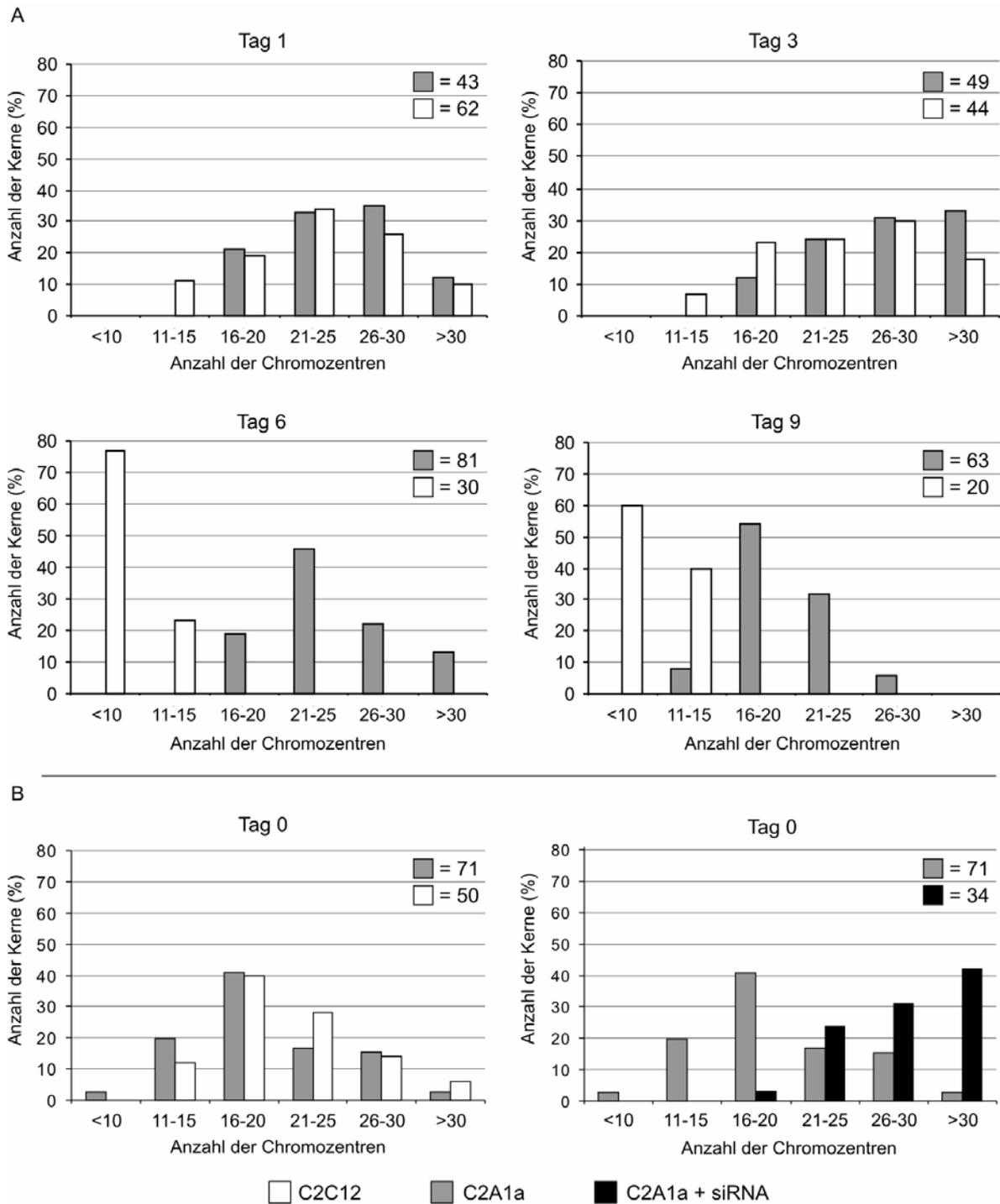
Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Herunterregulierung der HMGA1-Expression in C2A1a-Zellen mittels siRNA-knock-down die normalen Expressionsmuster muskelspezifischer Gene und des Zytokins IL-6 fast vollständig wiederherstellte. Dies beweist, dass die HMGA1a-Überexpression in C2A1a-Zellen alleine für die Repression spezifischer Gene verantwortlich ist und dass die Herunterregulierung von HMGA1 während der Differenzierung für ein normales Expressionsmuster dieser Gene zwingend notwendig ist. Die Experimente zeigten auch, dass diese HMGA1-Herunterregulierung alleine jedoch nicht ausreicht, um einen Eintritt in die Myogenese und die fortschreitende Muskeldifferenzierung zu ermöglichen.

### **4.1.4 HMGA1a beeinflusst die Heterochromatinplastizität in C2C12-Zellen**

Wie in Abb. 4-3 gezeigt wurde, ist HMGA1a-EGFP in Chromozentren angereichert. Während der Myogenese kommt es in C2C12-Zellen zu einer Fusion dieser Chromozentren und dabei zur Reduktion ihrer Anzahl (Brero et al. 2005). Ob sich eine anhaltende HMGA1a-Expression während der Differenzierung auf die Chromozentren-Fusion auswirkt, sollte durch die Quantifizierung der Chromozentren in Myoblasten und nach der Induktion der Myogenese untersucht werden. In Abb. 4-21 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Diese Ergebnisse zeigten, dass eine anhaltende HMGA1a-Expression die Fusion der Chromozentren im Verlauf der Myogenese und somit eine differenzierungsrelevante Umorganisation des Chromatins verhindert (Abb. 4-21 A). Diese Daten wurden in C2R3xG-Zellen, trotz verringerter Verweildauer der HMGA1a-Mutante am Chromatin, bestätigt (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise zeigten die Daten, dass an Tag 3 der Differenzierung die Zahl der Chromozentren zunimmt. Dies spricht für eine Dissoziation des perizentrischen Heterochromatins vor der letztendlichen Fusion in terminal differenzierten Zellen. Es wurde auch beobachtet, dass der Knock-down von HMGA1 in C2A1a-Zellen zu einer Dissoziation des Heterochromatins (Abb. 4-21 B, rechtes Diagramm). Dies unterstreicht, dass HMGA1 das Heterochromatin stabilisiert und dass die Abwesenheit von HMGA1, wie dies an Tag 3 der Myogenese der Fall ist, zu einer Dissoziation der Chromozentren führt.

Die Ergebnisse zeigen allgemein, dass HMGA-Proteine bei anhaltender Expression offensichtlich in der Lage sind, die topologische Organisation des Chromatins zu stabilisieren und dessen Umorganisation während der Differenzierung zu unterdrücken. Eine Herunterregulierung, wie an Tag 3 oder nach siRNA-knock-down in C2A1a-Myoblasten führt dagegen zur Destabilisierung Heterochromatins. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine regulierte Expression von HMGA-Proteinen für die Stabilität und Plastizität des Chromatins eine wichtige Rolle spielt.



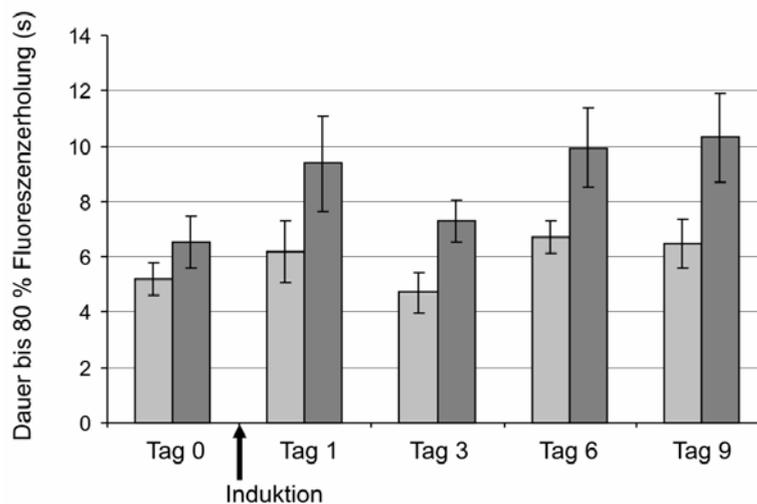
**Abb. 4-21: Verteilung der Chromozentren in C2C12- und C2A1a-Zellen**

C2C12- und C2A1a-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am darauf folgenden Tag beziehungsweise den entsprechenden Differenzierungstagen in 2% Formaldehyd fixiert. Die DNA wurde mittels Hoechst-33258 gefärbt. Die Quantifizierung der Chromozentren erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Die Anzahl der Kerne mit einer jeweils definierten Zahl an Chromozentren ist in Prozent angegeben. (A) Auszählung der Chromozentren in C2C12- (weiß) und C2A1a-Zellen (grau) an den Differenzierungstagen 1, 3, 6 und 9 nach Induktion der Myogenese. Bis einschließlich Tag 3 entsprach sich die Chromozentrenverteilung in C2C12- und C2A1a-Zellen, wobei beide Zelllinien an Tag 3 eine erhöhte Chromozentrenzahl aufwiesen. (Fortsetzung nächste Seite)

An Tag 6 und 9 wiesen C2A1a-Zellen weiterhin eine gaußsche Verteilung der Chromozentren auf, wobei die meisten Zellen zwischen 16 und 25 Chromozentren besaßen. Terminal differenzierte C2C12-Zellen zeigten nie mehr als 15 Chromozentren in einem Zellkern. (B) Auszählung der Chromozentren in C2C12- und C2A1a-Myoblasten und in C2A1a-Myoblasten nach siRNA-Transfektion (schwarz). Die Chromozentrenzahl in C2C12- und C2A1a-Myoblasten entsprachen sich in ihrer gaußschen Verteilung. Ein HMGA1-knock-down nach siRNA-Transfektion führte zu einer deutlichen Steigerung der Chromozentrenzahl

#### 4.1.5 Veränderte Dynamik von HMGA1a während der Differenzierung

In menschlichen Zellen wurde gezeigt, dass HMGA1a-Proteine hoch dynamisch sind und ihre Verweildauer am Chromatin zellzyklusabhängig variiert. An kompakten mitotischen Chromosomen weisen sie eine geringere Mobilität auf, als im Interphase-Chromatin (Harrer et al. 2004). Aufgrund der Veränderung des Heterochromatinstatus in C2C12-Zellen durch die Fusion der Chromozentren während der Differenzierung und die Inhibition dieser Fusion durch eine HMGA1a-Überexpression, sollte in dieser Arbeit die Dynamik der HMGA1a-Proteine während der Muskeldifferenzierung *in vivo* untersucht werden. Dies erfolgte mittels Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)-Messungen. Geblichen wurden in einer „region of interest“ (ROI) im Euchromatin ( $4 \mu\text{m}^2$ ) beziehungsweise im Heterochromatin ( $0,8 \mu\text{m}^2$ ). Die Fluoreszenzerholung wurde mit Zeitrafferaufnahmen vermessen und nach Phair und Misteli bestimmt (Phair et al. 2000). Als Vergleichswert wurde die Zeit bis zur 80%igen Erholung der Fluoreszenz ( $t_{80}$ ) herangezogen. Die  $t_{80}$ -Werte, gemessen an den Tagen 0, 1, 3, 6 und 9 sind in Abb. 4-22 als Balkendiagramm dargestellt und die berechneten Werte sind in Tab. 4-2 zusammengefasst.



**Abb. 4-22: Dynamik von HMGA1a-EGFP in C2A1a-Zellen während der Myogenese**

C2A1a-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, 24 h danach mit DM (Pfeil) induziert und an den Differenzierungstagen 0, 1, 3, 6 und 9 in Lebendbeobachtungskammern mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie über Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)-Messungen analysiert. Die Zeit bis zur 80%igen Erholung des Ausgangswertes der Fluoreszenz ( $t_{80}$ ) ist hier in Form eines Balkendiagrammes mit Standardabweichung dargestellt. Gemessen wurde die HMGA1a-Dynamik im Euchromatin (hellgrau, ROI =  $4 \mu\text{m}^2$ ) und im perizentrischen Heterochromatin (Chromozentren, dunkelgrau, ROI =  $0,8 \mu\text{m}^2$ ) von Interphasekernen. Die genauen Zahlenwerte sind in Tab. 4-2 angegeben.

**Tab. 4-2: Messdaten der FRAP-Analyse von HMGA1a-EGFP in C2A1a-Zellen während der Myogenese**

Der hell schattierte Bereich bezieht sich auf Messungen im Euchromatin, der dunkle auf Messungen im Heterochromatin (vergleiche Abb. 4-22). Es sind die t80-Werte in Sekunden (s) mit der jeweiligen Standardabweichung ( $\pm$ ) angegeben. Die zur Ermittlung der Fluoreszenzerholung herangezogene Anzahl an Messungen ist jeweils unter jeder Messung (n) gekennzeichnet. Der Unterschied der HMGA1a-Dynamik zwischen Eu- und Heterochromatin war an jedem der untersuchten Differenzierungstage signifikant (p). Die Signifikanz wurde mittels des student's t-test ermittelt.

Differenzierungstag	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 6	Tag 9
Euchromatin	5,2 $\pm$ 0,6 s	6,2 $\pm$ 1,11 s	4,7 $\pm$ 0,74 s	6,69 $\pm$ 0,58 s	6,47 $\pm$ 0,89 s
Messungen	n=10	n=10	n=11	n=14	n=14
Heterochromatin	6,52 $\pm$ 0,93 s	9,37 $\pm$ 1,71 s	7,28 $\pm$ 0,75 s	9,94 $\pm$ 1,45 s	10,3 $\pm$ 1,58 s
Messungen	n=10	n=11	n=17	n=16	n=15
Signifikanz	p=0,0014	p=0,0001	p=0,0001	p=0,0001	p=0,0001

Die Analyse der HMGA1a-Dynamik mittels FRAP ergab in allen Messungen eine signifikant höhere Mobilität von HMGA1a-EGFP im Euchromatin im Vergleich zum Heterochromatin. Dieser Unterschied vergrößerte sich nach Induktion der Myogenese. Allerdings zeigte sich bei längerer Inkubation in DM im Euchromatin und im Heterochromatin eine erhöhte Verweildauer von HMGA1a-EGFP. Interessanterweise kam es an Tag 3 im gesamten Chromatin zu einer Erhöhung der HMGA1a-EGFP-Mobilität. Dabei entsprach die Verweildauer am Chromatin der Verweildauer vor Induktion der Myogenese und war im Vergleich zu den Tagen 1, 6 und 9 im Mittel um  $\sim 3,37$  s reduziert. Diese Ergebnisse zeigten, dass es in C2A1a-Zellen – trotz Inhibition der terminalen Differenzierung – nach Induktion der Myogenese und innerhalb des Differenzierungsprozesses zu Veränderungen in der HMGA1a-Dynamik kam. Die erhöhte HMGA1-Mobilität an Tag 3 korreliert mit der zu diesem Zeitpunkt beobachteten Dissoziation der Chromozentren (vergleiche Abb. 4-21 A).

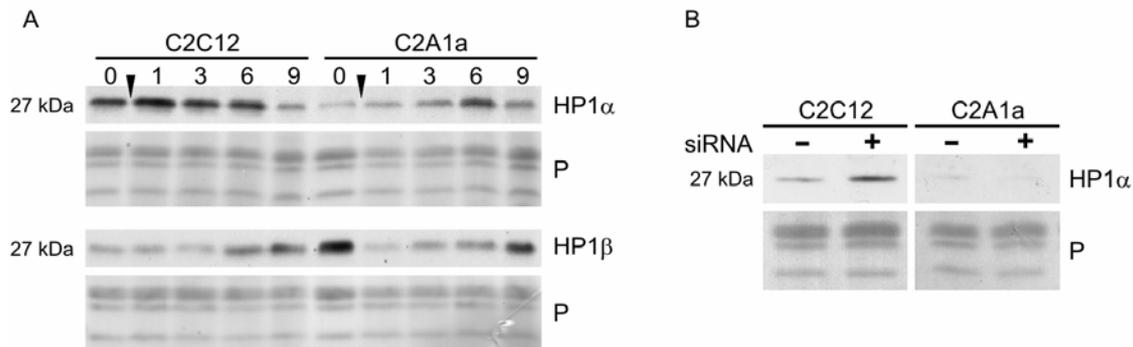
#### 4.1.6 Modulation des Heterochromatins durch HMGA1a

Die HMGA1a-Lokalisation in den Chromozentren und ihr Einfluss auf die Modulation des Heterochromatins während der Differenzierung führte zu der Frage, ob HMGA1a durch veränderte Expression anderer Strukturproteine des Chromatins die Zusammensetzung und damit einhergehend die Funktion des Chromatins verändert. Dazu wurde die Expression von Heterochromatinprotein 1 (HP1), Histon H1 und das Methyl-CpG-bindende Protein 2 (MeCP2) näher untersucht. HP1 wurde aufgrund seiner Rolle im Aufbau und der Aufrechterhaltung des Heterochromatins (Cheutin et al. 2003; Maison et al. 2004; Nielsen et al. 2001), Histon H1 wegen der Konkurrenz mit HMGA1 um DNA-Bindungsstellen (Bonney et al. 1999; Funayama et al. 2006; Hill et al. 1999) und MeCP2 wegen seiner Funktion bei der Fusion der Chromozentren (Brero et al. 2005) während der Differenzierung von C2C12-Zellen ausgewählt.

#### 4.1.6.1 Einfluss von HMGA1a auf HP1 $\alpha$

##### Anhaltende HMGA1a-Expression verändert die Expression von HP1-Proteinen

Die Expression von Heterochromatinprotein 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ ) und Heterochromatinprotein 1 $\beta$  (HP1 $\beta$ ) in C2C12- und C2A1a-Zellen während der Differenzierung wurden im Westernblot überprüft (Abb. 4-23, A). Des Weiteren wurde die HP1 $\alpha$ -Expression in beiden Zelllinien nach HMGA1a-knock-down analysiert (Abb. 4-23, B).



**Abb. 4-23: HP1-Expression während der Myogenese und nach HMGA1a-knock-down**

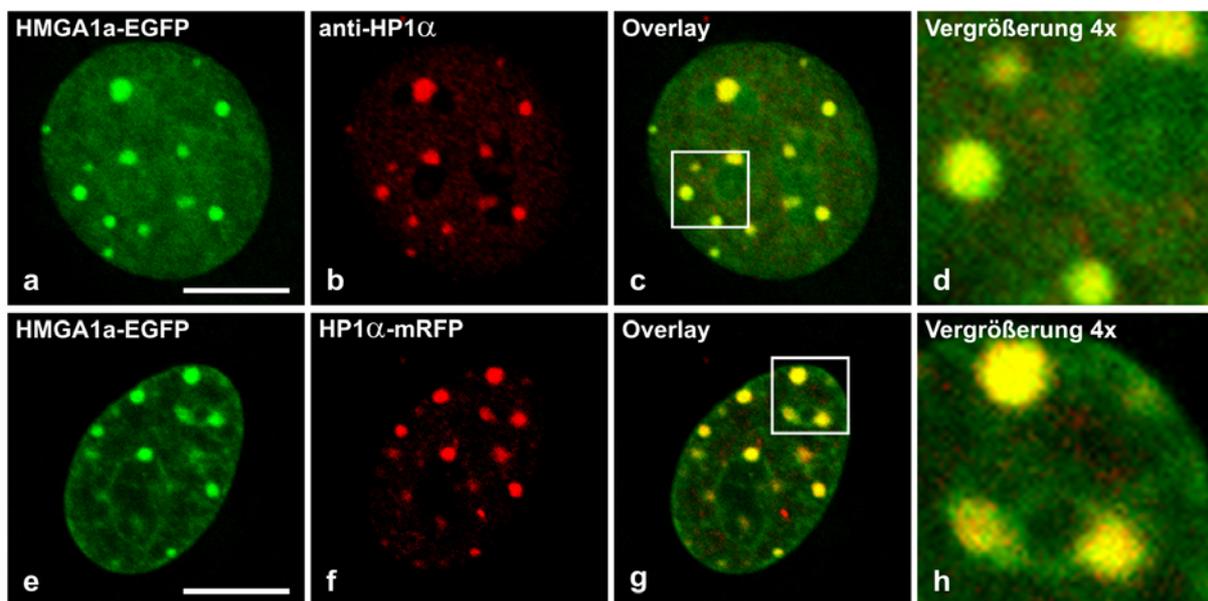
Für die Westernblot-Analysen wurden C2C12- und C2A1a-Zellen zum einen mittels DM induziert und zum anderen mit siRNA gegen HMGA1 transfiziert. An den Differenzierungstagen 0, 1, 3, 6 und 9 beziehungsweise 48 h nach der siRNA-Transfektion wurden aus beiden Zelllinien Kerne isoliert. Pro Spur wurden in einem Polyacrylamidgel  $1,5 \cdot 10^5$  Kerne elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblotet. (A) Anschließend erfolgte die Analyse der HP1 $\alpha$ - und HP1 $\beta$ -Expression während der Myogenese mittels spezifischer Antikörper. In C2C12-Zellen war HP1 $\alpha$  bis an Tag 6 gleichmäßig stark exprimiert. An Tag 9 kam es zu einer Verringerung dessen Expression. HP1 $\beta$  scheint gegenläufig zu HP1 $\alpha$  exprimiert zu sein, da es bis an Tag 3 nur eine geringfügige Expression zeigte, welche an Tag 6 zunahm und am stärksten an Tag 9 war. In C2A1a-Myoblasten kam es zu einer Verringerung der HP1 $\alpha$ -Expression und zu einer massiven Steigerung der HP1 $\beta$ -Expression. Während der frühen Differenzierung zeigte vor allem HP1 $\alpha$  Veränderungen im Expressionsmuster. Die schwarzen Pfeile markieren die Induktion der Differenzierung. (B) Der HMGA1-knock-down führte in C2C12-Zellen zu einer erhöhten HP1 $\alpha$ -Expression. In C2A1a-Zellen konnte jedoch die ursprüngliche HP1 $\alpha$ -Expression nicht hergestellt werden. Die nicht-transfizierten Kontrollzellen sind mit (-), die siRNA-transfizierten Zellen mit (+) gekennzeichnet. Die Ponceau-Färbung der Kernhistone (P) diente bei allen Westernblots als Beladungskontrolle.

Die Überexpression von HMGA1a zeigte massive Auswirkungen auf die HP1 $\alpha$ - und HP1 $\beta$ -Expression in Myoblasten. Nach Induktion der Differenzierung blieb die HP1 $\alpha$ -Expression in C2A1a-Zellen im Vergleich zu C2C12-Zellen weiterhin verringert. Erst ab Tag 6 glich sie sich wieder dem normalen Expressionsmuster an. Die HP1 $\beta$ -Expression zeigte im Verlauf der Differenzierung keine weiteren Unterschiede auf. Der Anstieg der HP1 $\alpha$ -Expression in C2C12-Zellen nach siRNA-Transfektion untermauert den direkten und spezifischen Einfluss von HMGA1-Proteinen auf die Expressionsregulation dieses Heterochromatinproteins.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Überexpression von HMGA1a die Expression der Heterochromatinproteine HP1 $\alpha$  und HP1 $\beta$  hauptsächlich in Myoblasten und während der frühen Differenzierung und somit die Zusammensetzung des Chromatins in diesem Zeitraum beeinflussen. Dadurch nimmt HMGA1 indirekten Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Heterochromatin-Integrität und auf die HP1-vermittelten Auswirkungen epigenetischer Markierungen auf die Genexpression.

### Kolokalisation von HP1 und HMGA1a

Aufgrund der bekannten Anreicherung von HMGA-Proteinen (Harrer et al. 2004; Narita et al. 2006) und HP1 (James et al. 1989; Wreggett et al. 1994) im Heterochromatin, wurden beide Proteine in C2C12-Zellen auf eine mögliche Kolokalisation hin überprüft. Hierzu wurde in C2A1a-Zellen zum einen eine Immunlokalisation des endogenen HP1 $\alpha$  durchgeführt (Abb. 4-24 a-d) und zum anderen das rot fluoreszierende Fusionsprotein HP1 $\alpha$ -mRFP exprimiert um dessen Lokalisation ebenfalls *in vivo* zu untersuchen (Abb. 4-24 e-h). Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde HP1 $\alpha$  aus dem pHP1 $\alpha$ -EGFP-Vektor (hergestellt von Monika Schütz) über PCR unter Verwendung der Phusion-Polymerase amplifiziert und in den pmRFP-N2-Vektor ligiert (siehe Vektorkarten auf beiliegender CD). Positive Klone wurden durch Sequenzierung verifiziert. In Abb. 4-24 sind die Lokalisations-Analysen dargestellt.



**Abb. 4-24: Kolokalisation von HMGA1a und HP1 $\alpha$**

C2A1a-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am darauf folgenden Tag fixiert, oder mit dem Plasmid pHP1 $\alpha$ -mRFP transfiziert. Die Immunlokalisation von HP1 $\alpha$  erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (b). Die Immunlokalisationen wurden nach dem Einbetten in Mowiol (a-d) und die transfizierten Zellen in Lebendbeobachtungskammern direkt (e-h) am konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dabei zeigten HMGA1a-EGFP (a und e) und endogenes HP1 $\alpha$  (b) oder HP1 $\alpha$ -mRFP (f) eine Anreicherung und Kolokalisation im perizentrischen Heterochromatin (c, d, g und h). Die Bilder d und h zeigen eine 4-fache Vergrößerung der Ausschnitte in Bild c beziehungsweise g. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu$ m.

Diese Ergebnisse bestätigten sowohl in fixierten, wie auch in lebenden Zellen die Anreicherung der beiden Proteine in den Chromozentren und deren dortige Kolokalisation.

#### **4.1.6.2 Nachweis der Kooperation von HMGA1a und HP1 über Bimolekular Fluorescence Complementation (BiFC)**

Die Kolokalisation von HMGA1a und HP1 $\alpha$  im perizentrischen Heterochromatin warf die Frage nach einer potentiellen Interaktion der beiden Proteine auf. Um dieser zu beantworten wurde die Methode der Bimolekular Fluorescence Complementation (BiFC) (Grinberg et al. 2004; Hu et al. 2002; Kerppola 2006) gewählt. Bei BiFC werden zwei Proteine an jeweils eine nicht-fluoreszierende Hälfte eines Fluorophors fusioniert. Die Bildung eines funktionellen Fluorophors durch Komplementierung der beiden Fluorophor-Hälften ist ein Indikator für die Interaktion der Fusionsproteine in lebenden Zellen (Hu et al. 2002). BiFC kommt zustande, wenn die YFP-Fragmente durch ihre Fusionspartner zusammengeführt werden, sofern diese innerhalb eine Distanz <100 Å miteinander assoziieren (Hu et al. 2002).

Um zu testen, ob dieses System zur Untersuchung der Interaktion von Chromatinproteinen geeignet ist, wurde die Interaktion zwischen den einzelnen HP1-Varianten untersucht. Von diesen ist bekannt, dass sie miteinander über ihre Chromoshadow-Domäne dimerisieren können (Brasher et al. 2000). Dafür wurden die vollständigen, kodierenden Sequenzen von HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  und HP1 $\gamma$  jeweils in die Vektoren des BiFC-Systems (pBiFC-YC155 und pBiFC-YN155, von T. Kerppola) ligiert und einzelne positive Klone mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung verifiziert. Um die Interaktion *in vivo* nachzuweisen, wurden HepG2-Zellen mit einer Kombination der jeweils zu untersuchenden Interaktionspartner mit FuGene<sup>®</sup> HD (Roche) transfiziert (1 $\mu$ g:1 $\mu$ g). Die Zellen wurden nach der Transfektion zwischen 18-24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis sie unter dem konfokalen Laser-scanning Mikroskop in Lebendbeobachtungskammern analysiert wurden. Zusätzlich wurden mit je 2 Deckgläsern der gleichen Transfektionsansätze eine Immunlokalisation der beiden Fusionsproteine mittels spezifischer Antikörper gegen die zusätzlich in den Fusionproteinen enthaltenen HA- und Flag-Markierungen durchgeführt. Dies diente der Überprüfung der Transfektion und zur indirekten Kontrolle der Expressionsstärke der einzelnen Konstrukte in einer Zelle. Da festgestellt wurde, dass eine zu starke Expression eines oder beider Fusionsproteine zu einem falsch-positiven BiFC-Signal führen kann, wurden Zellen mit unterschiedlicher Expressionsstärke analysiert.

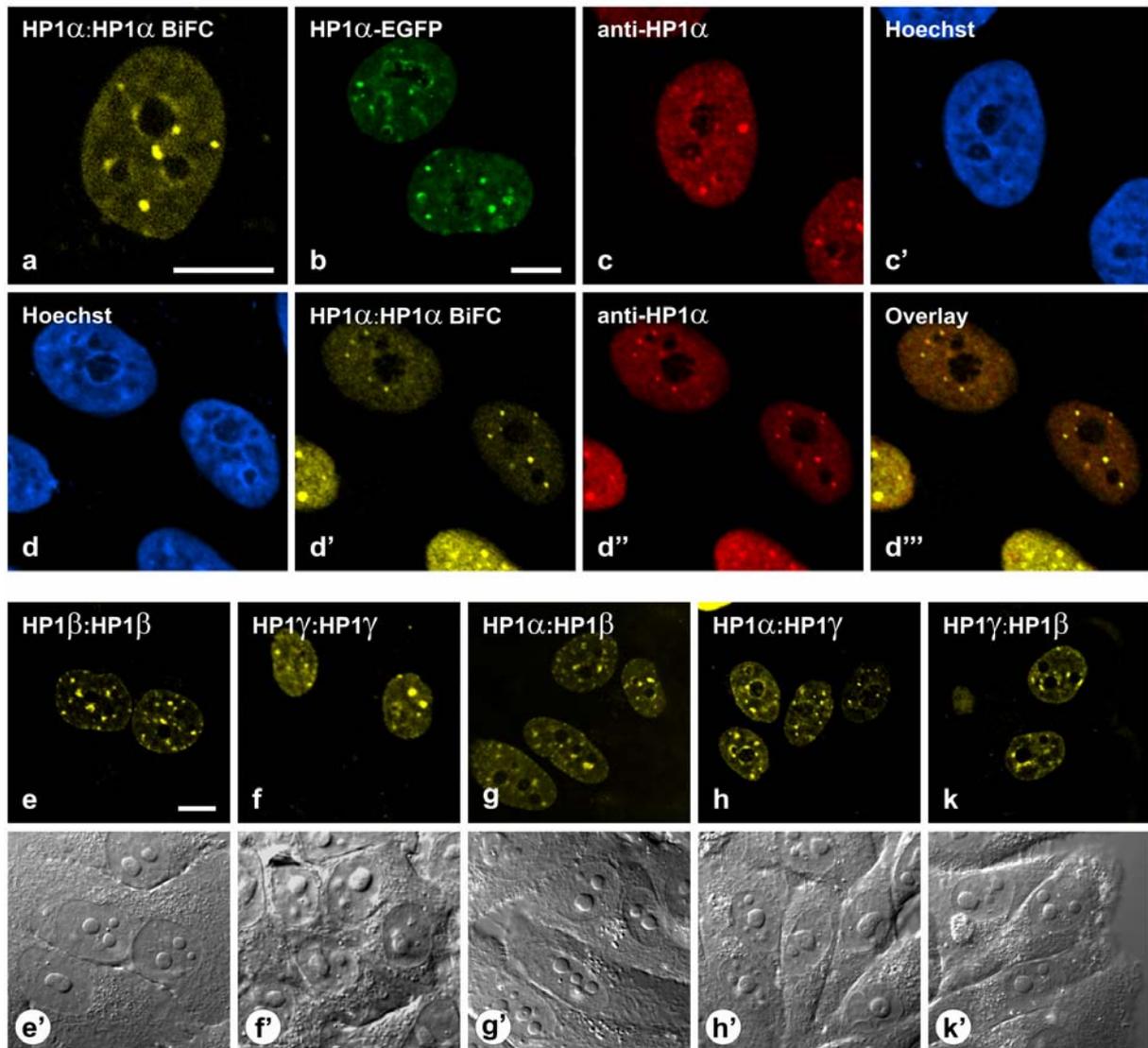
Es folgte eine statistische Auswertung, um die Signifikanz der erhaltenen BiFC-Signale nach folgenden Kriterien zu beurteilen:

1. Lebende Zellen, welche ein BiFC-Signal zeigten, mussten in ihrer Morphologie gesund aussehen. Dies wurde mikroskopisch im Interferenzkontrast kontrolliert.
2. Das BiFC-Signal sollte ein klar definierbares und reproduzierbares Muster aufweisen.
3. Eine Varianz in der Stärke des BiFC-Signals aufgrund unterschiedlicher Expressionsstärken der Konstrukte in unterschiedlichen Zellen deutete ebenfalls auf eine reale Interaktion hin (Nachweis über Immunlokalisation).
4. In den Immunlokalisationen mussten in BiFC-positive Zellen beide Konstrukte nachweisbar sein und zu extreme Überexpressionen (in bis zu 25-30% der Fälle) wurden als unspezifisches BiFC-Signal statistisch außer Acht gelassen.

Die Konstrukt-Kombinationen sind im Folgenden immer in der Reihenfolge pBiFC-YC155:pBiFC-YN155 dargestellt. In Abb. 4-25 auf der folgenden Seite sind die Ergebnisse der Interaktionsstudien der einzelnen HP1-Varianten zusammengefasst.

Die BiFC-Experimente mit HP1 $\alpha$  zeigten eine detektierbare Dimerisierung von HP1 $\alpha$  in 93% der transfizierten Zellen. Das Muster dieser stimmte mit dem endogenen HP1 $\alpha$ -Verteilungsmuster und mit der Lokalisation von transfiziertem HP1 $\alpha$ -EGFP *in vivo* überein. Die Abb. 4-25 e-k zeigen, dass alle Kombinationsmöglichkeiten der HP1-Varianten zu einem BiFC-Signal führten. Die intranukleären Lokalisationen unterschieden sich dabei voneinander. Kombinationen unter der Beteiligung von HP1 $\beta$  wiesen neben der Lokalisation in distinkten Punkten eine vermehrt diffuse Verteilung im gesamten Nukleus auf. Bei der Kombination HP1 $\gamma$ :HP1 $\gamma$  war die diffuse Verteilung im Kern am stärksten. Dies korreliert mit publizierten Daten zu den Lokalisationen der einzelnen HP1-Varianten (Verschure et al. 2005).

Diese Ergebnisse zeigten, dass das BiFC-System geeignet ist, um die Kooperation von Heterochromatinproteinen zu untersuchen und zeigten eine natürliche Lokalisation der BiFC-Dimere, was dafür spricht, dass HP1-Proteine in der lebenden Zelle überwiegend als Dimere vorliegen (Brasher et al. 2000).



**Abb. 4-25: Nachweis der Interaktion von HP1-Varianten mit dem BiFC-System**

Die HepG2-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, am Folgetag mit den verschiedenen HP1-BiFC-Vektorkonstrukten transfiziert. Wie oben beschrieben wurden die Zellen 18-24 h nach der Transfektion *in vivo* und mittels Immunlokalisation der HA- und Flag-markierten Fusionsproteine im konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Bilder zeigen HP1 $\alpha$ :HP1 $\alpha$ -BiFC (a) und Lokalisation von HP1 $\alpha$ -EGFP (b) in lebenden HepG2-Zellen; Immunlokalisation von HP1 $\alpha$  und Hoechst-Färbung der DNA (c und c'); DNA-Färbung (d) in HepG2 mit HP1 $\alpha$ :HP1 $\alpha$ -BiFC (d') und Immunlokalisation von HP1 $\alpha$  (d'') und Overlay des BiFC- und des Immunlokalisationssignals von HP1 $\alpha$  (d'''); BiFC-Signale der verbliebenen Kombinationsmöglichkeiten der HP1-Varianten *in vivo*: HP1 $\beta$ :HP1 $\beta$  (e), HP1 $\gamma$ :HP1 $\gamma$  (f), HP1 $\alpha$ :HP1 $\beta$  (g), HP1 $\alpha$ :HP1 $\gamma$  (h) und HP1 $\gamma$ :HP1 $\beta$  (k). In der untersten Reihe sind die zu e-k gehörigen Interferenzkontrast-Aufnahmen dargestellt (e'-k'). Eichstriche entsprechen 10  $\mu$ m.

### Chromoshadowdomäne und Hinge-Region vermitteln die HP1 $\alpha$ -Dimerisierung

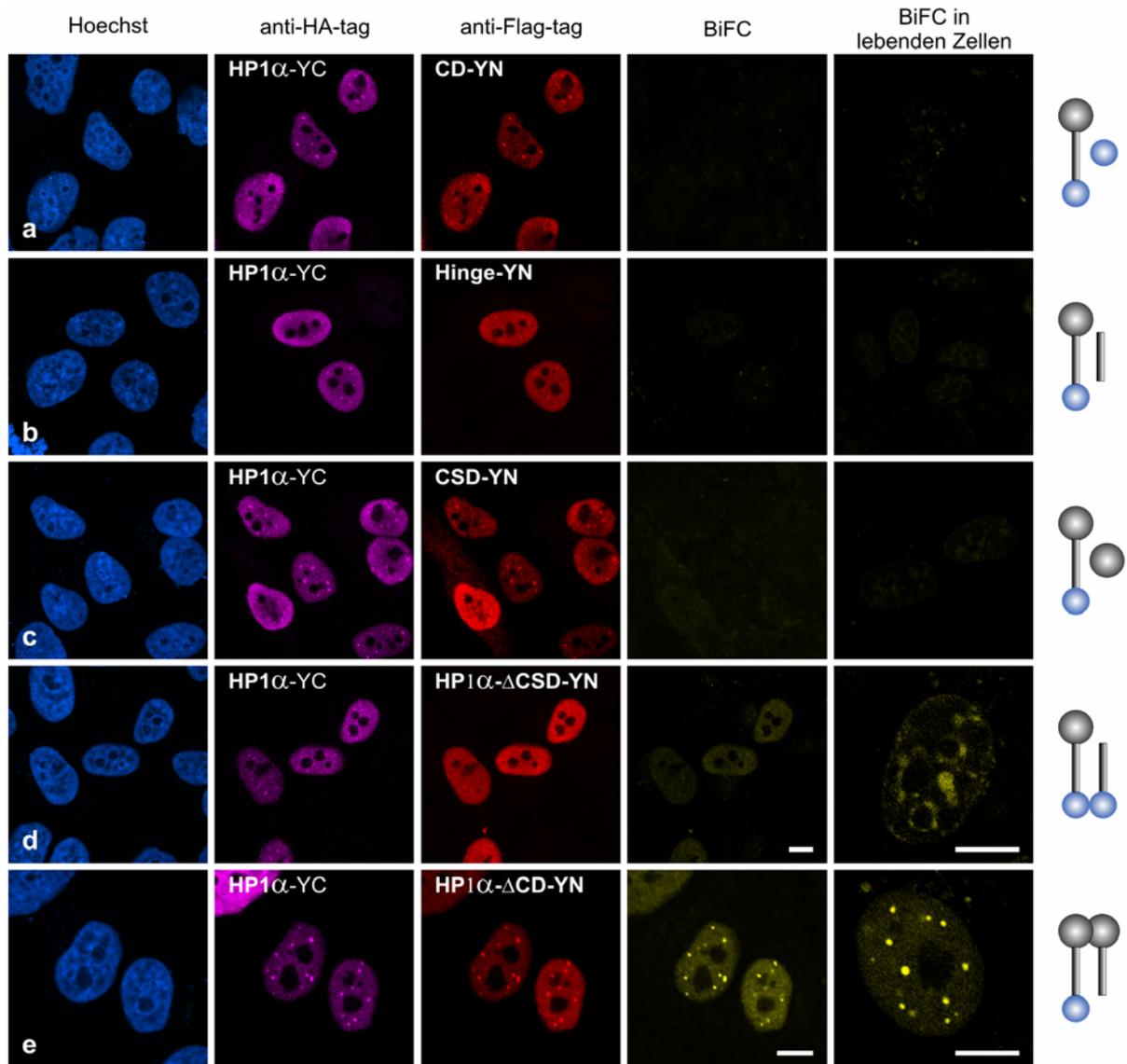
Nachdem sich das BiFC-System als eine geeignete Methode erwies, Interaktionen von Chromatinproteinen nachzuweisen, war von Interesse, ob die Identifikation einzelner Interaktionsdomänen damit möglich ist. Zu diesem Zweck wurden die einzelnen funktionellen Domänen des HP1 $\alpha$  und Kombinationen daraus über Phusion-PCR aus dem pHP1 $\alpha$ -EGFP-Plasmid amplifiziert und über EcoRI-Schnittstellen in den pBiFC-YN155-Vektor ligiert. Positive Klone wurden per Kolonie-PCR und Sequenzierung überprüft. Die hergestellten Konstrukte sind in Tab. 4-3 aufgelistet.

**Tab. 4-3: Konstrukte der einzelnen HP1-Domänen im pBiFC-YN155-Vektor**

Aufgelistet sind die einzelnen HP1-Domänen beziehungsweise Domänen-Kombinationen, die in den pBiFC-YN155 kloniert wurden. Rechts neben der Konstruktbezeichnung sind jeweils die erste und letzte Aminosäure des HP1 $\alpha$  angegeben, welche in dem klonierten Konstrukt vorhanden sind.

Domänen	Konstruktbezeichnung	Aminosäuren
Chromodomäne (CD)	pCD-BiFC-YN	20-69
Hinge-Region	pHinge-BiFC-YN	70-121
Chromoshadowdomäne (CSD)	pCSD-BiFC-YN	122-175
Chromodomäne + Hinge-Region	p $\Delta$ CSD-BiFC-YN	20-121
Hinge-Region + Chromoshadowdomäne	p $\Delta$ CD-BiFC-YN	70-175

Die Ergebnisse der BiFC-Analyse der einzelnen HP1 $\alpha$ -Domänen sind in Abb. 4-26 dargestellt. Die Kombination von HP1 $\alpha$  mit den einzelnen Domänen alleine führten nie zu einem detektierbaren BiFC-Signal in den HepG2-Zellen. Die reine CSD (Abb. 4-26 Reihe c, CSD-YN) wies eine HP1 $\alpha$ -typische Lokalisation trotz einer fehlenden Dimerisierung mit dem vollständigen HP1 $\alpha$  auf. Dies lässt darauf schließen, dass die reine Interaktion mit dem methylierten H3K9 über die CD (Lachner et al. 2001) nicht alleinig für die HP1 $\alpha$ -Positionierung verantwortlich sein kann. Eine Interaktion mit weiteren Chromatinproteinen über die CSD ist daher vermutlich maßgeblich an der HP1 $\alpha$ -Lokalisation beteiligt (Eskeland et al. 2006). Eine schwache Interaktion mit HP1 $\alpha$  konnte unter Verwendung der  $\Delta$ CSD-Mutante nachgewiesen werden. Diese wich allerdings in ihrer Lokalisation vom normalen Muster der HP1 $\alpha$ -Verteilung deutlich ab, was die Beteiligung der CSD bei der HP1-Lokalisation untermauert. Ein starkes Interaktionssignal ergab lediglich das  $\Delta$ CD-Konstrukt zusammen mit dem kompletten HP1 $\alpha$ . In diesem Falle stimmte auch das Verteilungsmuster der BiFC-Dimere mit der Lokalisation des endogenen HP1 $\alpha$  überein (vergleiche Abb. 4-24).



**Abb. 4-26: Chromoshadowdomäne und Hinge-Region vermitteln die HP1 $\alpha$ -Dimerisierung**

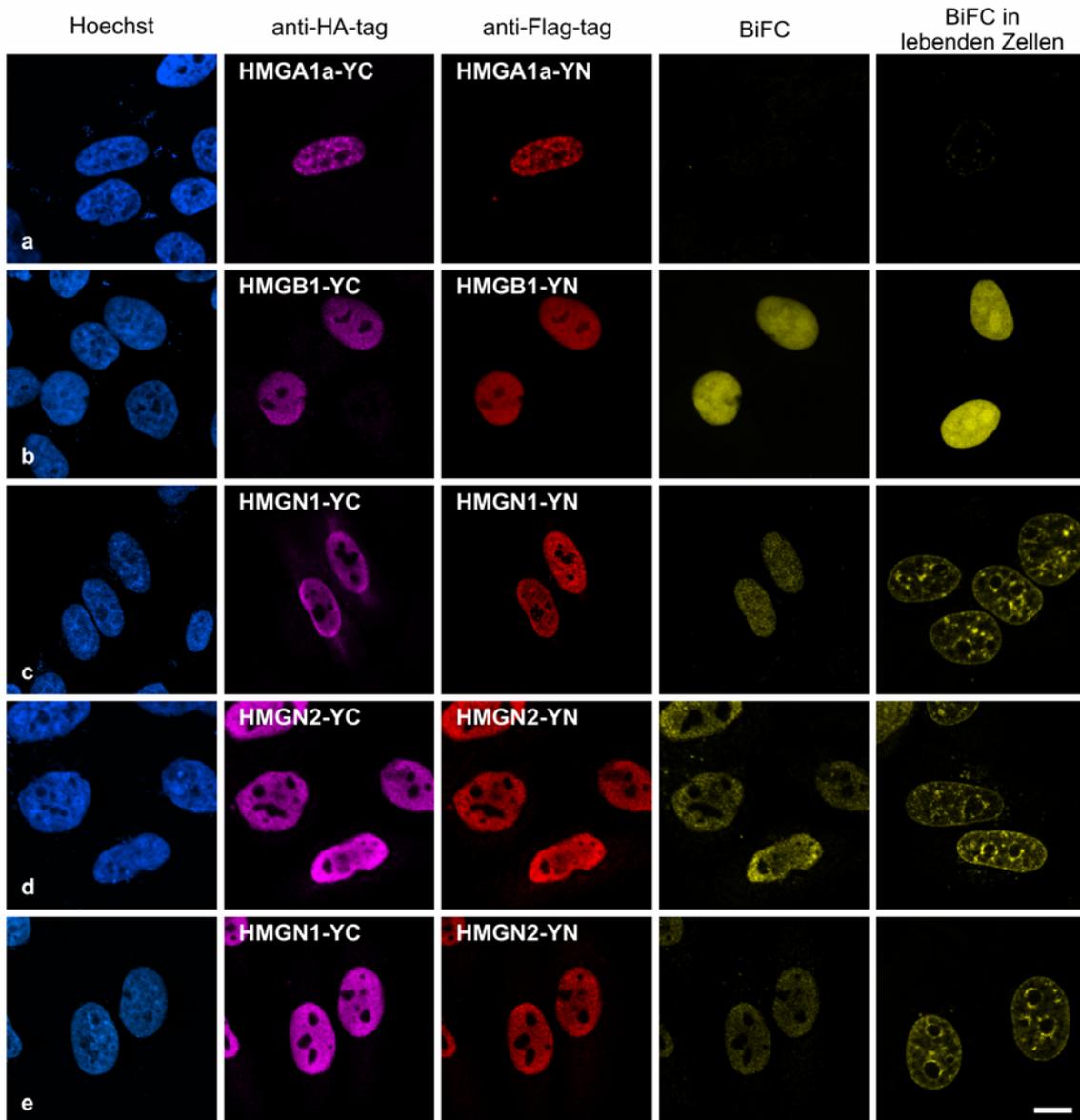
Die einzelnen Domänenkonstrukte wurden jeweils in Kombination mit dem kompletten HP1 $\alpha$ -Konstrukt pHP1 $\alpha$ -BiFC-YC (1 $\mu$ g:1 $\mu$ g) in HepG2-Zellen transfiziert. Nach 18-24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Auswertung der BiFC-Signale in lebenden Zellen und parallel dazu die Kontrolle der Transfektion mittels Immunlokalisation der Fusionsprotein-Konstrukte über HA- und Flag-tag. Sowohl die lebenden Zellen, als auch die Immunlokalisationen wurden am konfokalen Mikroskop analysiert. Dargestellt sind in der ersten Spalte jeweils die DNA-Färbungen mittels Hoechst-33258, in der zweiten die Immunlokalisation des HA-markierten HP1 $\alpha$ -BiFC-YC und in der dritten die Immunlokalisation des Flag-markierten BiFC-Konstruktes (spezifische Bezeichnung siehe Bildbeschriftung). Spalte vier zeigt das detektierte BiFC-Signal in den fixierten Zellen und Spalte fünf das BiFC-Signal in lebenden Zellen. Die Reihen zeigen die Konstruktkombinationen: HP1 $\alpha$ :CD (a), HP1 $\alpha$ :Hinge-Region (b), HP1 $\alpha$ :CSD (c), HP1 $\alpha$ : $\Delta$ CSD (d) und HP1 $\alpha$ : $\Delta$ CD (e). Der Eichstrich entspricht jeweils 10  $\mu$ m. Rechts neben den Fluoreszenzaufnahmen sind schematische Modelle des HP1 $\alpha$  und dessen Domänen dargestellt. Die graue Kugel stellt die Chromoshadowdomäne, die blaue die Chromodomäne dar. Der graue Balken markiert die Hinge-Region. Interaktionen sind durch engeren Kontakt der Schemata verdeutlicht.

### **Nachweis der Dimerisierung von HMG-Proteinen mittels BiFC**

Neben den Interaktionen zwischen den HP1-Varianten untereinander, wurde auch eine potentielle Homodimerisierung der HMG-Proteine getestet. Hierzu wurde neben den bereits beschriebenen Konstrukten noch die kodierende Sequenzen von HMGB1, HMGN1 und HMGN2 in die BiFC-YC155 und BiFC-YN155 kloniert und via Sequenzierung überprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-27 dargestellt.

Die BiFC-Analysen zeigten, dass HMGB1, HMGN1 und HMGN2 Homodimeren bilden können (Abb. 4-27 b, c und d). Des Weiteren konnte eine Heterodimerisierung von HMGN1 und HMGN2 detektiert werden (Abb. 4-27 e). Dagegen zeigte HMGA1a keine Homodimerisierung. Die HMGN-Homo- und -Heterodimere wiesen immer das gleiche Verteilungsmuster auf. Dabei trat eine Anreicherung hauptsächlich an der Kernperipherie und um die Nukleolen auf. Dieses Muster entsprach auch der natürlichen Lokalisation des HMGN1 und HMGN2. Bei HMGB1 konnte eine homogene Verteilung der BiFC-Homodimere im Kern und eine Anreicherung im Nukleolus festgestellt werden, wobei die nukleoläre Lokalisation durch die Immunlokalisationen nicht bestätigt werden konnte, was vermutlich an der Zugänglichkeit der dichteren Nukleolusstruktur für die Antikörper liegt. Die Lokalisation des HMGB1-BiFC-Homodimers entsprach der bekannten Lokalisation aus Experimenten mit HMGB1-EGFP (Pallier et al. 2003).

Diese Ergebnisse zeigten, dass HMG-Proteine, mit Ausnahme von HMGA1a, Homodimere und teilweise Heterodimere bilden können. Des Weiteren beweisen sie, dass BiFC für die Analyse der Interaktionen von Chromatinproteinen geeignet ist.



**Abb. 4-27: Nachweis von Dimerisierung bei HMG-Proteinen mittels BiFC**

HepG2-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am folgenden Tag mit den in der Abbildung gekennzeichneten BiFC-Vektor-Kombinationen transfiziert. 18-24 h danach wurden die Zellen lebend und per Immunlokalisation der HA- und Flag-markierten Fusionsproteine analysiert. Dabei zeigte sich die HMGA1a:HMGA1a-Kombination keine Homodimerisierung (a). Dagegen konnte sowohl im Falle von HMGB1 (b), als auch bei HMGN1 (c) und HMGN2 (d) eine Homodimerisierung detektiert werden. HMGN1 und HMGN2 zeigten auch eine Heterodimerisierung.

### HMGA1a interagiert mit HP1

Nachdem der Nachweis der HP1- und HMG-Dimerisierung bewies, dass das BiFC-System zu Analyse von Kooperationen zwischen Heterochromatinproteinen geeignet ist, sollten eine potentielle Interaktion zwischen HP1 und HMGA1a untersucht werden. Bei dieser Analyse wurden Kontrollexperimente mit HMGA2, einem trunkeierten HMGA1a-Konstrukt (HMGA1a $\Delta$ C) – dessen saurer C-Terminus deletiert wurde – und der DNA-Bindungsmutante des HMGA1a (HMGA1a-R3xG), deren drei AT-Hooks mutiert wurden, durchgeführt.

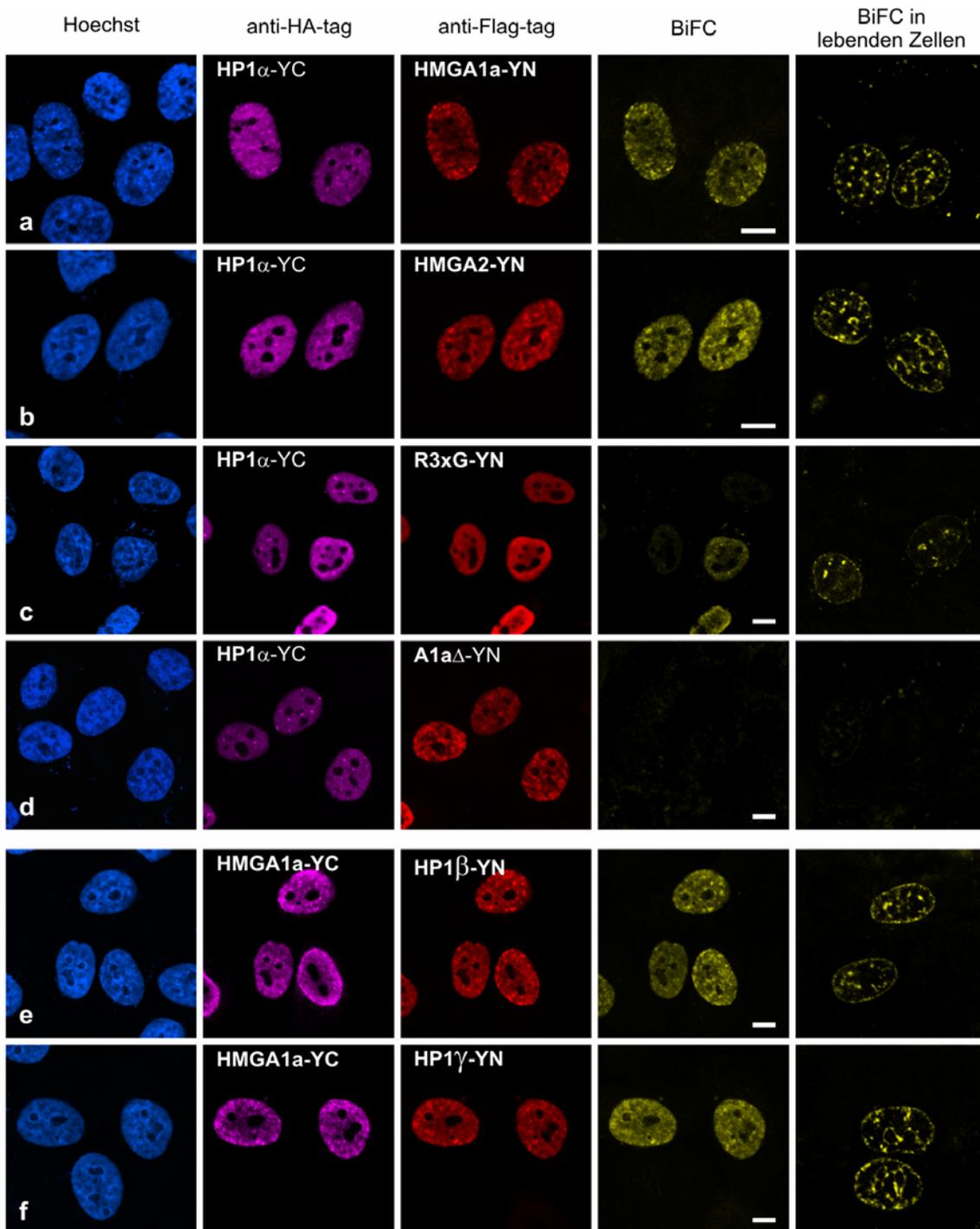
Weitere getestete HMG-Proteine waren, HMGB1 und HMGN1. Auch die Interaktion von HMGA1a mit HP1 $\beta$  und HP1 $\gamma$  wurden mittels BiFC untersucht. In Tab. 4-4 sind die verwendeten HMG-Konstrukte mit den Ursprungsplasmiden der kodierenden Sequenz aufgeführt.

**Tab. 4-4: Konstrukte der einzelnen HMG-Protein und HMGA1a-Mutanten in den BiFC-Plasmidvektoren**

Ursprungsplasmid	BiFC-Konstrukte
phHMGA1a-EGFP	phHMGA1a-BiFC-YC / -YN
phHMGA1a-R3xG-EGFP	pR3xG-BiFC-YC / -YN
phHMGA1a-EGFP	phHMGA1a $\Delta$ C-YC / -YN
phHMGB1-EGFP	phHMGB1-BiFC-YC / -YN
phHMGN1-EGFP	phHMGN1-BiFC-YC / -YN
phH1.5-EGFP	phH1.5-BiFC-YC / -YN

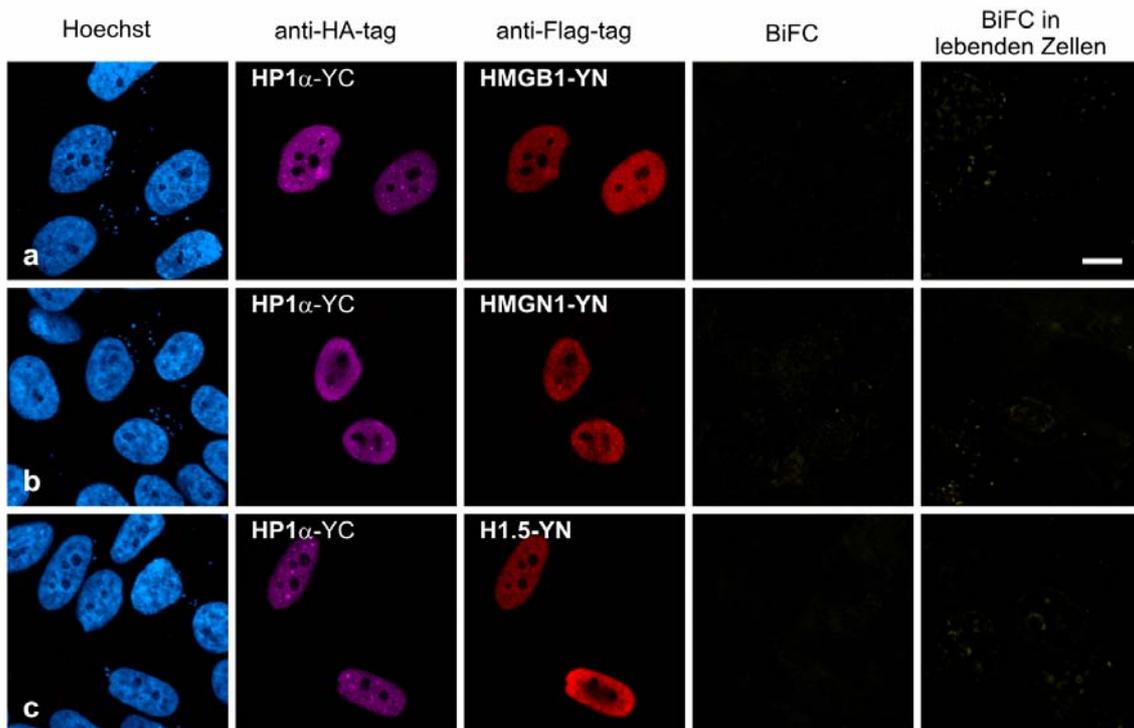
Die Ergebnisse der BiFC-Analysen sind auf der nächsten Seite in Abb. 4-28 dargestellt. Die detektierte BiFC-Fluoreszenz von HP1 $\alpha$  zusammen mit HMGA1a beziehungsweise HMGA2 waren vergleichbar in Stärke und Lokalisation. Dabei wiesen die HMGA:HP1 $\alpha$ -Heterodimere im Vergleich zum endogenen HP1 $\alpha$  eine veränderte Lokalisation auf. Dabei glich das beobachtete Muster der normalen Verteilung von HMGA in HepG2-Zellen. Diese Relokalisation des HP1 $\alpha$  in den BiFC-Experimenten könnte dabei durch dessen potentiell schwache Bindung an methyliertes H3K9 (Eskeland et al. 2006; Hiragami et al. 2005) begünstigt werden. In den Immunlokalisationen wurde das Verteilungsmuster der BiFC-Heterodimere grundsätzlich verändert, was möglicherweise auf Fixierungsmethode (2% Formaldehyd) und/oder Permeabilisierung der Zellen zurückzuführen ist. In lebenden Zellen waren die erhaltenen Signale und Verteilungsmuster einer bestimmten Konstrukt-Kombination jedoch reproduzierbar in ~91-100% der transfizierten Zellen zu detektieren.

Bei Verwendung der R3xG-DNA-Bindungsmutante des HMGA1a wurde ebenfalls noch ein BiFC-Signal erkennbar, allerdings schwächer und lediglich in 33% der transfizierten Zellen. Nach Deletion des sauren C-Terminus des HMGA1a (HMGA1a $\Delta$ C) konnte keine Interaktion mit HP1 $\alpha$  mehr nachgewiesen werden. Kotransfektionen von HP1 $\alpha$  mit HMGB1, HMGN1, oder Histon H1.5 ergaben kein detektierbares BiFC-Signal (Abb. 4-29a-c).



**Abb. 4-28: Interaktionen zwischen HP1-Proteinen und HMGA1a**

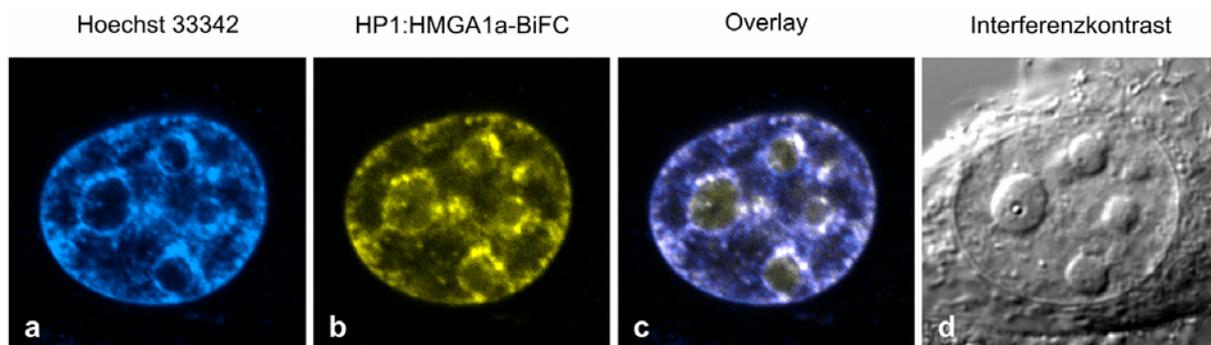
Die Transfektionen der HP1 $\alpha$ - und HMG-Konstrukte erfolgte wie bereits beschrieben. Nach 18-24 h erfolgten die mikroskopische Analyse und die Transfektionskontrolle via Immunlokalisation. Die Art der Darstellung entspricht der in Abb. 4-25 gezeigten. In den einzelnen Reihen sind BiFC-Kombinationen aus HP1 $\alpha$  und HMGA1a (a), HMGA2 (b), der HMGA1a-Bindungsmutante HMGA1a-R3xG (c) und HMGA1a $\Delta$ C (d), in welchem der saure C-Terminus des HMGA1a deletiert wurde, dargestellt. Gezeigt ist auch die Interaktion von HMGA1a mit HP1 $\beta$  (e) und HP1 $\gamma$  (f). Der Eichstrich entspricht 10  $\mu$ m. HMGA1a zeigte mit allen HP1-Varianten, sowie HMGA2 mit HP1 $\alpha$ , ein spezifisches BiFC-Signal. In der Kombination HMGA1a-R3xG:HP1 $\alpha$  wurde lediglich selten ein schwaches BiFC-Signal detektiert. HMGA1a $\Delta$ C zeigte keine Interaktion mit HP1 $\alpha$ .



**Abb. 4-29: HP1 $\alpha$  interagiert nicht mit HMGB1, HMGN1 oder Histon H1.5**

Die Transfektionen der HP1 $\alpha$ - und HMG-Konstrukte erfolgte wie bereits beschrieben. Nach 18-24 h erfolgten die mikroskopische Analyse und die Transfektionskontrolle via Immunlokalisation. Die Art der Darstellung entspricht der in Abb. 4-26 gezeigten. Gezeigt sind die Interaktion von HP1 $\alpha$  mit HMGB1 (a), HMGN1 (b), oder Histon H1.5. Bei keiner der Kombinationen konnte ein BiFC-Signal detektiert werden

Um zu überprüfen, ob das HP1 $\alpha$ :HMGA1a-BiFC-Heterodimer *in vivo* eine Kolokalisation mit dem der DNA aufweist, wurden HepG2-Zellen nach der Kotransfektion mit pHP1 $\alpha$ -BiFC-YC und pHMGA1a-BiFC-YN mit Hoechst-33342 behandelt (Abb. 4-30). Da dieser Farbstoff durch die Plasmamembran lebender Zellen diffundiert, ist damit eine DNA-Färbung *in vivo* möglich. Diese musste jedoch rasch erfolgen, da das Hoechst-33342 zu einer Verdrängung des BiFC-Komplexes führte, was bereits bei HMGA-Fusionsproteinen beobachtet wurde.



**Abb. 4-30: Lokalisation von HP1 $\alpha$ :HMGA1a-BiFC-Dimeren im Heterochromatin**

Abbildungslegende siehe folgende Seite

### **Abbildungslegende zu Abb. 4-30 vorhergehende Seite:**

HepG2-Zellen wurden ausgesät, 24 h danach mit einer Kombination der Vektoren phHP1 $\alpha$ -BiFC-YC und phHMGA1a-BiFC-YN (je 1  $\mu$ g) transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurde 10 $\mu$ g/ml Hoechst-33342 (Stammlösung: 10mg/ml in PBS, Sigma) für 1 min zum Kultivierungsmedium gegeben, die Zellen danach kurz in Medium gewaschen und in Lebend-Beobachtungskammern unverzüglich am konfokalen Mikroskop analysiert. Dargestellt ist die Färbung der DNA mit Hilfe von Hoechst 33342 (a), das HP1 $\alpha$ :HMGA1a-BiFC-Signal (b), eine Übereinanderlagerung der Bilder a und b (c) und das korrespondierende Interferenzkontrastbild.

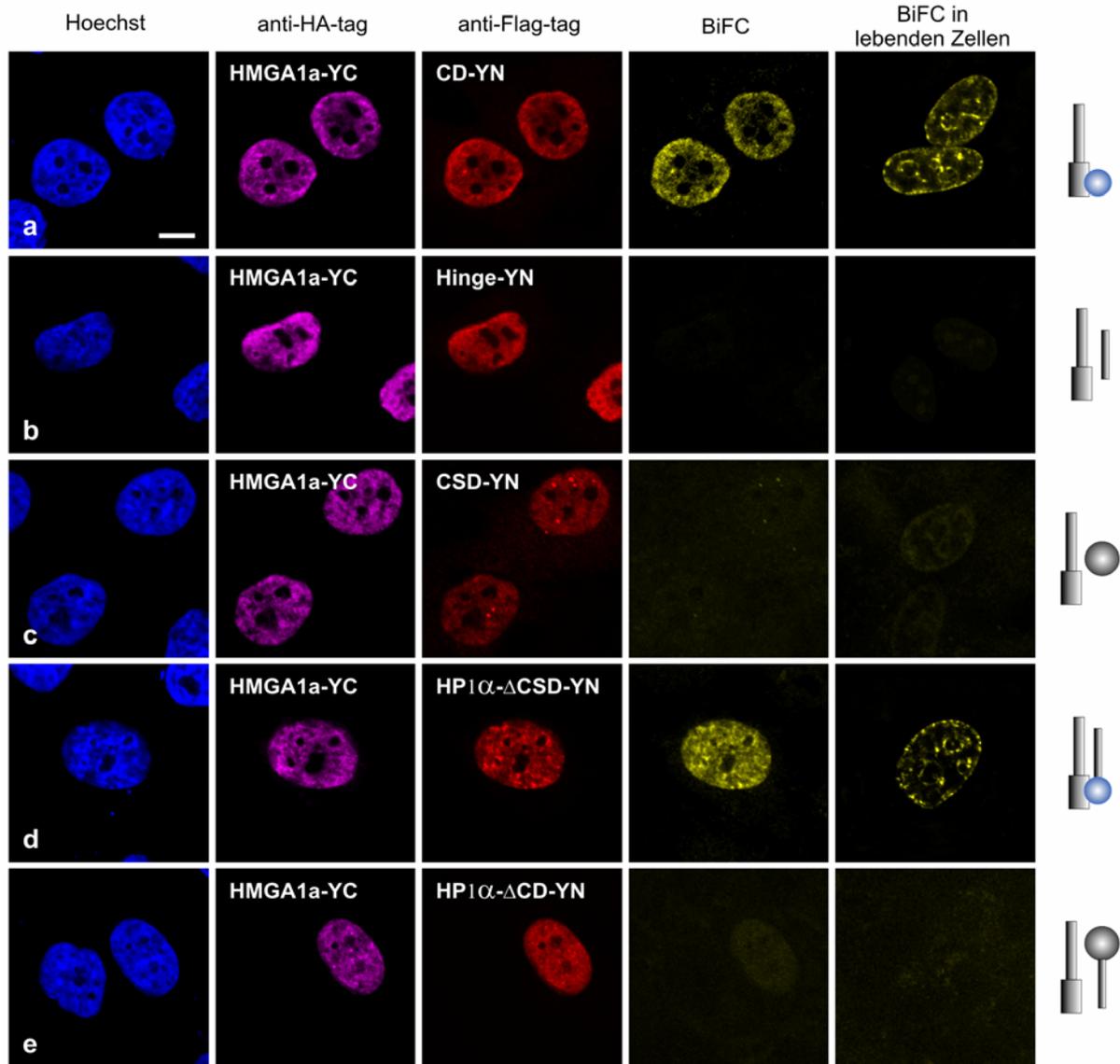
Die Kolo-kalisation des HP1 $\alpha$ :HMGA1a-BiFC-Signals mit der DNA-Färbung durch Hoechst-33342 zeigte, dass die HP1 $\alpha$ :HMGA1a-Heterodimere *in vivo* vollständig an der DNA binden und im Heterochromatin angereichert sind, was in beiden Fällen der natürlichen Verteilung der endogenen Proteine entspricht.

Salzextraktions-Assays zeigten, dass HP1, trotz seiner relativ schwachen Bindung an H3K9me (Eskeland et al. 2006), in Kernextrakten eine hohe Affinität zum Chromatin aufweisen. Es gibt verschiedene Spekulationen über die Verstärkung dieser Bindung durch eine Interaktion von HP1 mit der Kerndomäne des Histon H3, mit RNA und/oder HP1-assoziierten Proteinen (Maison et al. 2004; Muchardt et al. 2002; Thiru et al. 2004). Die gezeigten Ergebnisse sind ein Hinweis, dass die Verstärkung der Bindung von HP1 $\alpha$  zum Chromatin durch die Kooperation mit HMGA1a vermittelt wird.

Diese Ergebnisse zeigen, dass HMGA-Proteine spezifisch mit HP1 interagieren und dass diese Interaktion *in vivo* präferentiell im Heterochromatin erfolgt. Andere HMG-Proteine, wie HMGB1 oder HMGN1, sowie das Histon H1.5 hingegen interagieren nicht mit HP1 $\alpha$ , was für die Spezifität der Interaktion spricht. Für die Interaktion von HMGA mit HP1 sind der saure C-Terminus und die DNA-Bindung von HMGA notwendig. Zu klären bleibt, ob es sich dabei um eine direkte Interaktion handelt, oder weitere Adapterproteine daran beteiligt sind.

### **Identifikation der Interaktionsdomänen von HMGA1a und HP1 $\alpha$**

Wie auch bei der Homodimerisierung von HP1 $\alpha$  sollte untersucht werden, welche HP1 $\alpha$ -Domänen für die Interaktion mit HMGA1a verantwortlich sind. Hierzu wurde phHMGA1a-BiFC-YC mit jeweils einem der verschiedenen HP1 $\alpha$ -Domänen-Konstrukte (Tab. 4-3) in HepG2-Zellen transfiziert (1 $\mu$ g:1 $\mu$ g) und wie bei den vorhergehenden Experimenten analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-31 auf der nächsten Seite zusammengestellt.



**Abb. 4-31: Die Chromodomäne ist nötig für die Interaktion von HMGA-Proteinen und HP1**

Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und Transfektion der Konstrukt-Kombinationen erfolgte wie in den vorangegangenen Fällen. Die Art der Darstellung entspricht der in Abb. 4-25. Der Eichstrich markiert 10  $\mu\text{m}$ . Gezeigt sind HMGA1a zusammen mit CD (a), Hinge-Region (b), CSD (c),  $\Delta\text{CSD}$  (d) und  $\Delta\text{CD}$  (e). Eine spezifische Interaktion zeigte sich lediglich bei Transfektion von HMGA1a zusammen mit der CD beziehungsweise der Fusion aus Hinge-Region und CD ( $\Delta\text{CSD}$ ). Rechts neben den Fluoreszenzaufnahmen sind schematische Modelle von HMGA1a und den HP1 $\alpha$ -Domänen dargestellt. HMGA1a ist dabei als zweiteiliger Zylinder dargestellt, wobei das dickere Ende die saure C-terminale Domäne darstellt. Die graue Kugel steht für die Chromoshadowdomäne, die blaue die Chromodomäne des HP1 $\alpha$ . Der kleine graue Balken markiert die Hinge-Region. des HP1 $\alpha$ . Interaktionen sind durch engeren Kontakt verdeutlicht.

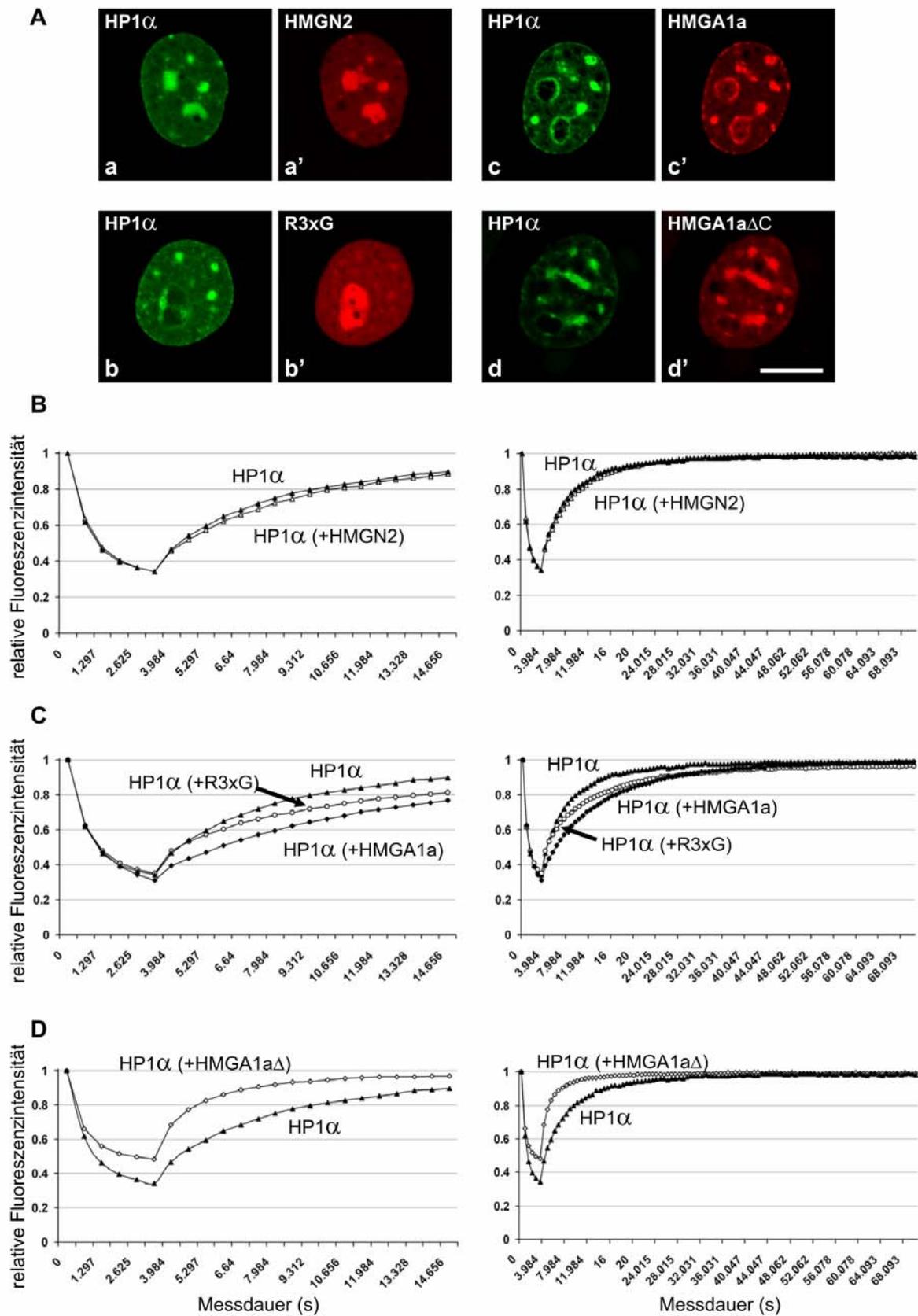
Die Analyse der für die HP1 $\alpha$ :HMGA1a-Interaktion nötigen HP1-Domäne ergab ein kaum detektierbares, als unspezifisches anzusehendes, BiFC-Signal bei Koexpression von HMGA1a zusammen mit CSD (Abb. 4-31c) und der Kombination aus Hinge-Region und CSD (Abb. 4-31e).

Keinerlei Interaktion von HMGA1a konnte mit der Hinge-Region alleine festgestellt werden (Abb. 4-31b). Ein spezifisches BiFC-Signal lieferten dagegen die Kotransfektionen von HMGA1a mit der CD (Abb. 4-31a) sowie die Kombination aus CD und Hinge-Region ( $\Delta$ CSD) (Abb. 4-31d).

Diese Ergebnisse zeigten, dass neben dem HMGA1a C-Terminus und dessen DNA-Bindung die CD von HP1 für eine spezifische Interaktion von HMGA1a und HP1 notwendig und ausreichend ist.

### **HMGA1a reduziert die HP1 $\alpha$ -Dynamik in Cos-7-Zellen**

Um zu untersuchen, ob die HP1:HMGA-Interaktion tatsächlich die Bindung von HP1 zum Chromatin verstärkt, wurde die HP1 $\alpha$ -Verweildauer an dessen Chromatinbindungsstellen mit Hilfe von Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) nach Koexpression von HP1a-EGFP mit HMGA1a, HMGA1a-R3xG-, HMGA1a $\Delta$ C- und HMGN2-mRFP-Fusionsproteinen analysiert (Abb. 4-32). Die kodierenden Sequenzen der HMG-Proteine waren dabei an die Sequenz des monomeren, rot fluoreszierenden Proteins (mRFP) gekoppelt (Vektorinformationen siehe beiliegende CD).



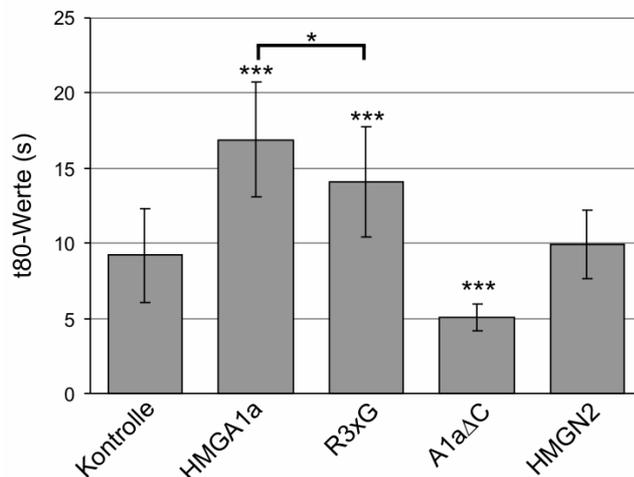
**Abb. 4-32: FRAP-Analysen von HP1 $\alpha$  unter Einfluss von HMG-Proteinen in Cos-7-Zellen**

Abbildungslegende siehe nächste Seite

**Abbildungslegende von Abb. 4-32 vorherige Seite:**

Nach dem Aussähen von Cos-7-Zellen auf Deckgläsern, wurden diese mit dem Plasmid pHP1 $\alpha$ -EGFP in Kombination mit je einem der oben angegebenen HMG-mRFP-Konstrukte kotransfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen in Lebend-Beobachtungskammern mit Hilfe von FRAP analysiert. Die Fluoreszenzerholung wurde über 70 s hinweg gemessen. (A) Darstellung von HP1 $\alpha$ -EGFP (a, b, c, d) und des jeweils kotransfizierten mRFP-Konstruktes: HMGN2 (a'), R3xG (b'), HMGA1a (c'), oder HMGA1a $\Delta$ C (d'). Es kam zu einer Kolokalisation des HP1 $\alpha$ -EGFP mit HMGN2, HMGA1a und HMGA1a $\Delta$ C. HMGA1a-R3xG zeigte dagegen keine Kolokalisation mit HP1 $\alpha$ , aber eine bereits beschriebene Anreicherung im Nukleolus (Harrer et al. 2004). (B-D) Kinetiken der Fluoreszenzerholung von HP1 $\alpha$ -EGFP alleine beziehungsweise von HP1 $\alpha$ -EGFP nach Kotransfektion mit HMGN2-mRFP, HMGA1a-mRFP, HMGA1a-R3xG-mRFP, oder HMGA1a $\Delta$ C-mRFP (D). innerhalb der ersten 15 s und über die komplette Messdauer von 70 s.

Die aus den HP1 $\alpha$ -Mobilitätsmessungen abgeleitete Verweildauer des Proteins am Chromatin ist in Form der errechneten t80-Werte in Abb. 4-33 zusammengefasst.



**Abb. 4-33: Dauer bis zur 80%igen Fluoreszenzerholung (t80-Wert) von HP1 $\alpha$ -EGFP nach Koexpression mit verschiedenen HMGA1a-mRFP-Fusionsproteinen**

Aufgetragen sind die aus den HP1 $\alpha$ -FRAP-Kurven (vergleiche Abb. 4-32) errechneten t80-Werte in Sekunden (s) nach Koexpression von HP1 $\alpha$ -EGFP mit HMGA1a-, HMGA1a-R3xG-, HMGA1a $\Delta$ C- und HMGN2-mRFP inklusive der Standardabweichungen. Die Messungen der Dynamik von HP1 $\alpha$ -EGFP alleine ergaben eine t80-Wert  $9,2 \pm 3,1$  s. Eine Koexpression von HMGA1a-mRFP verringerte die HP1 $\alpha$ -Dynamik drastisch ( $t80 = 16,9 \pm 3,8$  s). Bei Koexpression des Kontrollkonstruktes HMGA1a-R3xG-mRFP erhöhte sich die HP1 $\alpha$ -Dynamik wieder ( $t80 = 14,1 \pm 3,7$  s). Dabei unterschied sich die HP1 $\alpha$ -EGFP-Dynamik bei Koexpressionen mit HMGA1a-mRFP signifikant (\*) von einer Koexpression des HP1 $\alpha$ -EGFP mit HMGA1a-R3xG-mRFP ( $p = 0,0318$ ). Bei Koexpression von HMGA1a $\Delta$ C-mRFP wies HP1 $\alpha$ -EGFP eine geringere Verweildauer am Chromatin auf ( $t80 = 5,1 \pm 0,9$  s), als bei der Expression von HP1 $\alpha$ -EGFP alleine. Sämtliche Veränderungen in der HP1 $\alpha$ -Dynamik aufgrund der koexprimierten HMGA1a-Konstrukte erwiesen sich als statistisch signifikant (\*\*\*). HMGN2-mRFP hatte hingegen keinen Einfluss auf die HP1 $\alpha$ -Mobilität. Diese entsprach der Mobilität des reinen HP1 $\alpha$ -EGFP-Konstruktes ( $t80 = 9,9 \pm 2,3$  s;  $p = 0,5402$ ). Die Berechnung der Signifikanzwerte bezieht sich auf die Kontrollmessung von HP1 $\alpha$ -EGFP und erfolgten mittels eines „unpaired t-test“.

Die FRAP-Messungen zeigten, dass die HP1 $\alpha$ -Mobilität durch eine Koexpression von HMGN2-mRFP nicht beeinflusst wird. Dies zeigt, dass die Koexpression von mRFP-Fusionsproteinen per se keinen Einfluss auf die HP1 $\alpha$ -EGFP Dynamik nimmt.

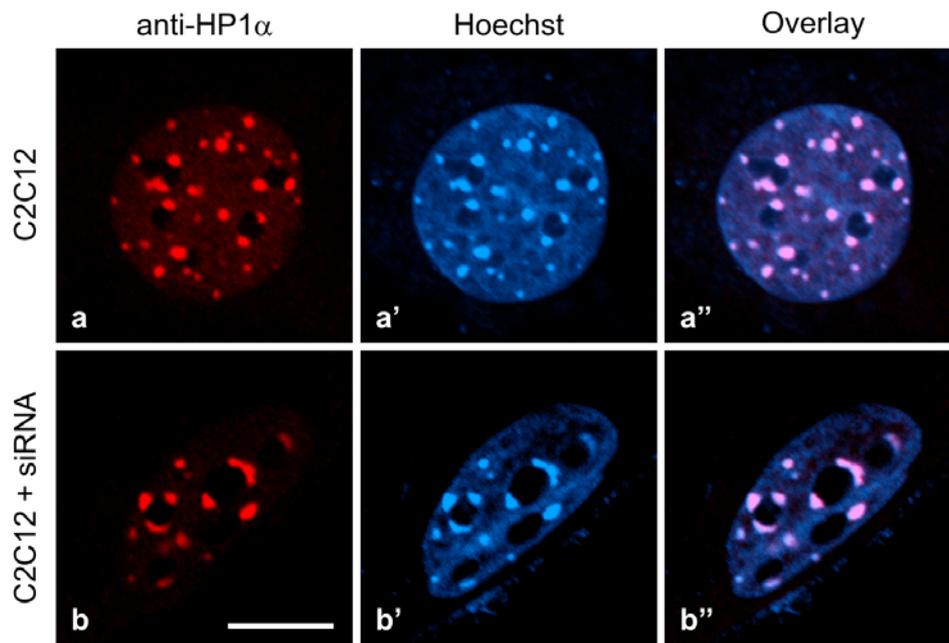
Eine Koexpression von HP1 $\alpha$  und HMGA1a hingegen führte annähernd zu einer Verdoppelung der Verweildauer von HP1 $\alpha$  am Chromatin. Die Mobilitätsmessungen von HP1 $\alpha$  nach Koexpression von HMGA1a-R3xG zeigten eine signifikante Verringerung der HP1 $\alpha$ -Verweildauer. Dies ist auch nach Koexpression von HMGA1a $\Delta$ C der Fall.

Die Ergebnisse zeigen, dass HMGA-Proteine die HP1 $\alpha$ -Bindung am Chromatin beeinflussen. Die erhöhte Dynamik von HP1 $\alpha$  nach Koexpression von HMGA1a-R3xG- oder HMGA1a $\Delta$ C-Mutanten lässt sich über die Verdrängung funktioneller HMGA-Proteine erklären. Unter Annahme der HP1 $\alpha$ :HMGA-Interaktion würde dies im Falle der HMGA1a-R3xG-Überexpression zur Bildung von HP1 $\alpha$ :HMGA1a-R3xG-Komplexen mit geringer Chromatinbindung führen. Bei Koexpression von HP1 $\alpha$  und HMGA1a $\Delta$ C würde HMGA1a $\Delta$ C mit funktionellem HMGA um DNA-Bindungsstellen konkurrieren und somit die Ausbildung von HP1 $\alpha$ :HMGA1a-Komplexen blockieren. Dies würde die erhöhte Dynamik von HP1 $\alpha$  nach Koexpression von HMGA1a $\Delta$ C erklären.

### **HMGA1-knock-down verursacht Veränderung der Chromozentrentopologie**

Aufgrund der erhöhten Dynamik von HP1 $\alpha$ -EGFP nach Kotransfektion von HMGA1a-Mutanten und der Dissoziation der Chromozentren nach Herunterregulierung von HMGA1 an Tag 3 der Myogenese wurde die Morphologie der Chromozentren nach HMGA1-knock-down analysiert. Diese waren teilweise vergrößert, vermehrt um die Nukleolen angeordnet, und wiesen entgegen ihrer normalen zirkulären Form eine deformierte Morphologie auf (Abb. 4-34).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Topologie der Chromozentren von HMGA1 beeinflusst wird und die Herunterregulierung von HMGA1 mit der Dissoziation der Chromozentren korreliert.



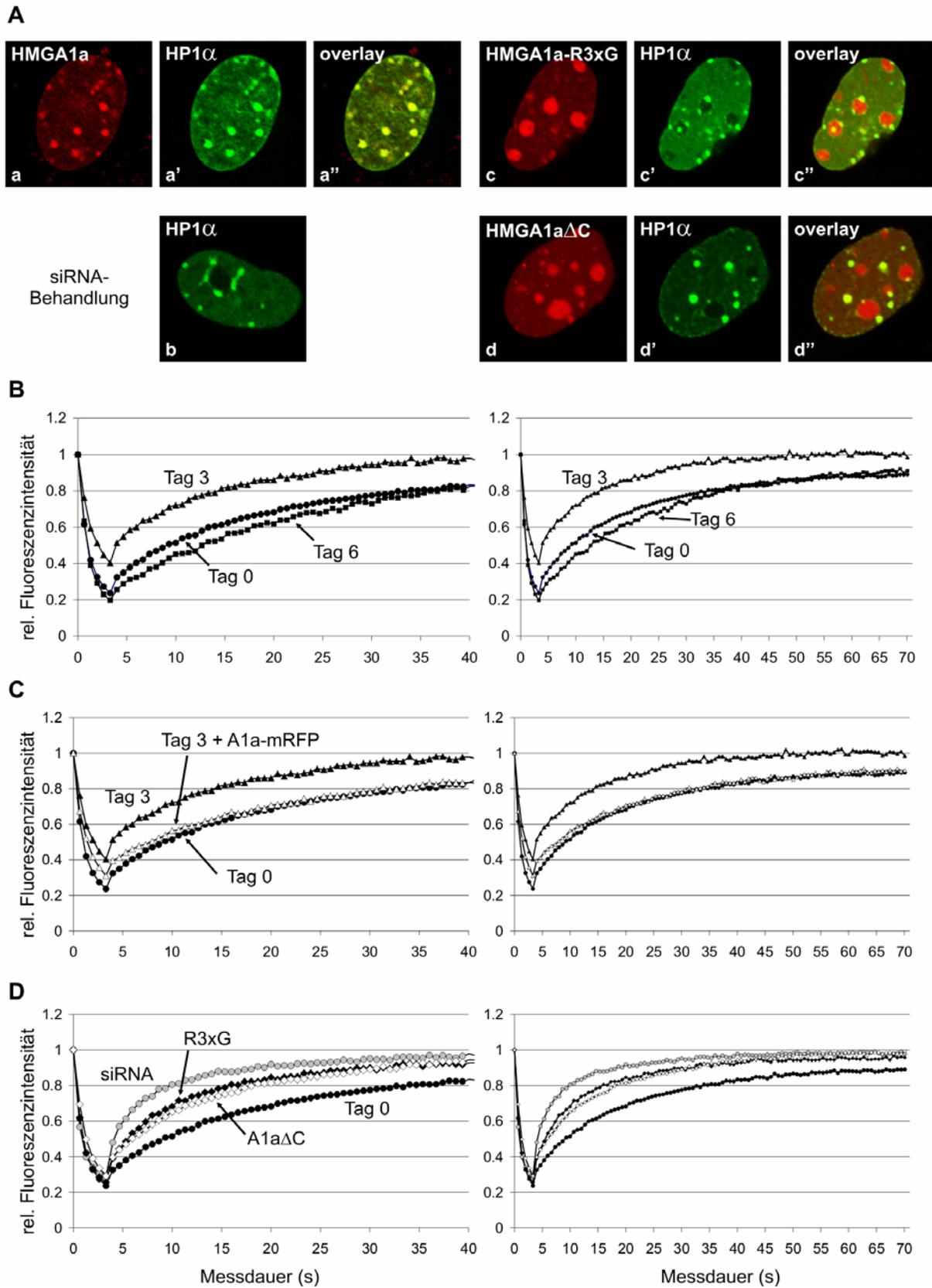
**Abb. 4-34: Veränderte Chromozentren-Morphologie in C2C12-Zellen nach HMGA1a-knock-down**

C2C12-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am folgenden Tag mit siRNA gegen HMGA1 transfiziert. Einen weiteren Tag später erfolgte die Immunlokalisation mit einem spezifischen HP1 $\alpha$ -Antikörper. Dargestellt sind unbehandelte C2C12-Zellen (a-a'') und C2C12-Zellen 24 h nach HMGA1a-knock-down (b-b''). Die Immunlokalisation des HP1 $\alpha$  (a und b), sowie die jeweilige Gegenfärbung der DNA mittels Hoechst-33258 (a' und b') zeigte die Deformation der Chromozentren nach siRNA-Behandlung der C2C12-Zellen. Die letzte Spalte (a'' und b'') zeigt die Übereinanderlagerung der jeweils ersten beiden Bilder. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu$ m.

#### Reduzierte HP1 $\alpha$ -Dynamik in der Differenzierung

Aufgrund differenzieller Expression der HMGA1-Proteine während der Myogenese und ihrer möglichen Rolle bei der Unterstützung der HP1-Bindung am Chromatin, sollten Veränderungen in der HP1 $\alpha$ -Dynamik detektierbar sein.

Um dies zu überprüfen, wurde die HP1 $\alpha$ -EGFP-Mobilität mit Hilfe von FRAP in C2C12-Zellen während der Myogenese beziehungsweise unter dem Einfluss verschiedener kotransfizierter HMGA-Konstrukte und nach HMGA1-knock-down untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-35 zusammengefasst.



**Abb. 4-35: FRAP-Analysen von HP1 $\alpha$ -EGFP während der Myogenese und unter Einfluss von HMGA1a**  
Abbildungslegende siehe folgende Seite

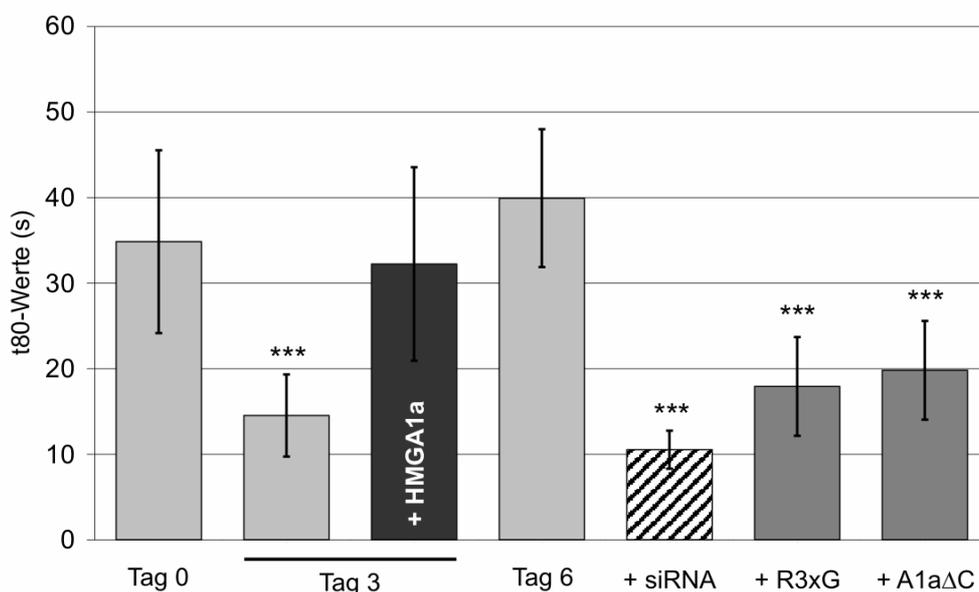
**Abbildungslegende zu Abb. 4-35 vorherige Seite:**

C2C12-Zellen wurden einen Tag nach dem Aussäen auf Deckgläsern mit HP1 $\alpha$ -EGFP alleine oder in Kombination mit HMGA1a-mRFP, HMGA1a-R3xG-mRFP, HMGA1a $\Delta$ C-mRFP, HMGA1a-DsRed transfiziert. Des Weiteren erfolgte eine Transfektion von HP1 $\alpha$ -EGFP in C2C12-Zellen eine Tag nach HMGA1-knock-down (siRNA). 24 h nach der Transfektion erfolgte die Analyse in einer Lebend-Beobachtungskammer mit Hilfe von FRAP. Es wurden Chromozentren mit einer deformierten Morphologie für die FRAP-Analysen herangezogen (Abb. 4-34 b-b'' und Abb. 4-35 A, Bild b). Die Fluoreszenzerholung in der geblichenen Region (ROI) wurde über 70 s hinweg gemessen. (A) Lokalisation von HP1 $\alpha$  in C2C12 nach Kotransfektion mit HMGA1a-mRFP (a-a''), siRNA-Transfektion (b-b''), Kotransfektion von HMGA1a-R3xG-mRFP (c-c'') beziehungsweise HMGA1a $\Delta$ C-mRFP (d-d''). Im ersten Bild ist jeweils das HMGA1a-Konstrukt zu sehen, im zweiten Bild HP1 $\alpha$ -EGFP und im dritten eine Übereinanderlagerung der ersten beiden. (B-D) Erholungskurven nach FRAP von HP1 $\alpha$ -EGFP in der Differenzierung (B) und nach Koexpression von HMGA1a-mRFP (C) und in Myoblasten nach siRNA-Transfektion (D) beziehungsweise Koexpression von mRFP-Fusionsproteinen mit HMGA-Mutanten (D). Aufgetragen ist die relative Fluoreszenzintensität gegen die Messdauer in Sekunden (s). Die jeweils linke Spalte zeigt die ersten 40 s der Messung, die rechte die HP1 $\alpha$ -EGFP-Mobilität über die komplette Messdauer von 70 s. In Abb. 4-35 sind die errechneten t80-Werte dieser Messungen zusammengefasst. Zu beachten ist die erhöhte Mobilität von HP1 $\alpha$  an Tag 3 der Differenzierung (B). Koexpression von HMGA1 verringert die HP1 $\alpha$ -Dynamik an Tag 3 (C). In Myoblasten ist die HP1 $\alpha$ -Dynamik nach siRNA oder Koexpression von HMGA1a-R3xG beziehungsweise HMGA1a $\Delta$ C signifikant erhöht (D).

Die beiden HMGA1a-Mutanten HMGA1a-R3xG und HMGA1a $\Delta$ C ähnelten sich in C2C12-Zellen in ihrer Lokalisation, wobei HMGA1a $\Delta$ C ein höheres Maß an Koloakalisation mit HP1 $\alpha$  aufwies. In Mauszellen akkumuliert HMGA1a-R3xG im Nukleolus (Abb. 4-35 A, Bilder c-c'') (Harrer et al. 2004). HMGA1a $\Delta$ C welches wegen seiner drei intakten AT-Hooks theoretisch imstande ist AT-reiche DNA zu binden, zeigte ebenfalls eine veränderte Lokalisation. Dabei trat es verringert im Heterochromatin, dagegen ebenfalls vermehrt in den Nukleolen auf (Abb. 4-35 A, Bilder d-d'').

FRAP-Messungen der HP1 $\alpha$ -Dynamik in C2C12-Zellen ergaben, dass die Bindung von HP1 $\alpha$  im Heterochromatin von HMGA-Proteinen abhängig ist. Die Bestimmung der HP1 $\alpha$ -Dynamik an Tag 0 und Tag 6 der Differenzierung zeigte, wie schon vorher beschrieben (Meshorer et al. 2006), keinerlei Unterschied (Abb. 4-35 B). Interessanterweise ist die HP1 $\alpha$ -Dynamik aber an Tag 3 der Differenzierung signifikant erhöht (Abb. 4-35 B. Die Zeit zur Erholung von 80% der Ursprungsintensität vor dem Bleichen (t80) betrug an Tag 0  $34,8 \pm 10,7$  s und an Tag 3 lediglich  $14,5 \pm 4,8$  s. Damit wurde die HP1 $\alpha$ -Verweildauer um mehr als 50% reduziert. Diese Reduktion ließ sich durch Koexpression von HMGA1a-mRFP rückgängig machen und führte zu einer Erhöhung des t80-Wertes von HP1 $\alpha$ -EGFP auf  $32,2 \pm 11,3$  s. Damit scheint die erhöhte HP1 $\alpha$ -Dynamik an Tag 3 von der differentiellen HMGA1-Expression während der Differenzierung abzuhängen. Bestätigt wurde dies durch FRAP-Analysen nach knock-down von HMGA1 durch siRNA. Wie bereits unter 4.1.4 beschrieben, führt ein Knock-down von HMGA1 zur Dissoziation der Chromozentren und Veränderung der Chromatintopologie in Myoblasten (Abb. 4-34). Diese Dissoziation war auch noch nach Expression von HP1 $\alpha$ -EGFP zu sehen, obwohl eine HP1 $\alpha$ -Überexpression Heterochromatinisierung hervorrufen kann (Verschure et al. 2005). Wenn Zellen mit aufgelöstem

Heterochromatin nach siRNA- und HP1 $\alpha$ -EGFP-Transfektion für FRAP-Experimente herangezogen wurden, war die Dynamik von HP1 $\alpha$ -EGFP signifikant erhöht (Verringerung des t80-Wertes von  $34,8 \pm 10,7$  s auf  $10,5 \pm 2,2$  s). Dies zeigt, dass HMGA-Proteine eine erhöhte Verweildauer von HP1 $\alpha$  am Chromatin in Myoblasten vermitteln. Unterstützt wird dies durch FRAP-Messungen nach Koexpression von HMGA1a-R3xG-mRFP- und HMGA1a $\Delta$ C-mRFP-Mutanten. Beide Proteine konkurrieren durch ihr dynamisches Verhalten mit endogenem HMGA1 und führen, wie bereits in Cos-7-Zellen gezeigt (Abb. 4-32 und 4-33), auch in C2C12-Zellen zu einer erhöhten HP1 $\alpha$ -Dynamik. Diese Ergebnisse zeigen, dass die HP1 $\alpha$ -Dynamik in der Myogenese von der differentiellen Expression funktioneller HMGA1-Proteine abhängt.

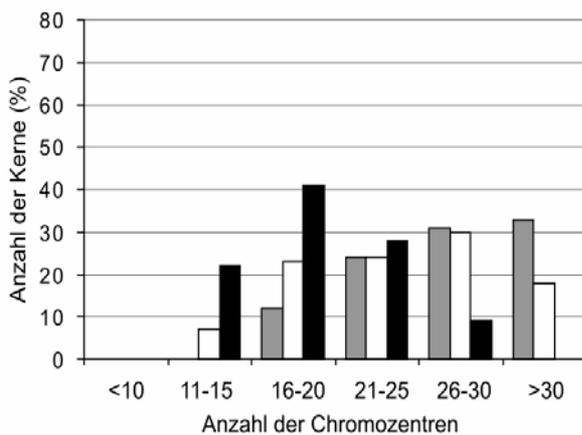


**Abb. 4-36: HP1 $\alpha$ -Dynamik (t80-Werte) in der Myogenese und unter HMGA1-Einfluss in C2C12-Zellen**

Die Messungen der HP1 $\alpha$ -Dynamik in C2C12-Myoblasten ergaben einen t80-Wert von  $34,8 \pm 10,7$  s (Tag 0). An Tag 3 war die HP1 $\alpha$ -Mobilität signifikant (\*\*\*,  $p < 0,0001$ ) erhöht ( $t80 = 14,5 \pm 4,8$  s, Tag 3). An Tag 6 der Differenzierung hingegen war sie wieder mit der in Myoblasten gemessenen vergleichbar ( $t80 = 39,9 \pm 8,1$  s; Tag 6). Die Koexpression von HP1 $\alpha$ -EGFP und HMGA1a-mRFP an Tag 3 führte ebenfalls zu einer HP1 $\alpha$ -Dynamik, welche keinen signifikanten Unterschied zur HP1 $\alpha$ -Mobilität in C2C12-Myoblasten (Tag 0) ergab ( $t80 = 32,2 \pm 11,3$ ; Tag 3). Ein HMGA1-knock-down in C2C12-Zellen mittels siRNA lieferte eine massiv erhöhte HP1 $\alpha$ -EGFP-Mobilität ( $t80 = 10,5 \pm 2,2$ ). Dagegen lag die gemessene HP1 $\alpha$ -EGFP-Dynamik bei Koexpression mit HMGA1a-R3xG-mRFP ( $17,9 \pm 5,77$ ) beziehungsweise HMGA1a $\Delta$ C-mRFP ( $19,8 \pm 5,77$ ) zwischen der an Tag 0 und nach siRNA-Transfektion detektierten. Im Vergleich zeigten diese beiden Dynamiken keinen signifikanten Unterschied. Die Signifikanz der Unterschiede in den t80-Werten bezieht sich immer auf den Wert aus C2C12-Zellen an Tag 0. Die Signifikanzberechnungen erfolgten mittels eines „unpaired t-test“.

### Koexpression von HP1 $\alpha$ und HMGA1a verhindern die Dissoziation der Chromozentren

In C2C12-Zellen des Differenzierungstages 3 wurden bei Koexpression von HP1 $\alpha$  und HMGA1a erneut die Chromozentren ausgezählt (Abb. 4-37). Dabei wurde eine veränderte Verteilung der Chromozentrenanzahl festgestellt. Wie unter 4.1.4 bereits festgestellt, kam es an Tag 3 der Myogenese zu einer kurzzeitigen Dissoziation der Chromozentren. Zellen mit einer Koexpression von HMGA1a und HP1 $\alpha$  hingegen zeigt in ihrer Verteilung eine größere Anzahl an Kernen mit einer geringeren Chromozentrenzahl (Abb. 4-37 schwarze Balken).



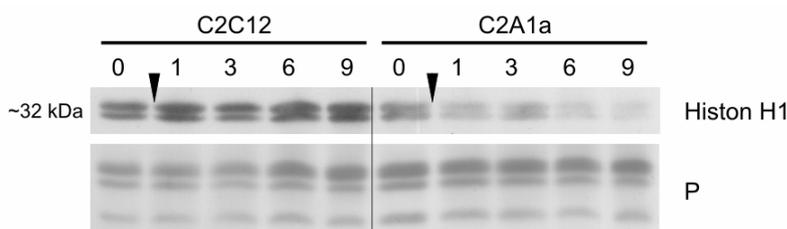
**Abb. 4-37: Verteilung der Chromozentrenanzahl nach Koexpression von HP1 $\alpha$  und HMGA1a**

C2C12-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am nächsten Tag mit HP1 $\alpha$ -EGFP und HMGA1a-mRFP transfiziert. Danach erfolgte die Induktion der Differenzierung mittels DM. An Tag 3 der Myogenese wurden die Zellen fixiert und die Anzahl der Chromozentren pro Kern bestimmt. Diese wurde zusammen mit den Zahlen aus C2C12- und C2A1a-Zellen (Abb. 4-21) graphisch nach Chromozentrenzahl aufgetragen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass HP1 Protein und HMGA1a-Proteine der Dissoziation der Chromozentren an Tag 3 der Myogenese kooperativ entgegenwirken und zur Stabilisierung des perizentrischen Heterochromatins beitragen können.

#### 4.1.6.3 Anhaltende HMGA1a-Expression führt zur Verringerung der Histon H1-Proteinmenge

Aufgrund der bekannten Konkurrenz von HMGA1 und Histon H1 um dieselben DNA-Bindungsstellen (Bonney et al. 1999; Funayama et al. 2006; Hill et al. 1999) wurde die Histon H1-Proteinmenge während der Differenzierung in C2C12- und C2A1a-Zellen miteinander verglichen. Der Westernblot ist in Abb. 4-38 dargestellt.



**Abb. 4-38: Histon H1 in C2C12- und C2A1a-Zellen während der Myogenese**

Abbildungslegende siehe folgende Seite

**Abbildungslegende zu Abb. 4-38 vorherige Seite:**

Zellkerne aus C2C12- und C2A1a-Zellen wurden wie in Abb. 4-23 isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und die Histon H1-Expression mittels eines spezifischen Antikörpers analysiert. Dabei zeigte sich, dass in C2A1a-Zellen die H1-Proteinmenge bereits in Myoblasten deutlich geringer war, als in C2C12-Zellen. Diese Verringerung wurde nach Induktion der Myogenese noch deutlicher.

Catez et. al zeigten, dass HMG-Proteine synergistisch und dynamisch mit H1 um dieselben Bindungsstellen an der DNA konkurrieren (Catez et al. 2004). Möglicherweise ist die geringere Histon H1-Proteinmenge in C2A1a-Zellen vermutlich weniger auf eine Inhibition der H1-Expression als auf eine Verdrängung des Linker-Histons von seinen DNA-Bindungsstellen durch HMGA1a zurückzuführen. Unterstützt wird dies auch durch Beobachtungen in humanen Krebszellen die einen reziproken Zusammenhang zwischen HMGA1- und H1-Proteinmenge zeigen (Reeves et al. 2001).

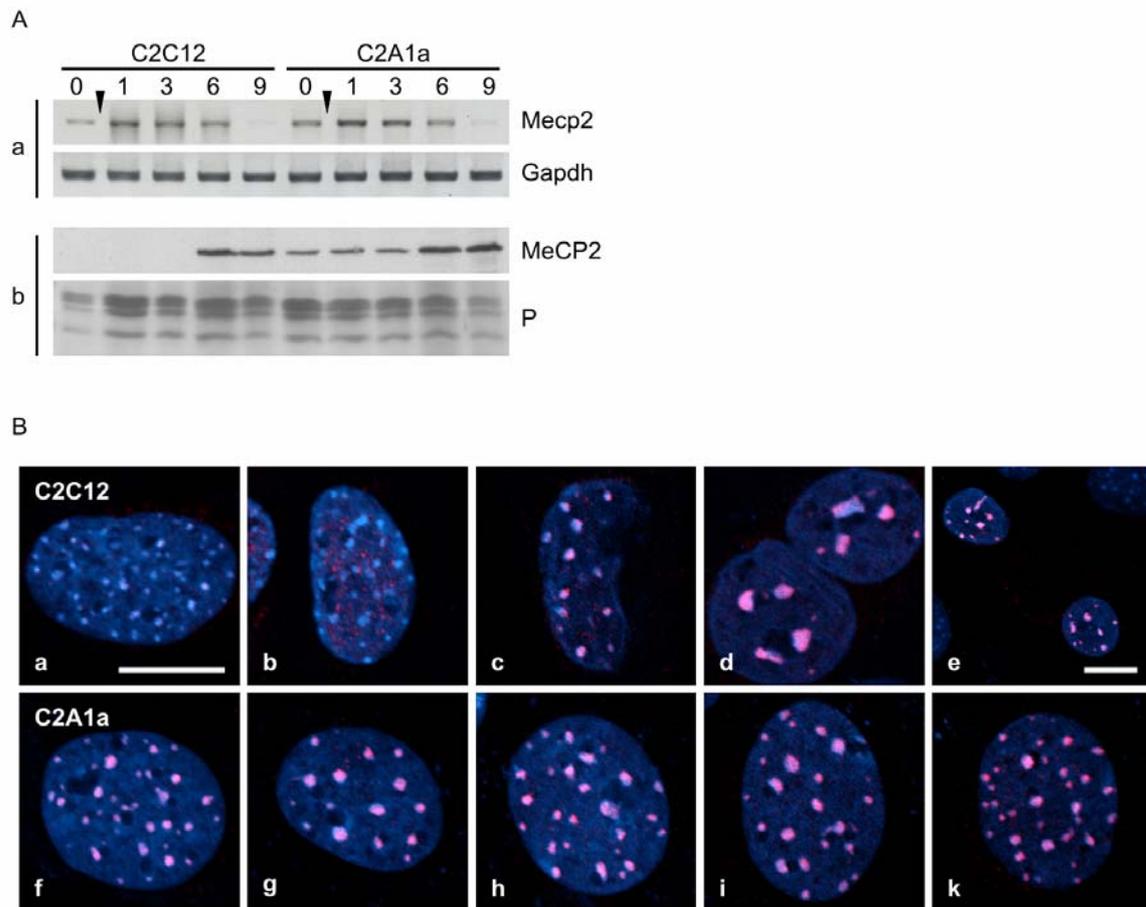
**4.1.6.4 Dynamische Konkurrenz von HMGA1a und MeCP2**

Das Methyl-CpG-bindende Protein 2 (MeCP2) spielt während der Myogenese, wie auch differenzierungsunabhängig eine Rolle in der Fusion der Chromozentren in C2C12-Zellen (Brero et al. 2005). Da in C2A1a-Zellen die Fusion der Chromozentren auch noch nach 9 Tagen in DM unterblieb, wurde das Zusammenspiel von HMGA1a und MeCP2 genauer untersucht.

**HMGA1a-Überexpression führt zu verfrühter MeCP2-Expression in C2C12-Zellen**

Zunächst wurde die Expression von MeCP2 in C2C12- und C2A1a-Zellen auf RNA- und Proteinebene in Myoblasten und während der Myogenese analysiert (Abb. 4-39 A). Zusätzlich wurde die Expression in Verbindung mit dem Verteilungsmuster des MeCP2 über Immunlokalisation ermittelt (Abb. 4-39 B).

C2A1a-Zellen zeigten im Vergleich zu C2C12-Zellen eine massiv veränderte MeCP2-Expression während der Differenzierung. In C2C12-Zellen war MeCP2 während der Differenzierung erst ab Tag 6 nachweisbar. In C2A1a-Zellen hingegen kam es bei nur geringfügig gesteigerter MeCP2-Transkription zu einer extrem verfrühten Translation des Proteins. MeCP2 konnte im Westernblot bereits in Myoblasten (Tag 0) detektiert werden (Abb. 4-39, A). Dieser in Myoblasten festgestellte Expressionslevel wurde bis an Tag 3 der Myogenese aufrechterhalten. An den Tagen 6 und 9 glich sich die MeCP2-Expression in C2A1a- und C2C12-Zellen aneinander an. Auch in der Immunlokalisation war die frühere MeCP2-Expression zu detektieren, wobei es keine Änderungen in dessen Verteilungsmuster gab. Es kam weiterhin zu einer Akkumulation des Proteins in den Chromozentren.

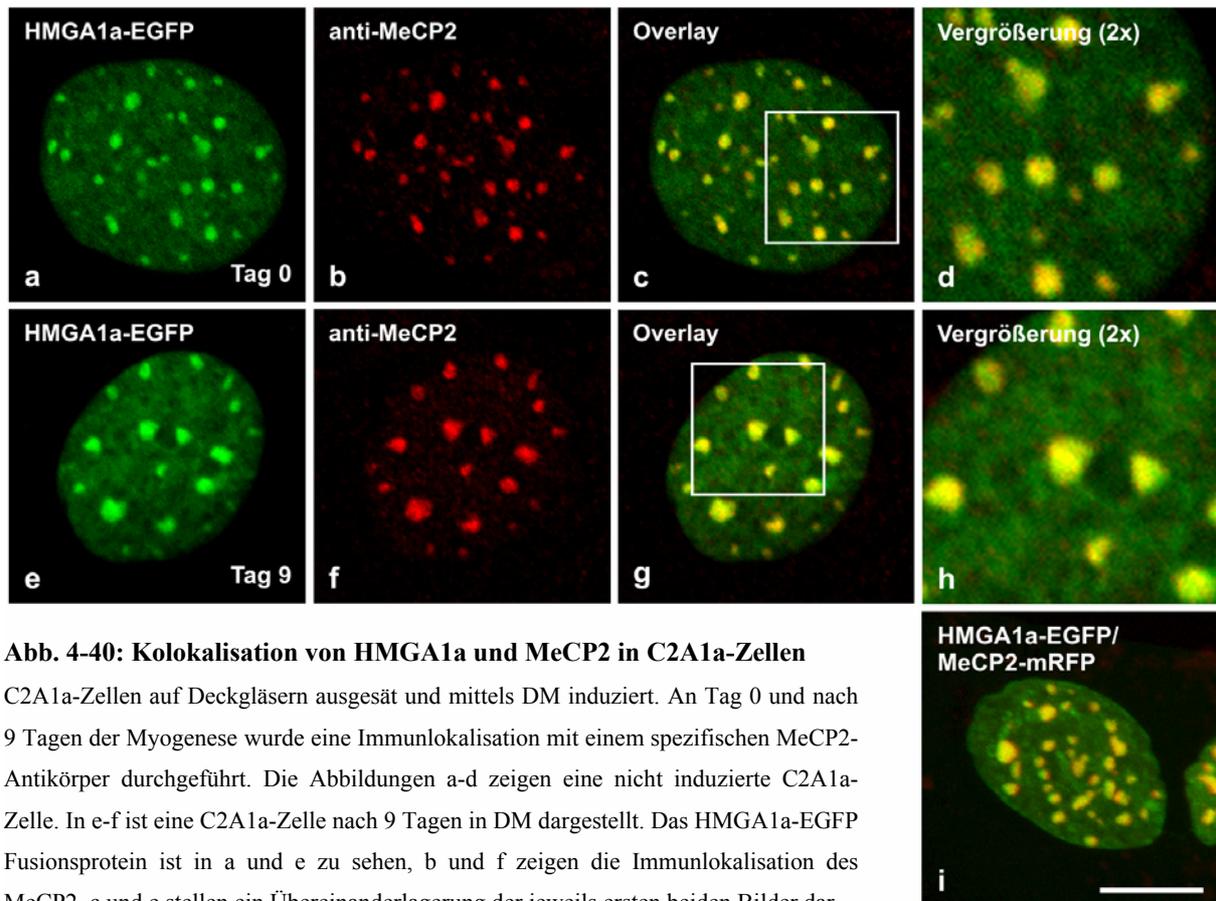


**Abb. 4-39: MeCP2-Expression in C2C12- und C2A1a-Zellen**

Die in vorangegangenen Experimenten aus C2C12- und C2A1a-Zellen bereits isolierte Gesamt-RNA diente als Template für RT-PCR-Analyse der MeCP2-Expression. Die vorhandenen, isolierten Kernproteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt ( $1,5 \cdot 10^5$  Kerne pro Spur), auf Nitrocellulose transferiert und mit einem spezifischen MeCP2-Antikörper inkubiert. (A) Expressionsanalyse von MeCP2 auf RNA- (a) und Proteinebene (b) an den Differenzierungstagen 0, 1, 3, 6 und 9. Als Kontrolle der reversen Transkription dienten Gapdh, als Beladungskontrollen des Wetsernblots die Ponceau-Färbung der Histone (P). Analytierte Zelllinien und Tage sind über der Abbildung angegeben. (B) Übereinanderlagerung der Immunlokalisation von MeCP2 (rot) in C2C12- (a-e) und C2A1a-Zellen (f-k) und der DNA-Gegenfärbung mit Hilfe von Hoechst-33258 (blau) während der Myogenese. Zu beachten ist die deutliche Lokalisation von MeCP2 in den Chromozentren der C2A1a-Zellen an Tag 0 (f), 1 (g), 3 (h), 6 (i) und 9 (k) der Differenzierung. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

### Kolokalisation von HMGA1a und MeCP2

Aufgrund der Anreicherung des endogenen MeCP2 in den Chromozentren, wurde in C2A1a-Zellen untersucht, ob HMGA1a und MeCP2 kolokalisierten. Die Immunlokalisationen des MeCP2 in C2A1a-Myoblasten, wie auch an den untersuchten Tagen der Myogenese zeigten während der gesamten Kultivierung der C2A1a-Zellen in DM eine unveränderte und kontinuierliche Kolokalisation von HMGA1a und MeCP2. In Abb. 4-40 sind Tag 0 und Tag 9 als Anfangs und Endpunkte dieses Prozesses dargestellt, welcher in Abb. 4-39 B in den Bildern f-k komplett zu sehen ist.



**Abb. 4-40: Kolokalisation von HMGA1a und MeCP2 in C2A1a-Zellen**

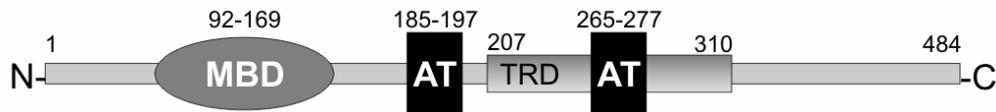
C2A1a-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und mittels DM induziert. An Tag 0 und nach 9 Tagen der Myogenese wurde eine Immunlokalisation mit einem spezifischen MeCP2-Antikörper durchgeführt. Die Abbildungen a-d zeigen eine nicht induzierte C2A1a-Zelle. In e-f ist eine C2A1a-Zelle nach 9 Tagen in DM dargestellt. Das HMGA1a-EGFP Fusionsprotein ist in a und e zu sehen, b und f zeigen die Immunlokalisation des MeCP2, c und e stellen ein Übereinanderlagerung der jeweils ersten beiden Bilder dar, in welchem die Kolokalisation von HMGA1a und MeCP2 zu erkennen ist. Diese wird durch die 2-fache Vergrößerung in d und h verdeutlicht. Zusätzlich wurde die Kolokalisation von HMGA1a-EGFP und MeCP2-mRFP auch in lebenden C2C12-Zellen nach Transfektion von MeCP2-mRFP (C. Cardoso, MCD Berlin) in C2A1a-Zellen nachgewiesen (i). Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Diese Ergebnisse zeigten, dass HMGA1a und MeCP2 präferenziell im perizentrischen Heterochromatin kolokalisieren.

#### MeCP2 besitzen zwei AT-Hook-Motive

Die Kolokalisation von HMGA1a und MeCP2 veranlasste eine genauere Untersuchung von MeCP2. Nan et al. zeigten bereits 1993, dass MeCP2 in der Maus über AT-Hooks verfügt, welchen eine Rolle in der Bindung AT-reicher DNA zugeschrieben wird (Nan et al. 1993; Klose et al. 2005). Datenbankanalysen mit Hilfe von SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) bestätigten, dass die AT-Hooks neben der MBD und der TRD ebenfalls evolutiv konserviert sind, was Vergleiche der MeCP2-Aminosäuresequenz zwischen den Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Canis familiaris* und *Macaca mulatta* ergaben. Sie sind jeweils 13 Aminosäuren lang und beginnen an den Aminosäurepositionen 185 (186 in *Xenopus laevis* und 318 bei *Macaca mulatta*) beziehungsweise 265 (262 in *Xenopus laevis* und 398 bei *Macaca mulatta*).

Eine Ausnahme in der Gesamtproteingröße bilden der Zebrafisch mit 524 und der Rhesusaffe mit 619 Aminosäuren. Die Domänenanordnung des MeCP2 ist in Abb. 4-41 dargestellt.



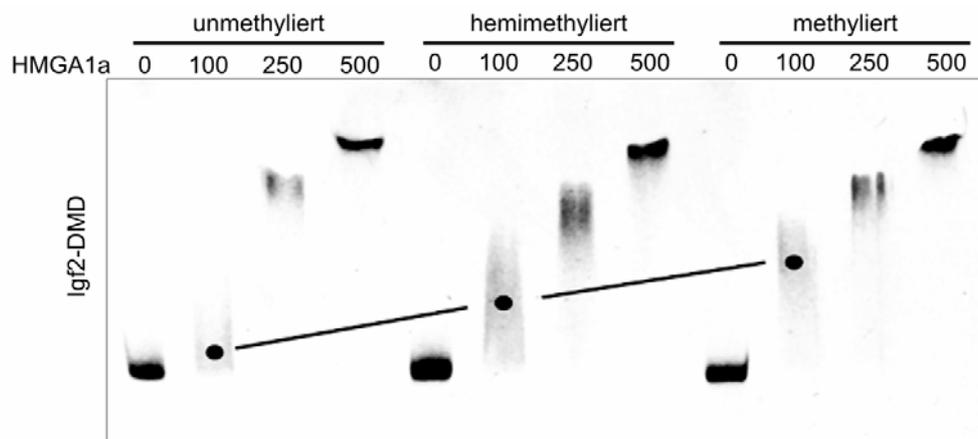
**Abb. 4-41: Domänenstruktur des MeCP2**

Der hellgraue Balken stellt das vollständige MeCP2 dar. N und C markieren den N- beziehungsweise C-Terminus des Proteins. dargestellte Domänen: Methyl-Cytosin-Bindungs-Domäne (MBD) (oval), Transkriptions-repressions-Domäne (TRD) und der zwei für die Bindung AT-reicher DNA entscheidenden AT-Hooks. Diese sind durch schwarze Boxen gekennzeichnet. Die Zahlen über der Darstellung entsprechen den Aminosäuren innerhalb des Proteins.

Diese Ergebnisse zeigten, dass MeCP2 neben seiner Bindung methylierter DNA auch eine Bindungspräferenz für AT-reiche Sequenzen aufweist.

#### HMGA1a bindet methylierte DNA

Die beiden AT-Hooks des MeCP2 sprachen für eine Bindung an DNA-Sequenzen, die auch von HMGA1a gebunden werden. Im Gegenzug wurde die Affinität von HMGA1a zu methylierter DNA untersucht. Dafür wurde die differenzielle Methylierungsdomäne (DMD) des Igf2-Genlokus aus C2C12-Gesamt-RNA mittels RT-PCR und anschließender Amplifikation isoliert und in den pCR-Topo2.1-Vektor (Qiagen) kloniert. Das Amplifikat der DMD bestand aus 1954 bp und besaß einen GC-Gehalt von 50%. Ausgehend von diesem Template wurde unmethylierte, hemi-methylierte und vollständig methylierte Amplifikate durch PCR unter Zugabe von 5'-Methyl-Cytosin hergestellt und im „gel mobility shift assay“ (GMSA) analysiert (Abb. 4-42).



**Abb. 4-42: GMSA von unterschiedlich stark methylierter DNA nach Inkubation mit HMGA1a**

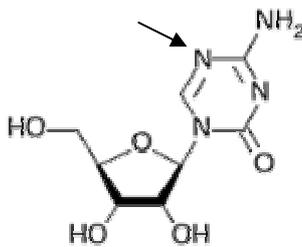
Abbildungslegende siehe folgende Seite

**Abbildungslegende zu Abb. 4-42 vorhergehende Seite:**

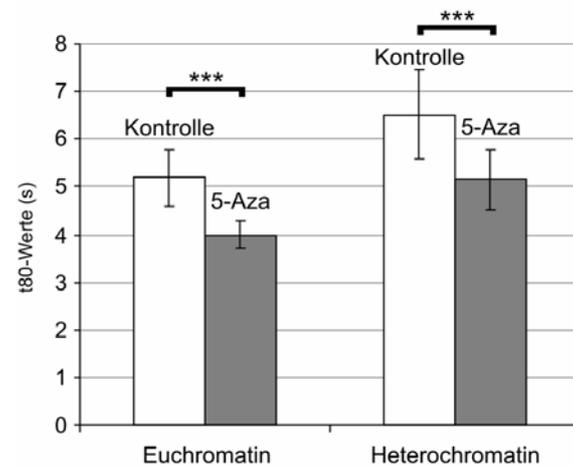
Mit der *Igf2*-DMD als Template im pCR-Topo2.1-Vektor (Qiagen) wurde unmethyliertem, hemimethyliertem (50% dm<sup>5</sup>CTP) und methyliertem (100% dm<sup>5</sup>CTP) Amplifikate mit Hilfe von PCR unter Einsatz von dNTPs mit unterschiedlichem Anteils an m<sup>5</sup>CTP generiert. Nach 15-minütiger Inkubation von 400 ng DNA mit 0, 100, 250 und 500 ng rekombinatem HMGA1a wurden diese in einem 4%igen Acrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt (GMSA) und anschließend in EtBr gefärbt. Über den Spuren ist die eingesetzte Menge an rekombinatem HMGA1a gekennzeichnet. Die Punkte und Linien markieren den verstärkten Shift der DMD mit zunehmender Methylierung bei 100 ng eingesetztem HMGA1a (nicht gesättigte Bedingungen).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Affinität von HMGA1a zur DNA-Sequenz der *Igf2*-DMD unter nicht gesättigten Bedingungen (bei 100 ng Protein) mit steigendem Methylierungsgrad zunahm. Eine vollständige Sättigung der DNA-Fragmente wurde bei 500 ng HMGA1a erreicht. Um die verstärkte Affinität des HMGA1a zu methylierter DNA ebenfalls *in vivo* zu testen, wurde die DNA in C2A1a-Zellen durch die Gabe von 5-Azacytidin (Abb. 4-43 A) in einen hypomethylierten Zustand versetzt. Dieses Cytidin-Analogon wird während der Replikation anstelle des normalen Cytidins in die DNA eingebaut und verhindert dessen Methylierung (m<sup>5</sup>C) durch DNA-Methyltransferasen. Anschließend wurde die HMGA1a-Mobilität in unbehandelten und 5-Azacytidin behandelten C2A1a-Zellen verglichen (Abb. 4-43 B).

A



B

**Abb. 4-43: FRAP-Analysen von HMGA1a nach 5-Azacytidin-Behandlung von C2A1a-Zellen**

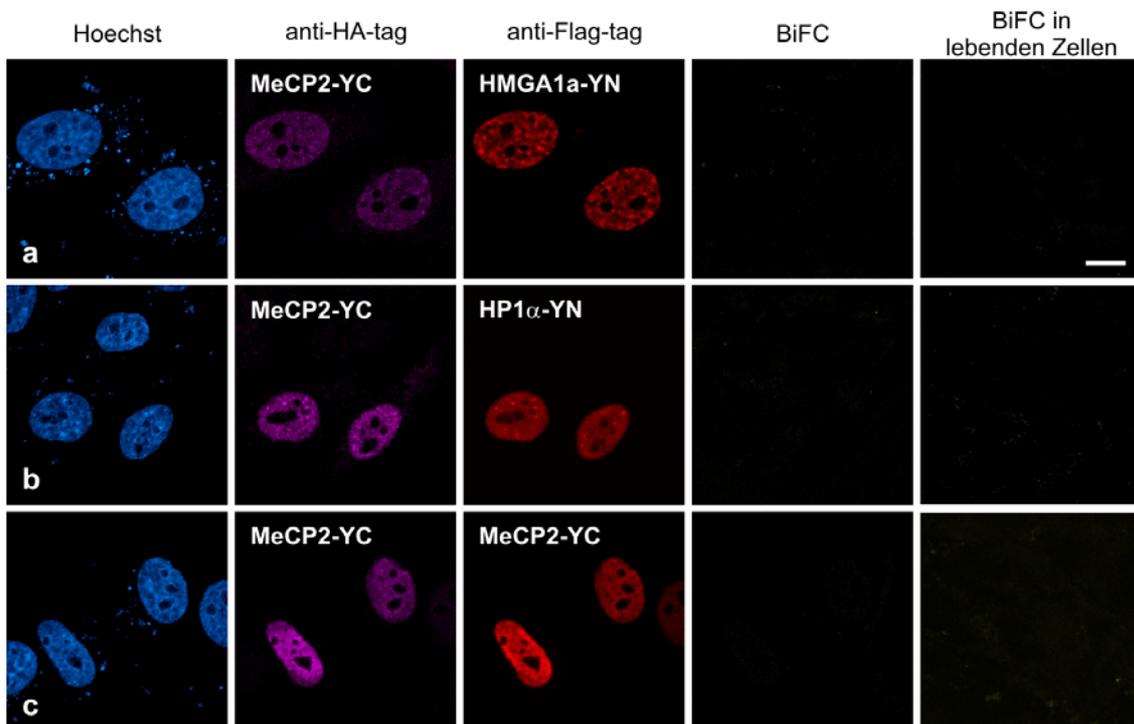
(A) Formel von 5-Aza-Cytidin. An Position 5 (Pfeil) des Cytosin-Rings ist im 5-Azacytidin gegenüber dem normalen Cytidin ein Kohlenstoff- gegen ein Stickstoffatom ausgetauscht. (B) C2A1a-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät. nach dem Anwachsen wurde dem Kultivierungsmedium 10 µM 5-Azacytidin für 24 h zugegeben. Danach erfolgte die Bestimmung der HMGA1a-Dynamik mit Hilfe von FRAP im Euchromatin und in Heterochromatin-Foci. Dargestellt sind die t80-Werte in unbehandelten (weiß) und mit 5-Azacytidin behandelten (grau) C2A1a-Zellen im Euchromatin beziehungsweise im Heterochromatin. Die Erholungszeit ist in Sekunden (s) angegeben. Sowohl im Euchromatin ( $p < 0,0001$ ), als auch im Heterochromatin ( $p = 0,0003$ ) bewirkte die Behandlung der C2A1a-Zellen mit 5-Aza-Cytidin und die somit verursachte Hypomethylierung der DNA eine äußerst signifikante Reduktion der HMGA1a-Verweildauer (\*\*\*) .

Wie in Abb. 4-43 dargestellt, ergaben die Messungen neben der erwartungsgemäß geringeren Dynamik von HMGA1a im Heterochromatin allgemein eine signifikante Reduktion der Verweildauer in beiden Chromatinformen nach 5-Azacytidin-Behandlung. Im Falle des Euchromatins betrug diese  $1,21 \pm 0,3$  s, im Heterochromatin  $1,36 \pm 0,3$  s.

Diese Analysen unterstreichen die bereits im GMSA festgestellte gesteigerte Affinität von HMGA1a zu methylierter DNA. Zusammen mit der Kollokalisierung der beiden Proteine im Heterochromatin und den beiden AT-Hooks des MeCP2, führen diese Ergebnisse zur Vermutung, dass MeCP2 und HMGA1a über die gleichen DNA-Bindungspräferenzen verfügen.

#### MeCP2 interagiert nicht mit HMGA1a oder HP1 $\alpha$

Aufgrund der gleichen Bindungspräferenzen von HMGA1a und MeCP2 zu methylierter, AT-reicher DNA und deren Kollokalisierung im perizentrischen Heterochromatin, wurde mit Hilfe des BiFC-Systems untersucht, ob beide Proteine an ihren Bindungsstellen kooperieren. Dabei wurde wegen der Lokalisation von MeCP2 im Heterochromatin auch eine potentielle Kooperation mit HP1 $\alpha$  untersucht. Eine bestehende Vermutungen über eine mögliche Homodimerisierung von MeCP2 (Brero et al. 2005), wurde ebenfalls mit Hilfe des BiFC-Systems analysiert (Abb. 4-44).



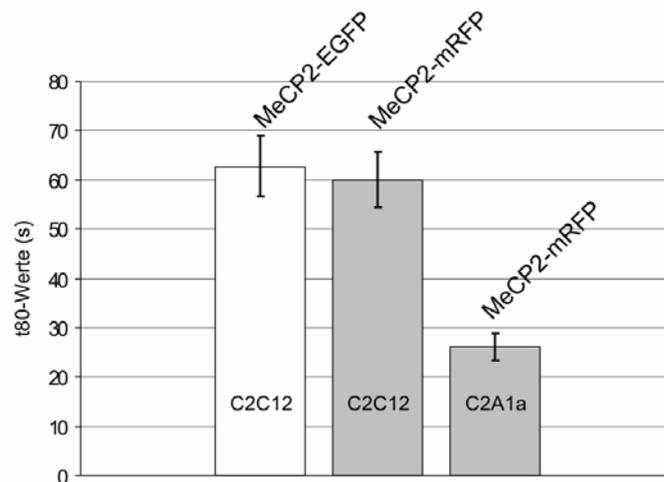
**Abb. 4-44: MeCP2 interagiert nicht mit HMGA1a und HP1 $\alpha$  und bildet keine Homodimere**

HepG2-Zellen wurden wie in vorangegangenen Experimenten angesetzt und mit den folgenden BiFC-Kombinationen transfiziert: MeCP2:HMGA1a (a), MeCP2:HP1 $\alpha$  (b), beziehungsweise MeCP2:MeCP2 (c). Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen zum einen in Lebend-Beobachtungskammern mikroskopisch analysiert, als auch Immunlokalisationen der Ha- beziehungsweise Flag-markierten Fusionsproteine durchgeführt, die ebenfalls am konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert wurden. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu$ m.

Die Ergebnisse zeigen, dass MeCP2 trotz seiner Lokalisation im perizentrischen Heterochromatin und der mit HMGA1a übereinstimmenden Bindungspräferenz, mit diesem keine kooperative Interaktion einging. Auch eine Kooperation mit HP1 $\alpha$  konnte mit Hilfe des BiFC-Systems nicht detektiert werden. Des Weiteren zeigte MeCP2 auch keine Bildung von Homodimeren, was dafür spricht, dass eine Vernetzung benachbarter Chromatinstränge (Georgel et al. 2003) entweder durch ein MeCP2-Monomer, oder über die Interaktion von MeCP2 mit einem anderen Protein erfolgt.

### HMGA1a-Expression erhöht Mobilität von MeCP2

Da in BiFC-Experimenten keine Interaktion zwischen MeCP2 und HMGA1a festgestellt werden konnte, bestand die Möglichkeit einer Konkurrenz der beiden Proteine um ihre Bindungsstellen an der DNA. Ob die Koexpression beider Proteine in C2C12-Zellen zu einer Verdrängung des MeCP2 durch HMGA1a führt, wurde durch die Messung der MeCP2-Verweildauer am Chromatin mit Hilfe von FRAP bestimmt (Abb. 4-45).



**Abb. 4-45: MeCP2-Dynamik unter Einfluss von HMGA1a**

C2C12- und C2A1a-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, am nächsten Tag mit den Plasmiden prMeCP2-EGFP beziehungsweise prMeCP2-mRFP transfiziert und weitere 24 h später wurde die Mobilität der MeCP2-Konstrukte mittels FRAP analysiert. Dargestellt sind die aus den FRAP-Messungen errechneten t80-Werte in Sekunden (s). Die Messungen ergaben, dass die Verweildauern von MeCP2-EGFP ( $t_{80} = 62,75 \pm 6,2$  s; weiß) und MeCP2-mRFP ( $t_{80} = 60 \pm 5,7$  s; hellgrau) keinen signifikanten Unterschied aufwiesen ( $p = 0,2354$ ). Im Vergleich zu C2C12-Zellen, kam es in C2A1a-Zellen zu einer extrem signifikanten ( $p < 0,0001$ ) Reduktion der Verweildauer des MeCP2-mRFP ( $t_{80} = 26,17 \pm 2,75$  s; hellgrau).

Über eventuelle Einschränkungen der Dynamik des Fusionsproteins durch das monomere RFP war nichts bekannt. Der Vergleich zwischen der Dynamik von MeCP2-EGFP und MeCP2-mRFP in C2C12-Zellen ergab, dass der mRFP-Anteil des Fusionsproteins nicht zu einer veränderten Dynamik im Vergleich zum EGFP-Anteil führte. Somit konnte mRFP-Fusionsprotein zu weiteren Analysen der MeCP2-Dynamik eingesetzt werden.

Die Ergebnisse der FRAP-Analysen in C2A1a-Zellen zeigten, dass eine Koexpression von HMGA1a und MeCP2 zu einer massiven Reduktion der MeCP2-Verweildauer am Chromatin um mehr als 50% führte (Abb. 4-45). Dies zeigt, dass HMGA1a mit MeCP2 um dieselben Bindungsstellen konkurriert und führt zu einer Verdrängung von MeCP2 von der DNA.

#### **4.1.6.5 Fazit zum Einfluss von HMGA1-Proteinen auf die Heterochromatinplastizität**

Sämtliche unter 4.1.6 gezeigten Ergebnisse erweitern das bisher bekannte Aktionsspektrum von HMGA1a in Bezug auf die Modulation von Zusammensetzung und Topologie des Chromatins. Durch den Einfluss von HMGA1a auf Expression und Chromatinbindung von HP1, Histon H1 und MeCP2 wurde an drei Proteinen gezeigt, dass HMGA1 auch indirekt auf die Integrität des Chromatins und über Kooperation und Konkurrenz mit weiteren Chromatinproteinen auf Genexpression und epigenetischen Modulation einwirken kann.

#### **4.1.7 Einfluss von HMGA1a auf Histonmodifikationen**

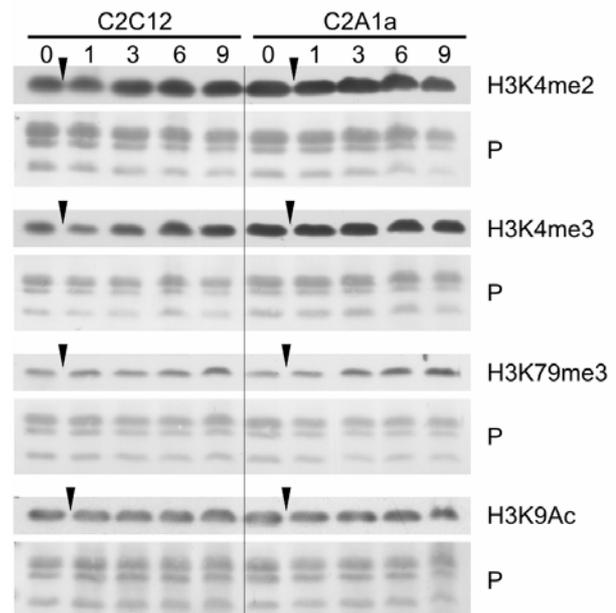
HP1 (Cheutin et al. 2003; Festenstein et al. 1999; Verschure et al. 2005) und MeCP2 (Drewell et al. 2002; Wade 2001) sind Proteine, welche maßgeblich an der epigenetischen Regulation in der Zelle beteiligt sind. Aufgrund der Veränderungen in Expression und der Dynamik dieser beiden Proteine unter Einfluss von HMGA1a und der veränderten Expression von Ezh2 (Abb. 4-19), welches in der H3K27-Trimethylierung eine Rolle spielt, wurden die Auswirkungen auf verschiedene Histonmodifikationen, die charakteristisch für aktives (Abb. 4-46) beziehungsweise inaktives (Abb. 4-47) Chromatin sind, mit Hilfe von Westernblots untersucht.

##### **4.1.7.1 Charakteristische Modifikationen für aktives und inaktives Chromatin**

Charakteristische Histonmodifikationen für aktives Chromatin sind beispielsweise die Methylierung von H3K4 (H3K4me), die Trimethylierung von H3K79 (H3K79me<sub>3</sub>) und die Acetylierung von H3K9 (H3K9Ac). Um den Einfluss der anhaltenden HMGA1a-Expression auf diese Modifikationen zu testen wurden Proteinproben aus C2C12- und C2A1a-Kernextrakten mittels Westernblot analysiert.

**Abb. 4-46: charakteristische****Histonmodifikationen des aktiven Chromatins**

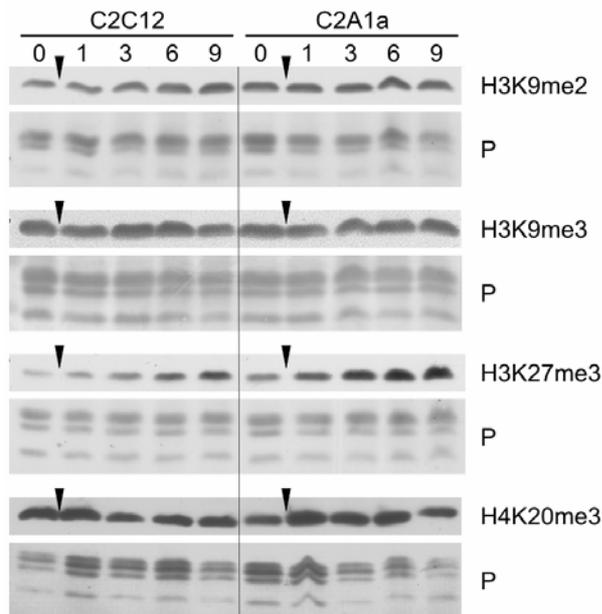
Proteinproben aus isolierten Kerne der Differenzierungstage 0, 1, 3, 6, und 9 wurden über ein SDS-Polyacrylamid-Gel ( $1,5 \cdot 10^5$  Kerne pro Spur) aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Diese wurden anschließend mit Antikörpern gegen spezifische Histonmodifikationen inkubiert und mit Hilfe von „enhanced chemiluminescence“ (ECL) analysiert. Untersucht wurden die für aktives Chromatin typischen Histonmodifikationen H3K4me2, H3K4me3, H3K79me3 und H3K9Ac in C2C12- und C2A1a-Zellen an den Differenzierungstagen 0, 1, 3, 6 und 9. Die schwarzen Pfeile markieren die Induktion der Myogenese mit DM. Die Ponceau-Färbung der Kernhistone diente als Beladungskontrolle (P). Die



H3K9-Acetylierung zeigte keinerlei Veränderungen. Die H3K79me3 schien in C2A1a-Zellen an den Tagen 3-9 geringfügig gesteigert zu sein. Am deutlichsten zeigte sich ein Unterschied in der H3K4-Trimethylierung in Myoblasten und an den Tagen 1 und 3. Dieselbe Veränderung deutete sich bei H3K4me2 an.

In den charakteristischen Histonmodifikationen für aktives Chromatin (Abb. 4-46) konnten bei H3K4me3 die deutlichste Veränderung detektiert werden. Diese schien sowohl in Myoblasten, als auch an den Differenzierungstagen 1 und 3 in den C2A1a-Zellen eine deutliche Steigerung zu erfahren. Ein geringerer Effekt war beim dimethylierten H3K4 festzustellen. Eine Ausnahme bildete das H3K79me3, bei welchem eine leichte Steigerung ab dem dritten Tag der Myogenese detektiert wurde.

Des Weiteren wurden Modifikationen untersucht, welche charakteristisch für inaktives Chromatin sind (Abb. 4-47). Darunter befanden sich H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3 und H4K20me3. Eine Veränderung konnte lediglich bei der H3K27-Trimethylierung festgestellt werden. Diese trat ab der Induktion der Myogenese auf und nahm ab Tag 3 in den C2A1a-im Vergleich zu den C2C12-Zellen massiv zu. Eine mögliche Ursache dafür könnte die Fehlregulation der Ezh2-Expression (4.1.3.8) sein, welche die H3K27-Trimethylierung vermittelt.



**Abb. 4-47: charakteristische Histonmodifikationen des aktiven Chromatins**

Die Westernblotanalysen wurden durchgeführt, wie in Abb-4-46 beschrieben und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen die für inaktives Chromatin typischen Histonmodifikationen H3K9me2, H3K9me3, H3K29me3 und H4K20me3 inkubiert. Die Ponceau-Färbung der Kernhistone diente als Beladungskontrolle (P). Eine deutliche Veränderung konnte dabei in der Trimethylierung von Lysin 27 des Histon H3 (H3K27me3) festgestellt werden.

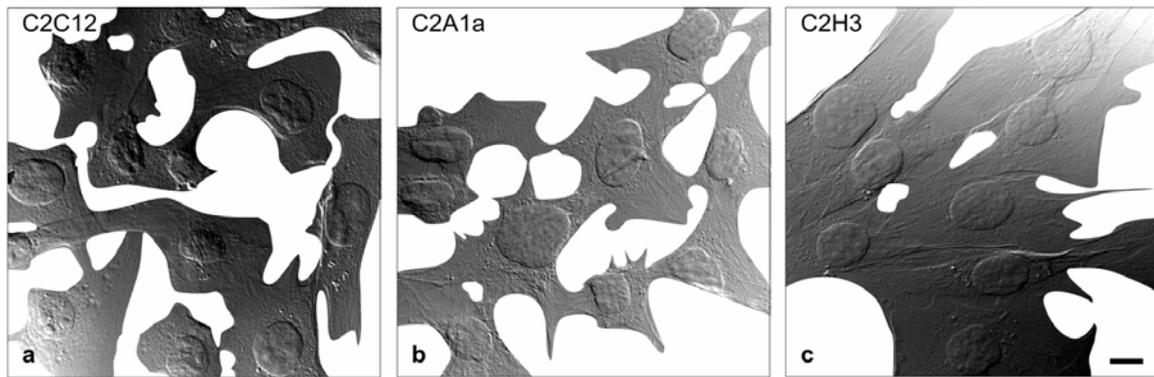
Zusammengenommen befanden sich unter den durch HMGA1a veränderten Histonmodifikationen charakteristische für aktives Chromatin (H3K4me3, H3K4me3 und H3K79me3) und mit H3K27me3 eine charakteristische Modifikation für inaktives Chromatin beziehungsweise für die Stilllegung spezifischer Gene. Da in diesen Experimenten die globale Veränderung der Modifikationsmuster untersucht wurde, lässt sich noch keine Aussage über die Veränderungen in definierten Genomabschnitten oder gar Promotorregionen bestimmter Gene treffen.

Diese Ergebnisse zeigen aber, dass die konstitutive Überexpression von HMGA1a in C2C12-Myoblasten und während der Myogenese zu einer globalen Veränderung verschiedener Histonmodifikationen führte.

## 4.2 Histon H3 in C2C12-Myoblasten und während der Myogenese

### 4.2.1 C2H3-EGFP-Zellen wachsen in Zellverbänden

Beobachtungen der C2H3-Zellen ergaben, dass diese nicht nur fähig waren die Myogenese zu durchlaufen, sondern sie schienen im Vergleich zu den C2C12-Zellen eine höhere Tendenz zur Fusion im selben Differenzierungszeitraum zu haben. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die C2H3-Zellen während der normalen Kultivierung ein morphologisch anderes Wachstumsverhalten aufwiesen. Dabei drängten sich C2H3-Zellen immer in Zellverbänden zusammen und ließen zwischen den einzelnen Zellclustern Freiräume, während C2C12- und C2A1a-Zellen bei vergleichbarer Konfluenz tendenziell eher als Einzelzellen auftraten (Abb. 4-48)



**Abb. 4-48: Wachstumsverhalten von C2C12-Zelllinien**

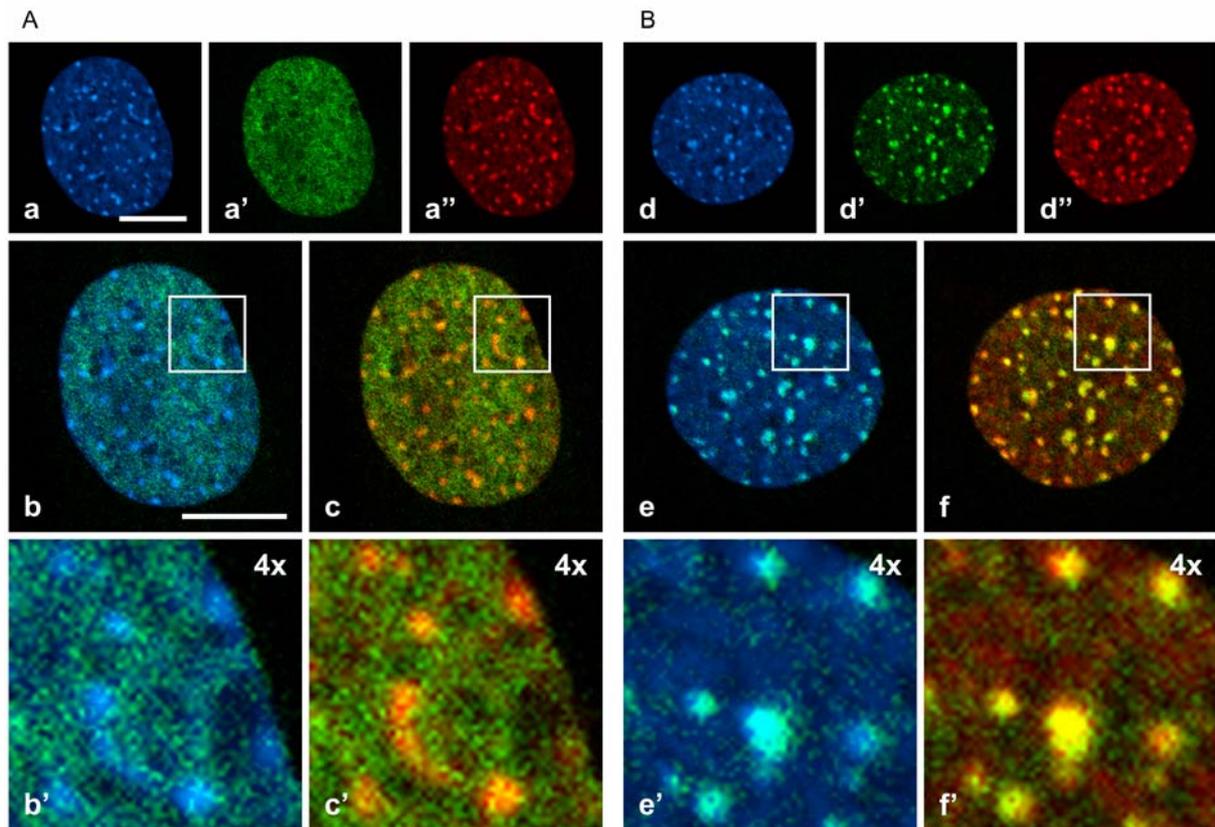
C2H3-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am Folgetag fixiert. Die Interferenzkontrast-Aufnahme wurde am konfokalen Mikroskop mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv und 2x Zoom aufgenommen. Dargestellt sind die Zelllinien C2C12 (a), C2A1a (b) und C2H3 (c). Letztere zeigten ein stärker geclustertes Wachstumsverhalten. Bereiche, welche nicht von Zellen bedeckt waren sind als weiße Flächen dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Diese Ergebnisse zeigten, dass es in den C2H3-Zellen zu einem veränderten Wachstumsverhalten unter Bildung von Zellverbänden kam.

## 4.2.2 H3 im Heterochromatin

### 4.2.2.1 Heterochromatineinbau und Modifikation von H3-EGFP in C2H3 möglich

Bei anfängliche Beobachtungen schien das H3-EGFP eher diffus im Kern verteilt zu sein und lediglich im Euchromatin eine Kolokalisation mit der Hoechst-33258-Färbung der DNA aufzuweisen (Abb. 4-49 A). Ein unbestimmter Teil der C2H3-Zellen wies jedoch eine Lokalisation von H3-EGFP in den Chromozentren auf (Abb. 4-49 B). Zudem wurde eine Kolokalisation des H3-EGFP mit der H3K9-Trimethylierung festgestellt.

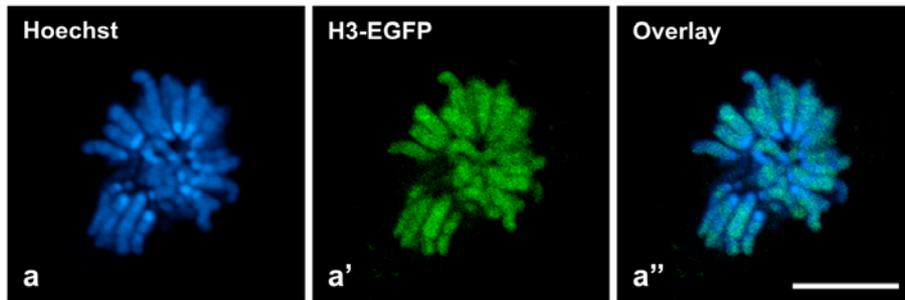


**Abb. 4-49: Unterschiedliche Lokalisation und Modifizierbarkeit des H3-EGFP in C2H3-Zellen**

C2H3-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am folgenden Tag wurde eine Immunlokalisation von H3K9me3 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers durchgeführt. In der ersten Reihe sind die sind jeweils Hoechst 33258 (a und d), H3-EGFP (a' und d') sowie die Immunlokalisation von H3K9me3 (a'' und d'') dargestellt. Letztere diene als Marker des perizentrischen Heterochromatins. Die zweite Reihe zeigt Overlays von DNA und H3-EGFP (b und e) sowie H3-EGFP und der Immunlokalisation von H3K9me3 (c und f). Die in der mittleren Reihe markierten Ausschnitte sind darunter jeweils in 4-facher Vergrößerung dargestellt (b', c', e' und f'). Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Die Kolokalisation von H3-EGFP mit H3K9me3 zeigt, dass das konstitutiv exprimierte H3-EGFP *in vivo* modifizierbar ist.

Zusätzlich wurde die DNA-Bindung des H3-EGFP während der Mitose überprüft (Abb. 4-50). Dabei zeigte sich eine spezifische Lokalisation an den Chromosomen mit einer relativ gleichmäßigen Verteilung. Im Heterochromatin war dagegen keine Akkumulation von H3-EGFP zu finden. Der Einbau der H3-Variante CenpA (Kalitsis et al. 2003) in das Kinetochor während der Mitose führt unter Umständen zu einer Verdrängung des normalen Histon H3 und erklärt die ausgesparten Centromerregionen.

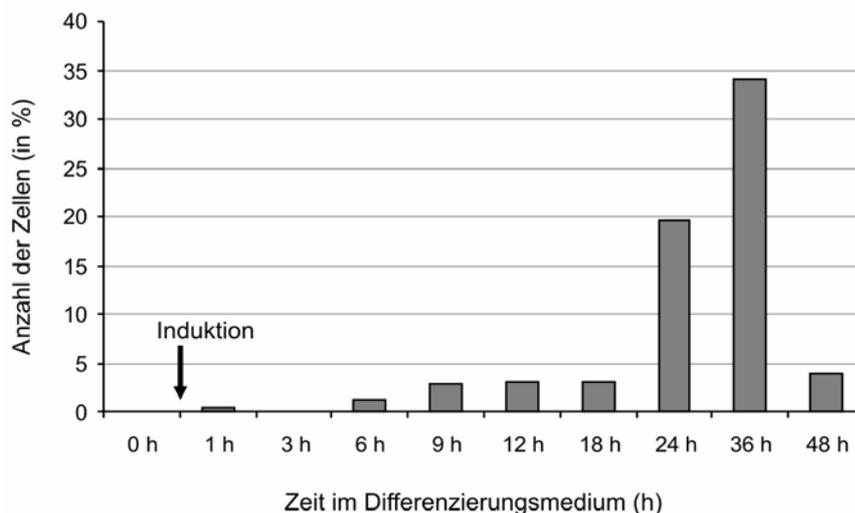


**Abb. 4-50: H3-EGFP lokalisiert an mitotischen Chromosomen**

Das perizentrische Heterochromatin ist im Vergleich zum Rest der Chromosomen durch eine intensive Hoechst 33258-Färbung hervorgehoben (a). Das H3-EGFP (a') ist dagegen gleichmäßig Verteilung entlang der mitotischen Chromosomen verteilt. Die Übereinanderlagerung der Bilder a und a' ist in a'' dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2.2 Zeitlich regulierter Einbau von H3-EGFP in perizentrisches Heterochromatin

Die Anreicherung des H3-EGFP in den Chromozentren trat kurz nach der Induktion der Myogenese am häufigsten auf. Um einen Überblick über den genauen zeitlichen Verlauf des Auftretens von H3-EGFP in den Chromozentren zu erhalten, wurden C2H3-Zellen auf Deckgläsern ausgesät, am nächsten Tag Differenzierungsmedium zugegeben und zu unterschiedlichen Zeiten je ein Deckglas entnommen und fixiert. Anhand von Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen wurde der Prozentsatz der Zellen bestimmt, bei welchen sich H3-EGFP in den Chromozentren befand (Abb. 4-51).



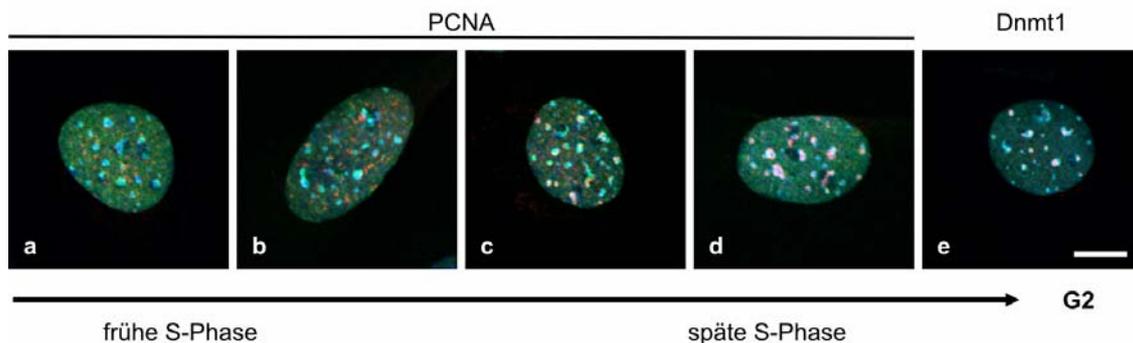
**Abb. 4-51: Zeitlich regulierter Einbau von H3-EGFP in C2C12-Chromozentren**

C2H3-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, am Folgetag mittels DM induziert und an den im Graph gekennzeichneten Zeitpunkten nach der Induktion (h) fixiert. Daraufhin erfolgte eine Auszählung der Kerne, welche eine H3-EGFP-Lokalisation in den Chromozentren zeigten. Diese sind in Prozent angegeben. Der Pfeil markiert die Induktion der Myogenese.

Innerhalb der ersten 18 h nach Induktion der Myogenese lag H3-EGFP in weniger als 5% der Zellen in den Chromozentren vor. Nach 24 h dagegen konnte in fast 20% der Zellen eine Anreicherung in den Chromozentren festgestellt werden. Nach 36 h waren es bereits knapp 35%. Diese Anreicherung verringerte sich jedoch 48 h nach der Induktion wieder und sank auf den Anfangslevel zurück. Somit scheint Histon H3 während der Myogenese zeitlich genau reguliert in das perizentrische Heterochromatin eingebaut zu werden.

#### 4.2.2.3 Replikations-unabhängiger Einbau von Histon H3 in das Heterochromatin

Um zu überprüfen, ob der Einbau von Histon H3 während einer bestimmten Zellzyklusphase stattfindet wurde in C2H3-Zellen eine Immunlokalisation von „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) und DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt1) durchgeführt (Abb. 4-52). PCNA als Teil der Replikationsmaschinerie lokalisiert während der frühen DNA-Replikation im Euchromatin und reichert sich im weiteren Verlauf zunehmend im spät replizierenden Heterochromatin an (Prasanth et al. 2004). Die Dnmt1 als *de novo*-DNA-Methyltransferase ist während der G2-Phase im perizentrischen Heterochromatin angereichert und kann aufgrund des Verteilungsmusters als Marker für bestimmte Zellzyklusphasen verwendet werden (Easwaran et al. 2005).



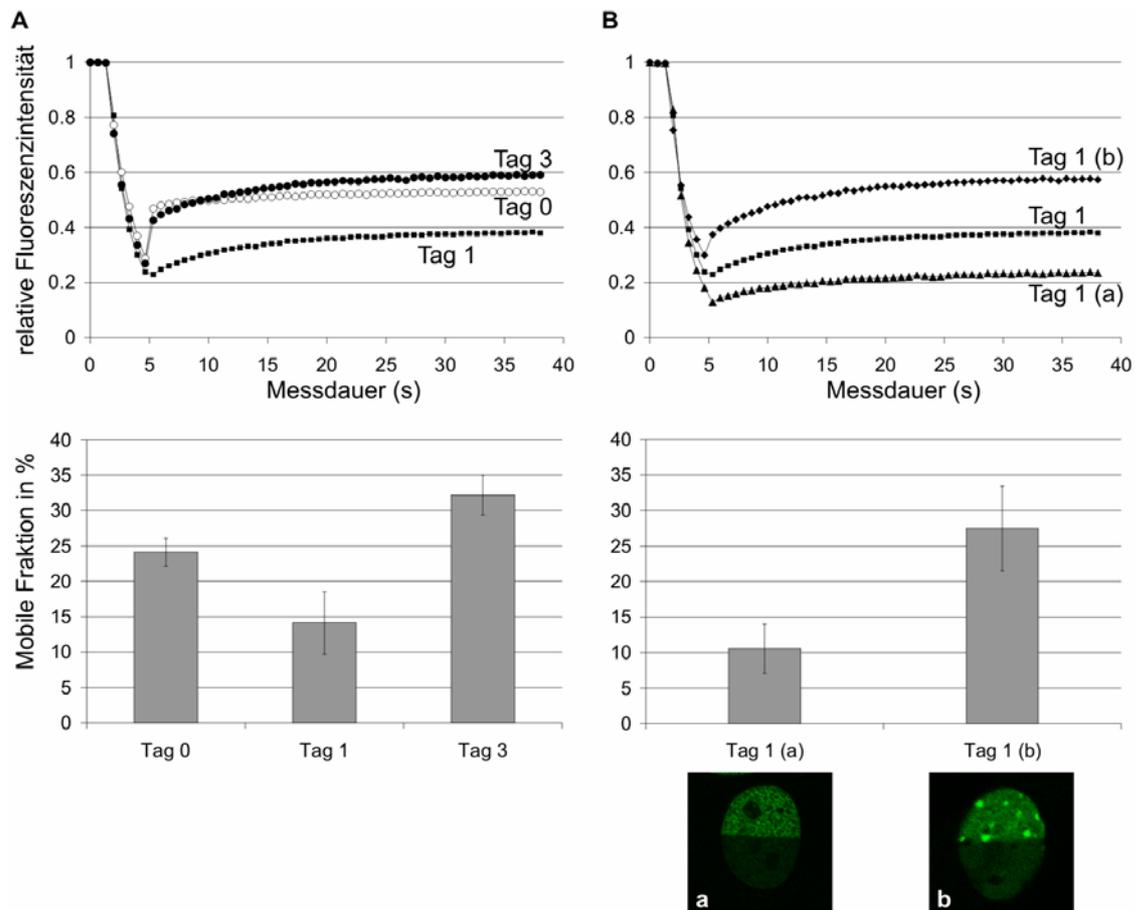
**Abb. 4-52: Histon H3 wird Replikations-unabhängig in das perizentrische Heterochromatin eingebaut**

C2H3-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am Folgetag mittels DM induziert. 24 h später wurde eine Immunlokalisation mit spezifischen Antikörpern gegen PCNA beziehungsweise Dnmt1 durchgeführt. In Zellen mit einer Anreicherung von H3-EGFP in den Chromozentren wurden aufgrund der PCNA- und Dnmt1-Verteilungsmuster die verschiedenen Zellzyklusphasen bestimmt. Gezeigt ist eine Übereinanderlagerung der Hoechst-33258-Fluoreszenz, des H3-EGFP und der Immunlokalisation von PCNA (a-d) beziehungsweise Dnmt1 (e). Die korrespondierenden Zellzyklusphasen sind angegeben. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu$ m.

Aufgrund der dauerhaften Lokalisation von H3-EGFP in den Chromozentren bei unterschiedlichem PCNA-Verteilungsmuster zeigten diese Ergebnisse, dass Histon H3 nach Induktion der Myogenese Replikations-unabhängig in das perizentrische Heterochromatin innerhalb eines Zellzyklus eingebaut wurde.

### 4.2.3 Unterschiedliche H3-Mobilität in Heterochromatin und Euchromatin

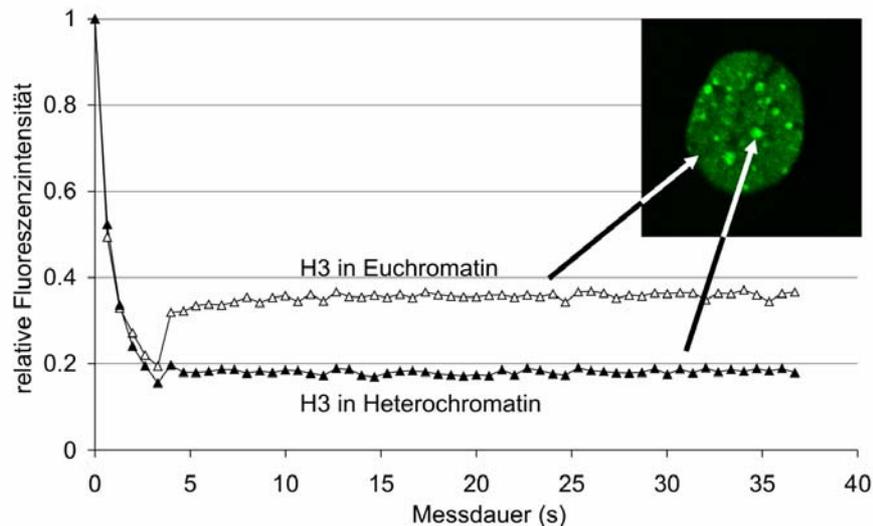
Der zeitlich regulierte Einbau von H3 in die Heterochromatinfoci und der Umbau des Chromatins während der Differenzierung im Zusammenhang mit veränderter Mobilität von HMGA1a und HP1 $\alpha$  warf die Frage nach der Dynamik von Histon H3 in C2C12-Zellen auf. Da der Einbau von H3 ins Heterochromatin verstärkt nach 24-48 h auftrat wurden C2H3-Zellen vor den FRAP-Analysen (Abb. 4-53) einen Tag und drei Tage in DM kultiviert.



**Abb. 4-53: H3-Dynamik in C2H3-Zellen**

C2H3-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, am Folgetag mit DM induziert und 24 h danach wurde die H3-EGFP-Dynamik mit Hilfe von FRAP analysiert. Es wurde jeweils 50% des Zellkerns gebleicht und die Fluoreszenzerholung in diesem Bereich gemessen. Die mobile Fraktion definierte sich aus der Differenz der gegen Ende der Messung erreichten maximalen und der nach dem Bleichen gemessenen geringsten Fluoreszenzintensität. (A) Die H3-Dynamik war an den Tagen 0 (nicht induziert) und 3 vergleichbar, wobei H3 an Tag 1 eine etwas höhere Mobilität aufwies als an Tag 3. Die mobile Fraktion hingegen war an Tag 1 mit  $\sim 24,11 \pm 2,0\%$  etwas geringer als an Tag 3 mit  $\sim 32,18 \pm 2,8\%$ . (B) Die Messungen von Tag 1 wurden aufgrund der massiven Standardabweichung in der Dynamik von den beiden anderen Tagen anschließend differenziert betrachtet. Dabei wies H3-EGFP in Kernen mit einer homogenen Verteilung eine geringere Mobilität und eine kleinere mobile Fraktion ( $\sim 10,54 \pm 3,5\%$ ) auf (a). Kerne mit einer H3-Anreicherung im Heterochromatin dagegen, verfügten über eine höher Mobilität und eine mobile H3-Fraktion von  $\sim 27,45 \pm 6,0\%$  (b).

Daraufhin wurde die H3-Dynamik spezifisch im Eu- sowie im Heterochromatin von Kernen bestimmt, welche eine H3-Anreicherung im Heterochromatin zeigten (Abb. 4-54). Bei diesen FRAP-Analysen wurden 50% der Zellen gebleicht und die Erholung



**Abb. 4-54: Erholungskurven nach Bleichen von H3-EGFP in Eu- und Heterochromatin**

Es wurden nur Zellen aus dem gleichen Ansatz wie in Abb. 4-53 mit einer sichtbaren Anreicherung von H3 im Heterochromatin analysiert. Dabei wurde die Dynamik von H3 in C2H3-Zellen im Euchromatin und im Heterochromatin getrennt voneinander mit Hilfe von FRAP ermittelt. In diesen Experimenten wurde im Heterochromatin eine Fläche von  $0,8 \mu\text{m}^2$  und im Euchromatin eine Fläche von  $4 \mu\text{m}^2$  gebleicht. Hierbei zeigte sich, dass H3 im Heterochromatin während der gesamten Messdauer nahezu komplett immobil war. Dessen mobile Fraktion betrug lediglich  $\sim 2,38 \pm 1,33\%$ . Im Euchromatin gleichartiger Kerne hingegen lag die mobile Fraktion des H3 bei  $\sim 17,2 \pm 1,2\%$ . Die Pfeile verweisen auf die entsprechenden Stellen in einem ausgewählten C2H3-Zellkern, die zum Bleichen verwendet wurden.

Bei Zellen, mit einer H3-Anreicherung im Heterochromatin, schien das H3-EGFP dort extrem stabil integriert zu werden, wobei es im Euchromatin mobil blieb. Zusätzlich wies H3 im Euchromatin von Kernen mit einer homogenen Verteilung eine deutlich geringere Dynamik auf, als in Kernen mit einer Heterochromatinanreicherung.

Zusammengenommen zeigten diese Ergebnisse, dass Histon H3 während der Muskeldifferenzierung in einem bestimmten Zeitfenster zwischen 24 und 36 h nach der Induktion, Replikations-unabhängig in das perizentrische Heterochromatin eingebaut wird und dass sich die H3-Dynamik innerhalb dieses Zeitfensters differenziell verändert. Eine erhöhte Mobilität von Kernhistonen ist kennzeichnend für aktives Chromatin in undifferenzierten Stammzellen (Meshorer et al. 2006).

## 5 Diskussion

Differenzierungsprozesse bedürfen eines exakt definierten Expressionsprofils bestimmter Gene. Dies wird von verschiedensten Faktoren gesteuert und beeinflusst. Dabei bietet Chromatin eine Plattform, um die Genexpression zu regulieren. Dies geschieht beispielsweise über epigenetische Mechanismen, die wiederum von einem bestimmten Repertoire an Chromatinproteinen, die dynamisch mit dem nukleosomalen Chromatin assoziieren, beeinflusst werden. Darunter befindet sich das Linker-Histon H1, welches zum Beispiel in der Veränderung der DNA-Methylierung eine Rolle spielt (Fan et al. 2005). Eine weitere Gruppe dynamischer Architekturfaktoren des Chromatins stellen die HMG-Proteine dar. Von ihnen ist bekannt, dass sie die lokale Konformation der DNA und/oder Nukleosomen verändern und somit die Zugänglichkeit und Plastizität des Chromatins modulieren. Der daraus resultierende Einfluss auf DNA-abhängige Prozesse wirkt sich zum Beispiel auf die Tumorprogression und zelluläre Differenzierungsprozesse aus (Battista et al. 2003; Caron et al. 2005; Hock et al. 2006; Hock et al. 2006; Reeves et al. 2001).

Hier wurde die Rolle der HMGA1-Proteine bei Differenzierungsprozessen, insbesondere während der Myogenese untersucht. Als Modellsystem dienten hierbei C2C12-Mauszellen, da in diesen sowohl die Osteogenese als auch die Myogenese induziert werden kann. Es wurde eine C2C12-Zelllinie etabliert, die HMGA1a-EGFP stabil überexprimierte (C2A1a-Zellen). Mit deren Hilfe galt es im Wesentlichen den Einfluss von HMGA1a auf die funktionelle Strukturierung und topologische Umorganisation des Chromatins während der Differenzierung zu analysieren.

### 5.1 HMGA-Proteine und Proliferation

Eine HMGA-Überexpression korreliert in den meisten Tumorzellen mit deren Malignität und dient als diagnostischer Marker. Dabei kommt es in vielen Tumoren zu einer ~5-200-fachen Überexpression von HMGA (Giancotti et al. 1987; Giannini et al. 2000; Johnson et al. 1988; Reeves et al. 2001; Tallini et al. 1999; Treff et al. 2004). In den C2A1a-Myoblasten wurde HMGA1 im Vergleich zu den wildtypischen C2C12-Zellen lediglich ~2,6-fach überexprimiert und liegt damit unterhalb beziehungsweise an der unteren Grenze der Überexpression in Tumoren.

Vergleichbar zu Tumorzellen war aber die stark erhöhte Teilungsrate der C2A1a-Zellen bei gleich bleibender Verteilung der einzelnen Zellzyklusstadien. Wie HMGA-Proteine die Proliferation von Zellen erhöhen ist noch unbekannt, jedoch stellt der detektierte Einfluss auf den zellulären Zuckerhaushalt einen Erklärungsansatz für diese Eigenschaft dar. Es wurde bereits beschrieben, dass ein Verlust von HMGA1 zu Insulinresistenz und Typ II-Diabetes führt (Foti et al. 2005). Im Gegensatz dazu könnte eine erhöhte HMGA1a-Proteinmenge den Metabolismus der Zellen fördern, indem sie die Expression von dafür verantwortlichen Genen positiv beeinflusst. Bei der hier untersuchten Expression von Komponenten des IGF-Systems, die in eine solche Regulation involviert sind, war dies in C2A1a-Myoblasten allerdings nicht der Fall.

Dagegen könnte der Einfluss der HMGA1a-Proteine auf die Replikation die entscheidende Rolle bei der Proliferationssteigerung spielen. Wie wir in Zusammenarbeit mit A. Schepers (GSF, München) zeigen konnten, können HMGA-Proteine in *in vitro* Assays die Replikationskompetenz von Plasmiden erhöhen und tragen dazu bei, künstliche Replikationsursprünge zu generieren.

Dies geschieht über die Rekrutierung des „origin recognition complex“ (ORC) durch die Interaktion von HMGA1a mit bestimmten ORC-Proteinen (Orc1, Orc6). Diese Kooperation von HMGA- und ORC-Proteinen stellt einen direkten Zusammenhang zwischen Replikationskompetenz von Chromatin und Proliferationskontrolle dar.

Andererseits wurden HMGA-Proteinen anti-proliferative Eigenschaften in myelolymphoproliferativen Störungen (Fedele et al. 2006) und während der zellulären Seneszenz (Hock et al. 2006) zugeschrieben. Während Letzterer tragen sie dazu bei, Seneszenz-typische Heterochromatin-Foci in Zellen zu generieren (Narita et al. 2006). Interessanterweise zeigten C2A1a-Zellen nach Induktion der Myogenese ein anti-proliferatives Verhalten. Die Teilungsrate war im Vergleich zu wildtypischen und differenzierenden C2C12-Zellen deutlich reduziert. Eine mögliche Begründung für das verlangsamte Wachstum wäre der negative Effekt der HMGA1a-Proteine auf die Expression einiger Komponenten des IGF-Systems. So wurde in den langsamer proliferierenden C2A1a-Zellen beispielsweise die Herunterregulierung des „insulin like growth factor 1“ (Igf1), „insulin like growth factor 2“ (Igf2), des Igf1-Rezeptors und der Igf-Bindungsproteine Igf-bp1, Igf-bp2 und Igf-bp3 detektiert.

Das IGF-System ist an der Regulation des Glucosehaushaltes von Zellen beteiligt (Pantaleon et al. 1996), indem Igf1 den Glucosetransporter Glut4 in Muskelzellen an die Plasmamembran rekrutiert (Bilan et al. 1991) und somit das Glucoseaufnahmepotential reguliert. So könnte die verminderte Igf1-Expression den geringeren Glucoseverbrauch der C2A1a-Zellen im Vergleich zu C2C12-Zellen erklären und weist auf eine Verbindung zwischen Metabolismus und verringerter Wachstumsrate hin.

In diesem Zusammenhang spielt auch IL-6 eine wichtige Rolle. In Patienten mit Fettleibigkeit und Typ-II-Diabetes wurden ein um das 2-3-fach erhöhter IL-6-Plasmalevel festgestellt und unter den Zytokinen weist IL-6 die stärkste Korrelation mit Insulin-Resistenz und Typ-2-Diabetes auf. In C2C12-Zellen wurde gezeigt, dass bei einem Anstieg der IL-6-Expression, sowohl die Expression des Glucosetransporters Glut4, als auch dessen Rekrutierung an die Plasmamembran vermindert ist (Jove et al. 2005). Somit könnte die hier beschriebene Steigerung der IL-6-Expression in C2A1a-Zellen zusätzlich die geringere Glucoseaufnahme erklären.

Eine weitere Begründung für das geringere Wachstum und den Rückgang der Zellzahl der C2A1a-Zellen während der Muskeldifferenzierung stellt die verringerte Expression des Zellzyklusregulators pRb dar. Während der Myogenese führt die verminderte Expression von funktionellem pRb zu erhöhter Apoptose (Wang et al. 1997). Ob dies auch in induzierten C2A1a-Zellen zutrifft, ist noch unklar und könnte durch Apoptosemessungen, zum Beispiel über einen TUNEL-Assay, überprüft werden.

Neben diesen Möglichkeiten könnten massive Veränderungen im Chromatin (siehe unten) und eine damit verbundene geringere Plastizität zum anti-proliferativen Effekt beitragen.

Am wahrscheinlichsten ist, dass die hier analysierten Prozesse, das veränderte Igf-System, die verringerte Glucoseaufnahme, die reduzierte pRb-Expression und die Modulation der gesamten Chromatinplastizität, synergistisch zur Reduktion der Wachstumsrate in C2A1a-Zellen führen. Letztendlich zeigen diese Ergebnisse aber klar, dass sowohl eine HMGA-vermittelte erhöhte Proliferation als auch ein anti-proliferativer Effekt von zusätzlichen Parametern, wie äußeren Signalen, abhängig sind.

## **5.2 Regulierte HMGA1a-Expression während der Differenzierung**

Vorversuche ergaben, dass HMGA1-Proteine sowohl nach Induktion der Osteogenese durch BMP-2, als auch nach Induktion der Myogenese durch Serumentzug nach unten reguliert werden und in terminal differenzierten Myotuben vollständig fehlen. Dies korreliert mit Beobachtungen, bei welchen HMGA-Proteine vorwiegend in embryonalen, undifferenzierten Zellen nachgewiesen wurden, in adulten Zellen hingegen abwesend sind (Fedele et al. 2001; Hock et al. 2006; Sgarra et al. 2004). Die Ergebnisse zeigen, dass exogene Signale direkten Einfluss auf die HMGA-Expression nehmen und nach Induktion der Differenzierung zu einer graduellen Herunterregulierung führen. Sowohl im Falle der Osteogenese, als auch der Myogenese spielen TGF- $\beta$ -Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle, da TGF- $\beta$ -Signale die Expression von HMGA-Proteinen in beiden Differenzierungsprozessen regulieren (Ebisawa et al. 1999; Olson et al. 1986). Interessanterweise zeigten vor kurzem publizierte Studien, dass TGF- $\beta$ -Signale über den Einfluss auf die HMGA2-Expression die epitheliale Differenzierung kontrollieren (Thuault et al. 2006). Andere Untersuchungen bewiesen, dass HMGA1 die Tumorprogression und die epithel-mesenchymale Transition (EMT) fördern (Reeves et al. 2001). In Tumorzellen, die eine HMGA-Überexpression zeigen, reagiert die HMGA-Expression auf zahlreiche exogene Faktoren, wie Serum (Johnson et al. 1989; Reeves et al. 2001), “transforming growth factor  $\alpha$ “ (TGF- $\alpha$ ) (Ram et al. 1993), “epidermal growth factor” (EGF) (Holth et al. 1997), “platelet-derived growth factor” (PDGF) und “fibroblast growth factor” (FGF) (Lanahan et al. 1992). Hinzu kommen Phorbolester (Cmarik et al. 1998; Friedmann et al. 1993), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Endotoxin (Perrella et al. 1999). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass TGF- $\beta$ -Signale Hauptregulatoren der HMGA-Expression sind und darüber Veränderungen im Chromatin induzieren können.

### **5.3 Anhaltende HMGA-Expression während der Myogenese beeinflusst die Expression spezifischer Gene**

Während die frühe Osteogenese nicht durch die anhaltende Expression von HMGA1a-EGFP beeinflusst wurde, führte diese zu einer kompletten Inhibition der Myogenese. Dies spiegelt sich in der fehlenden Expression muskelspezifischer Strukturproteine, wie Myosin und  $\alpha$ -Aktin und in der unterdrückten beziehungsweise fehlenden Expression wichtiger Schlüsseltranskriptionsfaktoren der Myogenese wider. Zu diesen gehören Myod (Megeney et al. 1995), Myogenin (Naidu et al. 1995), Igf1 (Tureckova et al. 2001) und Igf2 (Wilson et al. 2003). Andere Faktoren, die sich hemmend auf die Myogenese auswirken zeigten eine leicht erhöhte (TGF- $\beta$ ) (Olson et al. 1986) oder eine deutlich gesteigerte Expression (Msx1) (Lee et al. 2004). Interessant ist in diesem Zusammenhang die erhöhte Expression von Msx1, welches in Kooperation mit Histon H1b die Expression von Myod unterdrückt (Cirillo et al. 2004; Lee et al. 2004). Daher könnte die erhöhte Msx1-Expression den Ausfall der Myod-Expression in C2A1a-Zellen erklären. Dies wiederum würde das Fehlen von Myogenin und letztlich das Ausbleiben der Differenzierung in C2A1a-Zellen und die fehlende Myosin- und  $\alpha$ -Aktin-Expression erklären. Da IL-6 beispielsweise die Osteogenese stimuliert (Taguchi et al. 1998), unterstützt die gesteigerter IL-6-Expression in C2A1a-Zellen die Tatsache, dass diese einen normalen Eintritt in die Osteogenese aufweisen. Die Effekte auf die oben genannten Gene sind als spezifisch anzusehen, da zahlreiche der untersuchten Faktoren in C2A1a-Zellen im Vergleich zu wildtypischen C2C12-Zellen kein verändertes Expressionsmuster aufwiesen. Hierzu zählen „myogenic factor 5“ (Myf-5), „myogenic factor 6“ (Myf-6) und die Proteine „inhibitor of DNA binding“ 1-3 (Id1, Id2 und Id3), die ebenso entscheidend in die Myogenese eingreifen (Naidu et al. 1995; Vinals et al. 2004; Wu et al. 2005).

HMGA1 verändert auch die Expression der beiden Komponenten des PCR2-Polycomb-Komplexes DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt1) und „enhancer of zeste 2“ (Ezh2) und nimmt somit Einfluss auf die epigenetische Regulation bestimmter Gene.

Die Ergebnisse bestätigen, dass HMGA1-Proteine die Transkription spezifischer Gene beeinflussen können. Die Expressionsregulation spezifischer Gene wurde auch in vielen menschlichen Tumoren beschrieben, in denen eine HMGA-Überexpression zu einer aberranten Expression von Genen führt, die Zellproliferation und Apoptose regulieren (Fedele et al. 2001). Interaktionen mit Nuklear factor (NF)- $\kappa$ B (John et al. 1995; Reeves et al. 2001) den Tumorsuppressoren p53 (Frasca et al. 2006) und pRb (Fedele et al. 2006) erklären, wie HMGA Einfluss auf die Genexpression in Tumoren nimmt. Zudem sind HMGA-Proteine Bestandteil von Multiproteinkomplexen, den Enhanceosomen, welche die Transkription von Genen wie beispielsweise INF- $\beta$  regulieren (Bonney et al. 1999; Yie et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass HMGA-Proteine zellspezifisch mit anderen Faktoren interagieren (Sgarra et al. 2005) und somit auch in einer zellspezifischen Art und Weise die Genexpression beeinflussen. Diese Spezifität wurde auch bei den in dieser Arbeit beschriebenen Expressionsanalysen festgestellt.

#### **5.4 Die Herunterregulierung von HMGA1-Proteinen ist notwendig für die Aktivierung des Myogeneseprogrammes**

Wie oben diskutiert, führt die anhaltende HMGA1-Expression zum Verlust der Expression Myogenese-relevanter Schlüsselfaktoren und damit zur Repression der Myogenese. Um zu überprüfen, ob die normal in C2C12-Zellen erfolgende Herunterregulierung von HMGA1 auch in C2A1a-Zellen ausreicht, das Myogeneseprogramm wieder zu reaktivieren, wurden siRNA-Experimente durchgeführt. Diese zeigten, dass der Knock-down des endogenen HMGA1, sowie des HMGA1a-EGFP genügt, um einen Wiedereintritt in die Myogenese zu gewährleisten und das normale Expressionsmuster von Myod, Myogenin, IL-6, Myosin und  $\alpha$ -Aktin wiederherzustellen. Dies belegt, dass eine Herunterregulierung von HMGA1 zwingend notwendig ist, um ein korrektes Expressionsmuster bestimmter Gene und die Myogenese in C2C12-Zellen zu ermöglichen. Durch Immunfluoreszenz-Analysen konnten nach einem HMGA1-knock-down sogar C2A1a-Zellen identifiziert werden, die Myosin als Marker für eine terminale Differenzierung, exprimierten. Allerdings war die Differenzierung weiterhin unvollständig, da keine vielkernigen Myotuben gefunden wurden. Da auch nach siRNA-Transfektion weiterhin ein schwaches HMGA1a-EGFP-Fluoreszenzsignal detektierbar war, ist davon auszugehen, dass der Knock-down auch in transfizierten Zellen nicht zu einer vollständigen Herunterregulierung der HMGA1-Expression führte. Dies könnte begründen, warum es nicht zu einer vollständigen Ausbildung von Myotuben kam. Allerdings zeigen gerade diese Ergebnisse, dass ein Fehlen von HMGA1 nach der Induktion ausreicht, um das Differenzierungsprogramm bis zur Expression von Myosin zu starten. Ein Knock-down von HMGA1 in Myoblasten war dagegen nicht ausreichend, um die Differenzierung zu initiieren. Dies zeigt, dass ein exogenes Signal (Yaffe et al. 1977) benötigt wird, um die Differenzierung zu beginnen und dass für den normalen Verlauf des Myogeneseprogrammes die HMGA1-Herunterregulierung zwingend erforderlich ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Veränderung der globalen Chromatinzusammensetzung, durch eine fehlende oder anhaltende Expression eines Architekturelements des Chromatins, entscheidenden Einfluss auf das zelluläre Differenzierungspotential nimmt.

## **5.5 Modulation des Chromatins durch HMGA-Proteine**

### **5.5.1 HMGA-Proteine verändern die Zusammensetzung des Chromatins**

Als Architekturfaktoren nehmen HMGA-Proteine durch die Bindung an Chromatin beziehungsweise durch Konkurrenz und/oder Interaktion mit anderen Proteinen an der funktionellen Strukturierung des Chromatins teil und regulieren so die Expression zahlreicher Gene. Bislang war jedoch unbekannt, dass HMGA-Proteine auch die Expression anderer Strukturproteine des Chromatins beeinflussen können. Westernblot-Analysen in HMGA1a-EGFP-überexprimierenden Zellen ergaben ein verändertes Expressionsmuster der Heterochromatin Proteine 1 $\alpha$  und 1 $\beta$  (HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$ ), dem Methyl-CpG-bindenden Protein 2 (MeCP2), sowie einer geringeren Proteinmenge an Histon H1 in analysierten Kernen. Dabei kam es zu einer Herunterregulierung des HP1 $\alpha$  in Myoblasten und der kompletten frühen Differenzierung, während HP1 $\beta$  ausschließlich in Myoblasten eine Überexpression erfuhr und nach Induktion der Myogenese normal exprimiert wurde. MeCP2 wird normalerweise erst mit der terminalen Differenzierung exprimiert, konnte in C2A1a-Zellen allerdings bereits in nicht-induzierten Myoblasten detektiert werden. Trotz seiner Funktion bei der Fusion der Chromozentren blieb diese in C2A1a-Zellen aus. Die geringere Proteinmenge des Histon H1 in C2A1a-Zellen ist vermutlich auf die Verdrängung des Linker-Histons von seinen Bindungsstellen durch HMGA1a und dessen Verlust während der Präparation zurückzuführen.

Es ist bekannt, dass eine Depletion von Histon H1 in vielen Zellen zu einer  $\sim$ 4-fachen Reduktion der Acetylierung von Lysin 12 an Histon H4 (H4K12Ac) und zu einer  $\sim$ 2-fachen Reduktion der Trimethylierung des Lysin 27 an Histon H3 (H3K27me3) führt. Zusätzlich führt der Verlust von H1 zu einer geringeren DNA-Methylierung der differentiellen Methylierungsdomäne (DMD) im *Igf2-H19*- und des *Gtl2-Dlk1*-Genlokus (Fan et al. 2005). HP1 modifiziert die Stilllegung von Genen durch „position effect variegation“ (PEV) in Bezug auf den chromosomalen Kontext. Ein Beispiel hierfür ist das CD2-Gen. Bei dessen Translokation ins Heterochromatin verstärkt HP1 die PEV, bei Translokation in nicht-centromerische Regionen unterdrückt es die PEV (Festenstein et al. 1999). Des Weiteren ist die Proteinmenge von HP1 für den Einfluss auf die PEV entscheidend (Festenstein et al. 1999). Es ist davon auszugehen, dass eine veränderte Verfügbarkeit von HP1 und Histon H1 letztendlich auch den epigenetischen Zustand der Zelle betrifft und damit die Expression von Genen beeinflussen kann. Somit beeinflussen HMGA-Proteine auch indirekt die Funktionalität des Chromatins.

### **5.5.2 HMGA-Proteine und MecP2 konkurrieren um DNA-Bindungsstellen**

Bildgebende Verfahren zeigten, dass HMG-Proteine in lebenden Zellen nicht stabil mit dem Chromatin assoziiert sind (Catez et al. 2004; Harrer et al. 2004). Sie bewegen sich vielmehr von einer Bindungsstelle zur nächsten in einer Art „stop and go“. Dabei beträgt die „stop“-Phase am Chromatin mehrere Sekunden und dauert länger als die „go“-Phase. Das heißt HMG-Proteine verbringen die meiste Zeit in Assoziation mit dem Chromatin. Diese Dynamik erlaubt einen ständigen Austausch von

Molekülen an den entsprechenden Bindungsstellen und macht sie somit zum Bestandteil eines Netzwerkes, welches das Chromatin dynamisch modulieren kann. Dazu gehören beispielsweise auch Histon H1, HP1 und, wie in dieser Arbeit identifiziert, MeCP2. Innerhalb dieses dynamischen Netzwerkes kommt es sowohl zu Kompetitionen, als auch zu transiente Interaktionen der Komponenten. Diese wiederum verändern die lokale Konzentration einzelner Proteine und verändern darüber die lokale Chromatinarchitektur. So konkurrieren HMG-Proteine untereinander und mit Histon H1 um präferenzielle Bindungsstellen (Bonney et al. 1999; Catez et al. 2004; Funayama et al. 2006). In dieser Arbeit wurde eine ähnliche Konkurrenz zwischen HMGA1a und MeCP2 beschrieben. Die Koexpression beider Proteine erhöht die Mobilität des MeCP2 signifikant. Dabei wird dessen Verweildauer an der DNA durch die Anwesenheit von HMGA1a von ~60 Sekunden auf ~30 Sekunden reduziert.

Überraschend war, dass HMGA1a eine bislang unbekannte Präferenz zu methylierter DNA aufwies und wie auch MeCP2 (Drewell et al. 2002) bevorzugt an hypermethylierte DNA-Fragmente wie die Differential methylated domain (DMD) des Igf2-Genlokus bindet. Wie HMG-A-Proteine, besitzt MeCP2 auch zwei AT-Hook-DNA-Bindungsmotive, die möglicherweise die Bindung an methylierte DNA durch die Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) unterstützen. Dies erklärt die Notwendigkeit von AT-reichen Sequenzen in Nachbarschaft zu CpG-Dinukleotiden, welche eine hoch affine Bindung von MeCP2 an die methylierte DNA erst ermöglicht (Klose et al. 2005). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die AT-Hook-Motive der HMG-A-Proteine mit den AT-Hook-Motiven des MeCP2 um Bindungsstellen an methylierter DNA konkurrieren und so die Verweildauer von MeCP2 um mehr als 50% reduziert wird. Diese Konkurrenz erklärt auch, warum die verfrühte Expression von MeCP2 nicht zu einer Fusion der Chromozentren führt, obwohl diese von MeCP2 differenzierungsunabhängig induziert werden kann (Brero et al. 2005).

### **5.5.3 HMGA-Proteine interagieren mit HP1-Proteinen**

Ebenso wie die Konkurrenz um Bindungsstellen, sind auch dynamische Kooperationen von HMG-A-Proteinen mit anderen Strukturkomponenten denkbar. Zur Analyse potentieller Interaktionen, wurden die kodierenden Sequenzen verschiedener Chromatinproteine in geeignete Vektoren kloniert, die es erlauben Protein-Protein-Kooperationen *in vivo* mittels „Bimolecular fluorescence complementation“ (BiFC) zu analysieren (Grinberg et al. 2004; Hu et al. 2002; Kerppola 2006). Im BiFC-Assay werden zwei potentielle Interaktionspartner in einer Zelle exprimiert. Dabei sind beide mit je einem nicht fluoreszierenden Fragment eines Fluorophors fusioniert. Durch das Zustandekommen einer Interaktion dieser beiden Moleküle – bei einem Abstand <100 Å (Hu et al. 2002) – verbinden sich die Fluorophorfragmente und falten sich zu einem funktionellen Fluorophor. Der Vorteil dieser Methode ist die Lokalisation der Protein-Protein-Interaktionen in der lebenden Zelle. Zunächst wurde die Spezifität des Assays für Chromatinproteine überprüft, indem eine Reihe bekannter Dimerisierungen von Chromatinproteinen in menschlichen Zellen analysiert wurden.

Die bekannte Homo- (Brasher et al. 2000; Nielsen et al. 2001; Ye et al. 1997) und Heterodimerisierung (Nielsen et al. 2001; Ye et al. 1997) von HP1-Proteinen (HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$ , HP1 $\gamma$ ) konnte mit Hilfe des BiFC-Assay bestätigt werden und zeigte die Anwendbarkeit der Methode für Chromatinproteine. Zudem zeigte das Verteilungsmuster der HP1 $\alpha$ -BiFC-Dimere eine Kollokalisierung mit dem endogenen HP1 $\alpha$ , was den Schluss zulässt, dass HP1 $\alpha$  im Zellkern, sowohl gebunden, als auch ungebunden als Homodimer vorliegt. Mit Hilfe mutierter Proteine und HP1 $\alpha$ -Fragmenten, konnte bestätigt werden, dass die Chromoshadowdomäne (CSD) zusammen mit der Hinge-Region für die Dimerisierung des HP1 $\alpha$  notwendig und hinreichen sind (Eskeland et al. 2006; Maison et al. 2004). Die Chromodomäne (CD), mit welcher HP1-Proteine an trimethyliertes H3K9 (H3K9me3) binden (Lachner et al. 2001), spielt für die HP1-HP1-Interaktion dagegen keine Rolle.

Wie im Falle der HP1-Proteine war die Dimerisierung der HMGN-Proteine bereits beschrieben (Postnikov et al. 1995). Durch BiFC konnte jedoch erstmals die Lokalisation der HMGN-Dimerisierung in einer Zelle sichtbar gemacht werden. Zudem zeigten die Analysen, dass in Interphasezellen auch bisher unbekannte Heterodimere aus HMGN1 und HMGN2 möglich sind. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Dimerisierung der HMGN-Proteine erst bei Lokalisation am Chromatin erfolgt, was gegen eine permanente Präsenz von HMGN-Dimeren spricht. Vielmehr scheint die Dimerisierung erst am Bindungsort vonstatten zu gehen und sich dort zu stabilisieren. Demnach erfolgt die Kooperation nach Bindung des ersten Moleküls am Nukleosom, die durch Bindung eines zweiten Moleküls mehr (Homodimer) oder weniger (Heterodimer) stabilisiert wird. Erste neuere Daten zeigen, dass die HMGN-Dimerisierung durch den sauren C-Terminus reguliert ist. Trotz der Kollokalisierung der beiden HMGN-BiFC-Partner an mitotischen Chromosomen konnte dabei keine Interaktion festgestellt werden, was belegt, dass die alleinige räumliche Nähe der BiFC-Partner nicht ausreicht, um ein BiFC-Signal zu generieren. Dies zeigt auch, dass HMGN-Proteine als Monomere, aber nicht als Dimere an mitotischen Chromosomen lokalisieren können. Da ihre Funktion aber durch Homodimerisierung vermittelt wird, ist diese Assoziation mit mitotischen Chromosomen in überexprimierenden Zellen zwar möglich, aber eher als unspezifisch anzusehen.

Die Spezifität des BiFC-Assays wurde auch durch weitere Analysen bestätigt, bei denen trotz Koexpression und Kollokalisierung am Chromatin keine Komplementierung der Fluorophore erfolgte. So bilden beispielsweise MeCP2 oder HMGA-Proteine keine Dimere und Linker-Histone nur unter bestimmten Voraussetzungen. Überraschend dagegen war die Homodimerisierung von HMGB-Proteinen, was allerdings noch weiter untersucht werden muss.

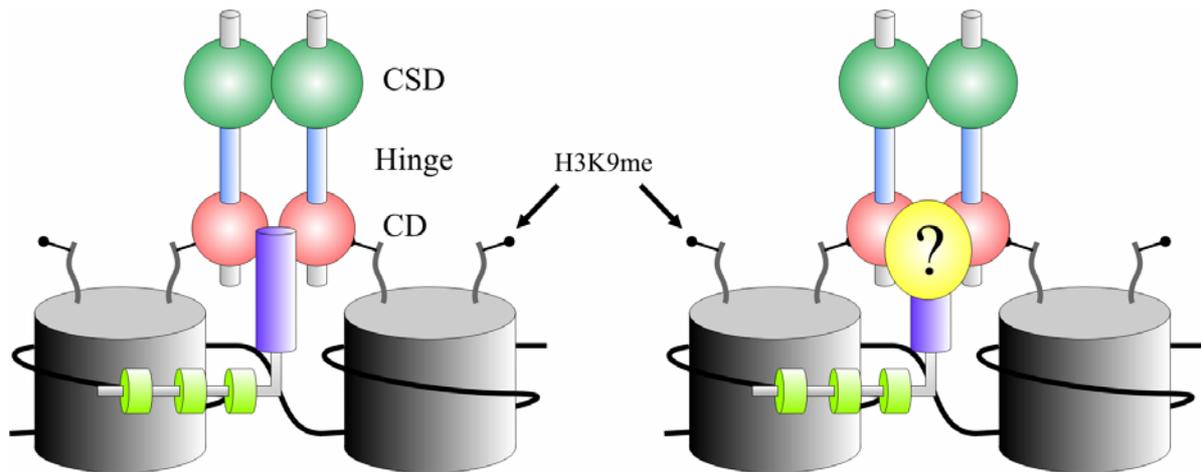
Die Untersuchungen zeigten klar, dass unter Berücksichtigung mehrerer wichtiger Kriterien, BiFC geeignet ist, die spezifische Interaktion von Chromatinproteinen zu analysieren. Deshalb wurden nach Koexpression verschiedener Proteinkombinationen mögliche Interaktionen unterschiedlicher Chromatinproteine untersucht.

Der Schwerpunkt lag dabei auf der Identifikation möglicher HMGA-Interaktionspartner. Bei diesen Analysen stellten sich alle HP1-Varianten als potente Kooperationspartner heraus. Mitglieder anderer HMG-Proteinfamilien, sowie MeCP2 und Histon H1.5 interagierten dagegen nicht mit HP1-Proteinen. Die Interaktion von HMGA und HP1 erfolgte in einem definierten Muster, das der Verteilung des Heterochromatins in den untersuchten Zellen entsprach. Auch dies spricht für die Spezifität der Interaktion dieser beiden Heterochromatinproteine.

Analysen mit den einzelnen HP1-Domänen und einem trunkierten HMGA ergaben, dass für die Interaktion der saure C-Terminus der HMGA-Proteine und die Chromodomäne (CD) von HP1 notwendig und ausreichen ist (Abb- 5-1). Analysen mit einem mutierten Protein ergaben, dass für eine korrekte Lokalisation der interagierenden Proteine zusätzlich die DNA-Bindung von HMGA nötig ist. Zwar erzeugte die Kombination eines HMGA1-Proteins mit mutierten AT-Hooks ein schwaches BiFC-Signal, eine Anreicherung im Heterochromatin blieb jedoch aus.

Bislang ist allerdings unklar, ob die Interaktion zwischen dem HMGA-C-Terminus und HP1-Chromodomäne direkt oder indirekt erfolgt und ob weitere Adapterproteine zur Bildung eines Komplexes beitragen. Kandidaten für derartige Komplexe könnten einige Komponenten des „origin recognition complex“ (ORC) darstellen, die ebenfalls mit dem sauren C-Terminus des HMGA (Orc1 und Orc6) (Thomae et al, *eingereicht*), oder mit HP1 (Orc5) (persönliche Mitteilung von Andreas Thomae, GSF München) interagieren. Letzteres wird auch durch Berichte über Interaktionen von HP1 mit ORC in *Drosophila* unterstützt (Badugu et al. 2003). Die HMGA:Orc-Interaktion gibt auch Aufschluss über die Rolle von HMGA-Proteinen in der DNA-Replikation, wobei der genaue Mechanismus noch zu klären ist.

Diese Ergebnisse bestätigten erstmals frühere Vermutungen (Fedele et al. 2001; Hock et al. 2006; Reeves 2001), dass der saure C-Terminus der HMGA-Proteine für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist. Es ist denkbar, dass ORC-Proteine vermittelnd in die HMGA:HP1-Interaktion eingreifen können. Die Identifikation von HMGA als Interaktionspartner von HP1 könnte erklären, warum HP1 häufig in AT-reichen DNA-Regionen lokalisiert ist und erklärt die lange Verweildauer von HP1 im Heterochromatin *in vivo*. Obwohl die Chromodomäne (CD) für die Bindung von HP1 an trimethyliertes Lysin 9 des Histon H3 (H3K9me3) entscheidend ist (Lachner et al. 2001), zeigten Assays mit *in vitro* generiertem H3K9-trimethyliertem Chromatin, dass diese Interaktion lediglich von schwacher Natur ist (Eskeland et al. 2006). Zudem ist die Dissoziationskonstante von H3K9me3-Peptiden und HP1 sehr hoch (Jacobs et al. 2002; Nielsen et al. 2002). Dies führte zu der Hypothese, dass zusätzliche Faktoren die HP1-Bindung *in vivo* unterstützen müssten. Mit den HMGA-Proteinen wurden in dieser Arbeit solche Faktoren identifiziert. Die HMGA:HP1-Interaktion ist in Abb. 5-1 auf der folgenden Seite in einem Modell zusammengefasst.



**Abb. 5-1: Modell der kooperativen Bindung von HMGA1 und HP1 am Chromatin**

HP1 dimerisiert über seine globuläre Chromoshadodomäne (CSD, grüne Kugeln) und bindet an das methyliertes Lysin 9 des Histon H3 (H3K9me, Pfeile) über die globuläre Chromodomäne (CD, rote Kugeln). Diese Interaktion von HP1 mit dem Chromatin, dargestellt in Form zweier Nukleosomen (grau), wird durch die Kooperation mit HMGA-Proteinen verstärkt. Dabei kommt es zu einer Protein-Protein-Interaktion zwischen dem sauren C-Terminus der HMGA-Proteine (dunkelblauer Zylinder) und der Chromodomäne des HP1 (rote Kugeln). Dies resultiert in einer längeren Verweildauer der HP1-Proteine an H3K9me und in AT-reichen DNA-Regionen und trägt zur Stabilisierung von Heterochromatin bei. Mögliche Adapterproteine, wie zum Beispiel Orc1 und/oder Orc6, oder bisher noch nicht identifizierte Proteine, könnten zu diesen Interaktionen beitragen (gelbe Kugel mit Fragezeichen).

Da HMGA-Proteine differentiell exprimiert werden, sollte sich die Verweildauer von HP1-Proteinen und damit die Stabilität des Chromatins während der Differenzierung entsprechend der HMGA-Menge ändern. In Stammzellen, die kein oder wenig HMGA exprimieren (Hock et al. 2006), ist die HP1-Dynamik und Plastizität des Chromatins tatsächlich sehr hoch (Meshorer et al. 2006). In determinierten Zellen – wie C2C12-Zellen – hingegen, ist die HP1-Dynamik reduziert (Meshorer et al. 2006 und diese Arbeit) und steigt erst wieder an, wenn die Expression der HMGA-Proteine während der Differenzierung nach unten reguliert wird. Koexpressionsstudien von HP1 und HMGA, sowie erhöhte HP1-Dynamik nach HMGA1-knock-down bestätigten, dass die HP1-Bindung am Chromatin von Anwesenheit und Proteinmenge des HMGA abhängt. Damit korrelieren HMGA-Präsenz, HP1-Bindung und Chromatinplastizität.

Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass HP1 durch die Interaktion mit HMGA die Stabilisierung eines bestimmten Chromatinzustandes vermittelt. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass D1 – ein HMGA-ähnliches Protein in *Drosophila* mit 10 AT-Hooks (Monod et al. 2002) – zusammen mit HP1 und Topoisomerase II zur Heterochromatinbildung an Satelliten-DNA beiträgt (Blattes et al. 2006). Zusätzlich ist der Knock-down von D1 lethal und unterdrückt die position effect variegation (PEV) des *white*-Gens (Aulner et al. 2002).

Die hier gezeigten Daten sprechen dafür, dass das Säuger-HMGA durch seine Interaktion mit HP1 zur Heterochromatisierung und Stabilität des Genoms beiträgt und in Säugerzellen die entwicklungspezifische Expression von Genen beeinflussen könnte.

Interessanterweise weichen die aberranten Expressionsmuster einzelner Gene in C2A1a-Zellen drei Tage nach Induktion der Myogenese besonders deutlich von der Normalentwicklung ab. Dies zeigt, dass zu speziell diesem Zeitpunkt eine abweichende HMGA-Proteinmenge kritisch zu sein scheint.

Die Umorganisation und Stabilität des Chromatins um den dritten Tag der Differenzierung korreliert nicht nur mit der Herunterregulierung von HMGA1, sondern steht in direktem Zusammenhang mit der An- oder Abwesenheit von HMGA-Proteinen. Dies zeigten folgende Ergebnisse:

1. An Tag 3 der Differenzierung ist die HP1-Verweildauer am Chromatin abhängig von der HMGA-Präsenz. Da HMGA zu diesem Zeitpunkt in C2C12-Zellen nach unten reguliert wird, ist die HP1-Dynamik signifikant höher als in Myoblasten. Eine Koexpression von HMGA und HP1 durch Transfektion von C2C12-Zellen reduzierte die HP1-Dynamik zu diesem Zeitpunkt und verhindert die Dissoziation der Chromozentren.
2. Wie bereits diskutiert, interagieren HMGA-Proteine abhängig von ihrer DNA-Bindung über den sauren C-Terminus mit der Chromodomäne (CD) der HP1-Proteine. Dementsprechend führte die Koexpression von mutierten HMGA-Proteinen mit reduzierter DNA-Bindung beziehungsweise einer Deletion des sauren C-Terminus zu einer reduzierten HP1-Bindung am Chromatin.
3. Ein HMGA1-knock-down resultiert in einer erhöhten HP1-Dynamik in C2C12-Myoblasten und führt zur Dissoziation der Chromozentren. Letzteres zeigt, dass die Chromatintopologie maßgeblich von HMGA-Proteinen bestimmt wird.

Zusammengenommen zeigten die Ergebnisse, dass HMGA-Proteine in Kooperation mit HP1 maßgeblich an Heterochromatininstabilität und der topologischen Organisation des Chromatins während der zellulären Differenzierung beteiligt sind.

### **5.6 HMGA-Proteine beeinflussen die differenzierungsabhängige Organisation des Chromatins**

Während der terminalen Differenzierung von Zellen erfolgt eine globale topologische Umorganisation des Chromatins (Grigoryev et al. 2006). In differenzierten Myotuben ist diese veränderte Chromatintopologie durch fusionierte Chromozentren zu erkennen (Brero et al. 2005). Zahlreiche in dieser Arbeit präsentierte Ergebnisse zeigen, dass neben der Fusion der Chromozentren während der terminalen Differenzierung maßgebliche Modulationen des Chromatins innerhalb eines kritischen Zeitfensters 2-3 Tage nach Induktion der Myogenese stattfinden.

Interessanterweise korreliert dieser Zeitraum mit der Herunterregulierung der HMGA-Expression und wird durch anhaltende HMGA-Präsenz gestört. Vor der Chromozentren-Fusion kommt es in C2C12-Zellen an Tag 3 der Myogenese zur deren kurzzeitiger Dissoziation und einer deutlich erhöhten Dynamik des Heterochromatin Proteins HP1. Diese korreliert mit einer erhöhten Plastizität des Chromatins embryonaler Stammzellen (Meshorer et al. 2006). Experimente unter Verwendung von Fotobleichtechniken (FRAP) in C2A1a-Zellen haben gezeigt, dass auch die Dynamik von HMGA1a drei Tage nach Induktion der Myogenese ebenfalls signifikant erhöht ist.

Zudem zeigte sich in C2H3-Zellen etwa 2 Tage nach Differenzierungsbeginn (circa im dritten Zellzyklus), dass Histon H3 innerhalb eines Zellzyklus, Replikations-unabhängig im perizentrischen Heterochromatin angereichert wird. Zu diesem Zeitpunkt ist die Expression des Histonchaperons „anti-silencing-factor-1“ (Asf-1) deutlich erhöht. Asf-1 ist bei einem Replikations-unabhängigen Austausch von H3 im Nukleosom beteiligt (Loyola et al. 2004). Dies alles sind Hinweise auf eine erhöhte Plastizität und einen Umbau des Chromatins während dieses Zeitfensters 2-3 Tage nach Induktion der Myogenese. Parallel dazu sind in C2C12-Zellen Veränderungen im Expressionsmuster einzelner Gene oder bei Histonmodifikationen auffällig. Letzteres spricht für eine globale Veränderung im epigenetischen Zustand des Chromatins zu diesem Zeitpunkt.

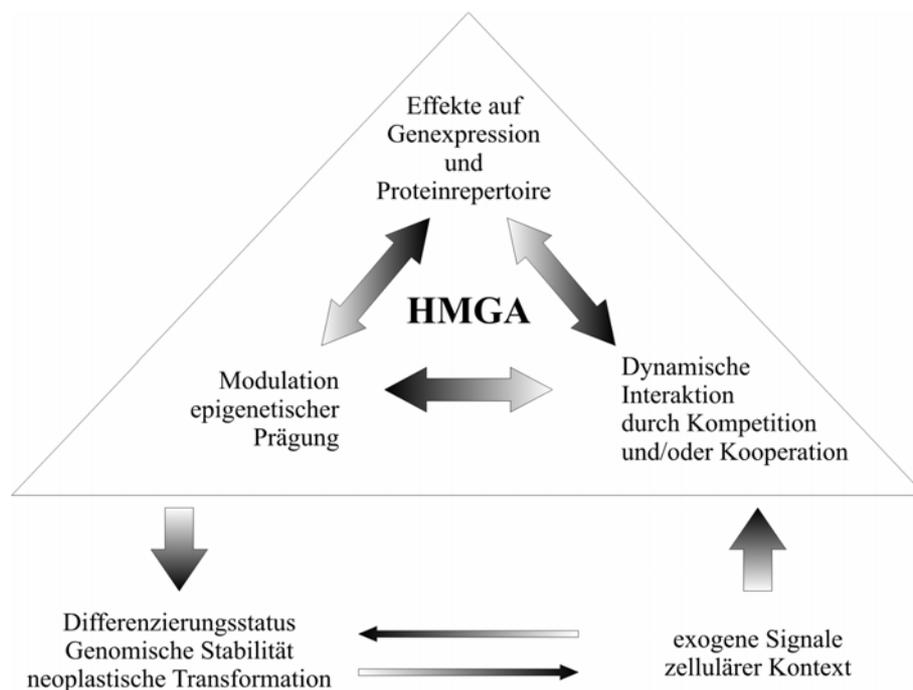
HMGA-Proteine scheinen wiederum einige der Histonmodifikationen zu beeinflussen. Einige davon waren in C2A1a-Zellen im globalen Level verändert. Darunter befanden sich sowohl Modifikationen, die charakteristisch für aktives Chromatin sind (H3K4me2, H3K4me3), als auch charakteristische Modifikationen für inaktive Chromatin (H3K9me2, H3K27me3). Dies zeigt, dass HMGA-Proteine die Ausprägung verschiedener Histonmodifikationen unter bestimmten Bedingungen, wie der zellulären Differenzierung, spezifisch beeinflussen können. Andere dagegen blieben von der HMGA1a-Überexpression unbeeinflusst (H3K9Ac, H3K79me3, H3K9me3, H4K20me3). Hervorzuheben sind die Veränderungen in der Trimethylierung von H3K27. Diese Modifikation wird mit der Reprimierung zahlreicher entwicklungsrelevanter homeotischer Gene oder Gene deren Expression über DNA-Methylierung reguliert werden in Verbindung gebracht. In diesen Fall könnte die präferenzielle Bindung von HMGA an methylierte DNA von entscheidender Bedeutung sein.

### **5.7 Fazit**

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass HMGA-Proteine über ein Zusammenspiel mit HP1 und möglicherweise einem oder mehreren noch nicht identifizierten Faktoren, die Topologie des Chromatins mitbestimmt. Dies wird über die Stabilisierung und/oder Destabilisierung des perizentrischen Heterochromatins vermittelt. Des Weiteren ist die von äußeren Signalen, wie TGF- $\beta$ , regulierte Verminderung der HMGA1-Expression zwingend notwendig, um einen Wechsel im epigenetischen Status des Chromatins und den Eintritt in die Myogenese zu initiieren.

Der Einfluss von HMGA auf den Chromatinstatus spiegelt sich letztendlich im Expressionsmuster spezifischer Gene wider, die für eine korrekte Differenzierung benötigt werden.

Die hier gezeigten Daten belegen, dass HMGA-Proteine die Struktur des Chromatins auf verschiedenen Ebenen beeinflussen. Dazu gehören die Expression von Strukturkomponenten des Chromatins wie HP1, Histon H1 und MeCP2, die Kooperation mit Histon H1 (Bonney et al. 1999; Funayama et al. 2006; Hill et al. 1999) oder MeCP2 und die Kooperation mit Proteinen wie HP1 oder Komponenten des ORC-Komplexes (Thomae et al, *eingereicht*). Dieses Zusammenspiel ist in Abb. 5-2 schematisch dargestellt.



**Abb. 5-2: HMGA-Aktivitätsdreieck**

Über die Bindung an das Chromatin nehmen HMGA-Proteine Einfluss auf die Expression bestimmter Gene, zum Beispiel durch ihre Beteiligung an Enhanceosomen-Multiprotein-Komplexen und verändern somit das Proteinrepertoire der Zelle. Dies geschieht zum einen über die dynamische Interaktion (Kooperation und/oder Konkurrenz) mit anderen nukleären Proteinen – wie im Falle von HP1 – und durch die Modulation epigenetischer Prägungen, wie beispielsweise Histon-Modifikationen. All diese durch HMGA hervorgerufenen Veränderungen beeinflussen sich gegenseitig und führen zu einem definierten, von HMGA abhängigen Status der Zelle, der sich wiederum auf die Differenzierung und die Stabilität des Genoms auswirkt und unter anderem auch auf die neoplastische Transformation von Zellen Einfluss nimmt. Dies nimmt Einfluss auf den zellulären Kontext und exogene Signale, die ihrerseits wieder Einfluss auf den Zellstatus, HMGA und die durch HMGA gesteuerten Prozesse nehmen.

Letztlich zeigt diese Arbeit, dass HMGA-Proteine essentielle Modulatoren des Chromatins sind, deren Präsenz über Stabilität und Plastizität des Chromatins während Differenzierungsprozessen entscheidet und so die Entwicklungsfähigkeit von Zellen maßgeblich beeinflusst.

## **5.8 Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit über den Einfluss von HMGA-Proteinen auf die Differenzierung, epigenetische Regulation und Genexpression, sowie die Zusammensetzung und Plastizität des Heterochromatins bilden die Grundlagen für weitere Fragestellungen und Experimente. Zum Beispiel müsste aufgrund der festgestellten Interaktion von HMGA mit Orc-Proteinen der Einfluss der HMGA-Proteine auf die Replikationsmaschinerie weiterführend untersucht werden. Ein weitere Frage, die es zu beantworten gibt, ist der Grund für den Rückgang der Zellzahl in C2A1a-Zellen nach Induktion der Myogenese und ob es sich dabei um Apoptose handelt. Damit einhergehend wäre interessant die Rolle von HMGA in der Seneszenz beziehungsweise der Apoptose näher zu bestimmen.

Neuere Daten zeigten auch eine differenzierungsabhängige Expression des Replikations-unabhängig agierenden Histonchaperon „anti-silencing function-1“ (Asf-1) und eine Störung dieser Expression in C2A1a-Zellen. In Verbindung mit dem Replikations-unabhängigen Einbau von Histon H3 während der Myogenese, wäre es hierbei interessant, die Rolle dieses Histonchaperons und dem damit verbundenen Umbau des Chromatins während Differenzierungsprozessen zu analysieren. Es sind auch zusätzliche Studien erforderlich, um den Einfluss von HMGA-Proteinen auf die Zusammensetzung und Dynamik des Chromatins, sowie dessen Modulation in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen und im Verlauf von Krankheiten weiterführend zu untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Zusammenfassung

HMG-Proteine sind nach den Histonen die zweithäufigste Superfamilie nukleärer Proteine. Sie binden an DNA und Nukleosomen und induzieren strukturelle Veränderungen im Chromatin. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Dynamik des Chromatins und beeinflussen dadurch DNA-abhängige Prozesse, wie Transkription und Replikation. Proteine der HMGA-Familie sind charakterisiert durch konservierte DNA-Bindungsmotive, den AT-Hooks, welche eine Bindung an AT-reiche DNA-Sequenzen vermitteln und durch einen sauren C-Terminus. HMGA-Proteine sind verstärkt im Heterochromatin konzentriert und stehen in Verbindung mit der Expressionsregulation spezifischer Gene aufgrund der Stabilisierung von Nukleoproteinkomplexen, so genannten Enhanceosomen. HMGA-Proteine spielen des Weiteren eine entscheidende Rolle in verschiedenen Entwicklungsprozessen und bei der Tumorprogression .

Um den Einfluss von HMGA1 auf die zelluläre Differenzierung und die Chromatinmodulation zu untersuchen, wurden C2C12 Maus-Myoblastenzellen verwendet. Die Induktion der Myogenese in diesen Zellen geht mit der Herunterregulierung von HMGA1 einher. Durch die Etablierung einer C2C12-Zelllinie, welche ein EGFP-markiertes HMGA1a stabil exprimierte, konnte gezeigt werden, dass eine anhaltende HMGA1-Expression spezifisch die Myogeneseprozess inhibierte, während die Osteogenese davon unbeeinflusst zu bleiben schien. Dieser hemmende Effekt kann durch die HMGA1-abhängige Fehlexpression verschiedener Gene, welche für eine einwandfreie Muskeldifferenzierung nötig sind und in die Zellzyklusregulation eingreifen, erklärt werden.

Unter der Verwendung von RNAi konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung von HMGA1-Proteinen für eine korrekte Genexpression und den Muskeldifferenzierungsprozess notwendig ist. Während der terminalen Differenzierung wird die Umorganisation des Chromatins durch die Fusion der Chromozentren offensichtlich. Fotobleichtechniken, wie „fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP) zeigten, dass HMGA1-Proteine mit dem Methyl-CpG-bindenden Protein 2 (MeCP2), welches eine wichtige Rolle in der Chromozentrenfusion spielt, um DNA-Bindungsstellen konkurriert und dieses vom Chromatin verdrängt. Diese dynamische Konkurrenz zwischen einem anhaltend exprimierten HMGA1 und MeCP2 trägt somit zur Inhibition der differenzierungsabhängigen Modulation des Chromatins während der späten Myogenese bei.

Die Untersuchungen in C2A1a-Zellen lieferten weitere Hinweise dafür, dass der wesentlichste Umbau des Chromatins in einem Zeitfenster um den dritten Tag nach Induktion der Myogenese stattfindet, an welchem HMGA1 natürlicherweise nahezu vollständig herunterreguliert sind. In diesem Zeitraum kommt es zur Dissoziation der Chromozentren, zu veränderten Expressionsmustern in bestimmten Genen, zu Modulationen in Histonmodifikationen (H3K4me2, H3K4me3, H3K27me3), zur Replikations-unabhängigen Akkumulation von Histon H3 in den Chromozentren über ungefähr einen Zellzyklus hinweg und zu eine signifikanten Erhöhung der HP1-Dynamik.

Durch den Einsatz von Bimolekularer Fluoreszenzkomplementierung (BiFC), die es erlaubt Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* zu visualisieren, konnte gezeigt werden, dass der saure C-Terminus des HMGA mit der Chromodomäne (CD) des HP1 interagiert. Zusätzlich ist für diese Interaktion die korrekte DNA-Bindung des HMGA nötig. FRAP-Messungen mit HP1-EGFP-Fusionsproteinen in Zellen die wildtypisches oder ein mutiertes HMGA koexprimierten, bestätigten diese Daten und wiesen darauf hin, dass die HP1-Verweildauer im Heterochromatin maßgeblich von der Gegenwart eines funktionellen HMGA1 abhängig ist. Des Weiteren zeigten C2C12-Myoblasten, die HMGA1 natürlicherweise exprimieren, eine hohe HP1-Verweildauer, die nach HMGA1-knock down drastisch verringert ist. Umgekehrt ist die HP1-Verweildauer nach einer Herunterregulierung von HMGA1 an Tag 3 der Myogenese gering und steigt durch die Koexpression von HMGA1 auf das in Myoblasten gemessene Niveau an.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass die differenzielle Expression von HMGA1 und ihre Fähigkeit mit HP1 zu interagieren, sowie ihre Konkurrenz mit MeCP2 um DNA-Bindungsstellen einen entscheidende Rolle in der Regulation der Aufrechterhaltung und Plastizität des Heterochromatins während der Differenzierung spielen. Daher ist eine zeitlich festgelegte Herunterregulierung von HMGA1 notwendig, um die Modulation des Chromatins und dadurch den Differenzierungsprozess zu ermöglichen

## 6.2 Summary

HMG proteins are an abundant superfamily of nuclear proteins that bind to DNA and nucleosomes and induce structural changes in the chromatin fiber. These proteins play an important role in chromatin dynamics and thereby impact DNA-related processes like transcription and replication. Proteins of the HMGA family are characterized by conserved DNA-binding domains, the AT hooks, which mediate binding to AT-rich DNA, and an acidic c-terminal domain. HMGA proteins concentrate in heterochromatin and are linked to specific gene regulation by stabilizing nucleoprotein complexes called enhanceosomes. Furthermore, HMGA proteins play an important role in several developmental processes and in tumor progression.

C2C12 mouse myoblast cells were used to explore the impact of HMGA1 proteins on differentiation and chromatin modulation. After induction of myogenesis HMGA1 proteins revealed a downregulation. By establishing a C2C12 cell line stably expressing an EGFP tagged HMGA1a (C2A1a) it could be shown that sustained HMGA expression inhibited specifically the myogenic process while osteogenesis seemed to be unaffected. This inhibition can be explained by an HMGA1-dependent misexpression of several genes that are required for proper myogenic differentiation and genes involved in cell cycle regulation.

Using RNAi techniques it could be demonstrated that downregulation of HMGA1 proteins is required to restore proper gene expression and to enable the myogenic program. During terminal differentiation chromatin remodeling is apparent by fusion of chromocenters. Photobleaching experiments like “fluorescence recovery after photobleaching” (FRAP) revealed that HMGA1 proteins compete with the methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2), which plays an important role during the fusion of chromocenters, for DNA-binding sites. Thereby MeCP2 is displaced from chromatin. This dynamic competition between constitutively expressed HMGA1 and MeCP2 thereby leads to an inhibition of the differentiation dependent modulation of the chromatin during late myogenesis.

Studies in C2A1a cells revealed a set of evidences indicating that further major chromatin remodeling occurs around day three after induction when HMGA1 proteins are downregulated. At this time-frame chromocenters dissociate, expression patterns of genes are switching, histone modifications are modulated (H3K4me2, H3K4me3, H3K27me3), histone H3 accumulates in a replication independent mode in chromocenters for approximately one cell cycle, and dynamics of HP1 proteins are significantly increased.

Applying bimolecular fluorescence complementation (BiFC) that allows visualization of protein-protein interactions in living cells I could show that the acidic domain of HMGA interacts with the chromodomain (CD) of HP1. In Addition, the proper DNA-binding of HMGA1 is necessary to accomplish a functional interaction between HP1 and HMGA.

FRAP measurements of HP1-EGFP in cells coexpressing wild type or mutated HMGAs corroborated these findings and indicated that the HP1 residence time in heterochromatin strongly depends on the presence of functional HMGA proteins.

Furthermore, HP1 residence time is high in C2C12 myoblasts which express HMGA1 but low after HMGA1 knock down. Vice versa, it is low in C2C12 cells at day 3 of differentiation when HMGA proteins are downregulated, but high when HMGA1 proteins are coexpressed.

Together, these data indicate that the differential expression of HMGAs and their capacity to interact with HP1 proteins and compete with MeCP2 plays an important role in the regulation of heterochromatin maintenance and plasticity during differentiation. Therefore, the downregulation of HMGA1 proteins is required to allow chromatin remodeling and to enable the differentiation program.

## 7 Literaturverzeichnis

- Al-Khalili, L., K. Bouzakri, et al. (2006). "Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle." *Mol Endocrinol* **20**(12): 3364-75.
- Anand, A. and K. Chada (2000). "In vivo modulation of Hmgic reduces obesity." *Nat Genet* **24**(4): 377-80.
- Aulner, N., C. Monod, et al. (2002). "The AT-hook protein D1 is essential for *Drosophila melanogaster* development and is implicated in position-effect variegation." *Mol Cell Biol* **22**(4): 1218-32.
- Badugu, R., M. M. Shareef, et al. (2003). "Novel *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex-associated protein (HOAP) repeat motif in HP1/HOAP interactions and chromocenter associations." *J Biol Chem* **278**(36): 34491-8.
- Bains, W., P. Ponte, et al. (1984). "Cardiac actin is the major actin gene product in skeletal muscle cell differentiation in vitro." *Mol Cell Biol* **4**(8): 1449-53.
- Baldassarre, G., M. Fedele, et al. (2001). "Onset of natural killer cell lymphomas in transgenic mice carrying a truncated HMGI-C gene by the chronic stimulation of the IL-2 and IL-15 pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(14): 7970-5.
- Banks, G. C., Y. Li, et al. (2000). "Differential in vivo modifications of the HMGI(Y) nonhistone chromatin proteins modulate nucleosome and DNA interactions." *Biochemistry* **39**(28): 8333-46.
- Battista, S., F. Pentimalli, et al. (2003). "Loss of Hmgal gene function affects embryonic stem cell lympho-hematopoietic differentiation." *Faseb J* **17**(11): 1496-8.
- Bianchi, M. E. and A. Agresti (2005). "HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation." *Curr Opin Genet Dev*.
- Bilan, P. J., T. Ramlal, et al. (1991). "IGF-I mediated recruitment of glucose transporters from intracellular membranes to plasma membranes in L6 muscle cells." *Adv Exp Med Biol* **293**: 273-88.
- Blattes, R., C. Monod, et al. (2006). "Displacement of D1, HP1 and topoisomerase II from satellite heterochromatin by a specific polyamide." *Embo J* **25**(11): 2397-408.
- Blau, H. M., G. K. Pavlath, et al. (1985). "Plasticity of the differentiated state." *Science* **230**(4727): 758-66.
- Bonnefoy, E., M. T. Bandu, et al. (1999). "Specific binding of high-mobility-group I (HMGI) protein and histone H1 to the upstream AT-rich region of the murine beta interferon promoter: HMGI protein acts as a potential antirepressor of the promoter." *Mol Cell Biol* **19**(4): 2803-16.
- Brasher, S. V., B. O. Smith, et al. (2000). "The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer." *Embo J* **19**(7): 1587-97.
- Brero, A., H. P. Easwaran, et al. (2005). "Methyl CpG-binding proteins induce large-scale chromatin reorganization during terminal differentiation." *J Cell Biol* **169**(5): 733-43.
- Bustin, M., D. A. Lehn, et al. (1990). "Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes." *Biochim Biophys Acta* **1049**(3): 231-43.
- Caretti, G., M. Di Padova, et al. (2004). "The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation." *Genes Dev* **18**(21): 2627-38.
- Caron, L., F. Bost, et al. (2005). "A new role for the oncogenic high-mobility group A2 transcription factor in myogenesis of embryonic stem cells." *Oncogene* **24**(41): 6281-91.
- Catez, F., J. H. Lim, et al. (2003). "HMGN dynamics and chromatin function." *Biochem Cell Biol* **81**(3): 113-22.
- Catez, F., T. Ueda, et al. (2006). "Determinants of histone H1 mobility and chromatin binding in living cells." *Nat Struct Mol Biol* **13**(4): 305-10.
- Catez, F., H. Yang, et al. (2004). "Network of Dynamic Interactions between Histone H1 and High-Mobility-Group Proteins in Chromatin." *Mol Cell Biol* **24**(10): 4321-4328.
- Cheutin, T., A. J. McNairn, et al. (2003). "Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding." *Science* **299**(5607): 721-5.
- Chieffi, P., S. Battista, et al. (2002). "HMGA1 and HMGA2 protein expression in mouse spermatogenesis." *Oncogene* **21**(22): 3644-50.
- Clayton, A. L., C. A. Hazzalin, et al. (2006). "Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective." *Mol Cell* **23**(3): 289-96.
- Cirillo, L. and K. Zaret (2004). "Developmental biology. A linker histone restricts muscle development." *Science* **304**(5677): 1607-9.
- Cmarik, J. L., Y. Li, et al. (1998). "Tumor promoter induces high mobility group HMG-Y protein expression in transformation-sensitive but not -resistant cells." *Oncogene* **16**(26): 3387-96.
- Czermin, B., R. Melfi, et al. (2002). "Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites." *Cell* **111**(2): 185-96.
- Delaval, K. and R. Feil (2004). "Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting." *Curr Opin Genet Dev* **14**(2): 188-95.
- Disney, J. E., K. R. Johnson, et al. (1989). "High-mobility group protein HMG-I localizes to G/Q- and C-bands of human and mouse chromosomes." *J Cell Biol* **109**(5): 1975-82.
- Dolde, C. E., M. Mukherjee, et al. (2002). "HMG-I/Y in human breast cancer cell lines." *Breast Cancer Res Treat* **71**(3): 181-91.
- Drewell, R. A., C. J. Goddard, et al. (2002). "Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2." *Nucleic Acids Res* **30**(5): 1139-44.
- Easwaran, H. P., H. Leonhardt, et al. (2005). "Cell cycle markers for live cell analyses." *Cell Cycle* **4**(3): 453-5.

- Ebisawa, T., K. Tada, et al. (1999). "Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation." *J Cell Sci* **112** (Pt 20): 3519-27.
- Edberg, D. D., J. E. Bruce, et al. (2004). "In vivo posttranslational modifications of the high mobility group a1a proteins in breast cancer cells of differing metastatic potential." *Biochemistry* **43**(36): 11500-15.
- Eissenberg, J. C. and T. Hartnett (1993). "A heat shock-activated cDNA rescues the recessive lethality of mutations in the heterochromatin-associated protein HP1 of *Drosophila melanogaster*." *Mol Gen Genet* **240**(3): 333-8.
- Eissenberg, J. C., T. C. James, et al. (1990). "Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(24): 9923-7.
- Eskeland, R., A. Eberharter, et al. (2006). "HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors." *Mol Cell Biol*.
- Esteller, M. (2007). "Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes." *Br J Cancer* **96** Suppl: R26-30.
- Evans, A., T. W. Lennard, et al. (2004). "High-mobility group protein 1(Y): Metastasis-associated or metastasis-inducing?" *J Surg Oncol* **88**(2): 86-99.
- Fan, Y., T. Nikitina, et al. (2005). "Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation." *Cell* **123**(7): 1199-212.
- Fedele, M., S. Battista, et al. (2001). "Role of the high mobility group A proteins in human lipomas." *Carcinogenesis* **22**(10): 1583-91.
- Fedele, M., V. Fidanza, et al. (2006). "Haploinsufficiency of the Hmg1 gene causes cardiac hypertrophy and myelolymphoproliferative disorders in mice." *Cancer Res* **66**(5): 2536-43.
- Fedele, M., G. M. Pierantoni, et al. (2006). "E2F1 activation is responsible for pituitary adenomas induced by HMGA2 gene overexpression." *Cell Div* **1**: 17.
- Fedele, M., R. Visone, et al. (2006). "HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity." *Cancer Cell* **9**(6): 459-71.
- Festenstein, R., S. Sharghi-Namini, et al. (1999). "Heterochromatin protein 1 modifies mammalian PEV in a dose- and chromosomal-context-dependent manner." *Nat Genet* **23**(4): 457-61.
- Foster, E. R. and J. A. Downs (2005). "Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair." *Febs J* **272**(13): 3231-40.
- Foti, D., E. Chiefari, et al. (2005). "Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice." *Nat Med* **11**(7): 765-73.
- Francis, N. J., A. J. Saurin, et al. (2001). "Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex." *Mol Cell* **8**(3): 545-56.
- Frasca, F., A. Rustighi, et al. (2006). "HMGA1 inhibits the function of p53 family members in thyroid cancer cells." *Cancer Res* **66**(6): 2980-9.
- Friedmann, M., L. T. Holth, et al. (1993). "Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene." *Nucleic Acids Res* **21**(18): 4259-67.
- Fuks, F., P. J. Hurd, et al. (2003). "The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation." *J Biol Chem* **278**(6): 4035-40.
- Funayama, R., M. Saito, et al. (2006). "Loss of linker histone H1 in cellular senescence." *J Cell Biol*.
- Furusawa, T., J. H. Lim, et al. (2006). "Down-regulation of nucleosomal binding protein HMGN1 expression during embryogenesis modulates Sox9 expression in chondrocytes." *Mol Cell Biol* **26**(2): 592-604.
- Georgel, P. T., R. A. Horowitz-Scherer, et al. (2003). "Chromatin compaction by human MeCP2. Assembly of novel secondary chromatin structures in the absence of DNA methylation." *J Biol Chem* **278**(34): 32181-8.
- Giancotti, V., B. Pani, et al. (1987). "Elevated levels of a specific class of nuclear phosphoproteins in cells transformed with v-ras and v-mos oncogenes and by cotransfection with c-myc and polyoma middle T genes." *Embo J* **6**(7): 1981-7.
- Giannini, G., C. J. Kim, et al. (2000). "Expression of the HMGI(Y) gene products in human neuroblastic tumours correlates with differentiation status." *Br J Cancer* **83**(11): 1503-9.
- Grigoryev, S. A., Y. A. Bulynko, et al. (2006). "The end adjusts the means: Heterochromatin remodelling during terminal cell differentiation." *Chromosome Res* **14**(1): 53-69.
- Grewal, S. I. and D. Moazed (2003). "Heterochromatin and epigenetic control of gene expression." *Science* **301**(5634): 798-802.
- Grinberg, A. V., C. D. Hu, et al. (2004). "Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells." *Mol Cell Biol* **24**(10): 4294-308.
- Grunstein, M. (1992). "Histones as regulators of genes." *Sci Am* **267**(4): 68-74B.
- Hake, S. B., A. Xiao, et al. (2004). "Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer." *Br J Cancer* **90**(4): 761-9.
- Hale, T. K., A. Contreras, et al. (2006). "Phosphorylation of the Linker Histone H1 by CDK Regulates Its Binding to HP1alpha." *Mol Cell* **22**(5): 693-9.
- Harrer, M., H. Luhrs, et al. (2004). "Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin." *J Cell Sci* **117**(Pt 16): 3459-71.
- Hediger, F. and S. M. Gasser (2006). "Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover!" *Curr Opin Genet Dev* **16**(2): 143-50.
- Hill, D. A., M. L. Pedulla, et al. (1999). "Directional binding of HMG-I(Y) on four-way junction DNA and the molecular basis for competitive binding with HMG-1 and histone H1." *Nucleic Acids Res* **27**(10): 2135-44.
- Hiragami, K. and R. Festenstein (2005). "Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence." *Cell Mol Life Sci* **62**(23): 2711-26.
- Hock, R., T. Furusawa, et al. (2006). "HMG chromosomal proteins in development and disease." *Trends Cell Biol*.

- Hock, R., F. Witte, et al. (2006). "Expression of HMGA2 variants during oogenesis and early embryogenesis of *Xenopus laevis*." *Eur J Cell Biol* **85**(6): 519-28.
- Holmquist, G. P. and T. Ashley (2006). "Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution." *Cytogenet Genome Res* **114**(2): 96-125.
- Holth, L. T., A. E. Thorlacius, et al. (1997). "Effects of epidermal growth factor and estrogen on the regulation of the HMG-I/Y gene in human mammary epithelial cell lines." *DNA Cell Biol* **16**(11): 1299-309.
- Hu, C. D., Y. Chinenov, et al. (2002). "Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation." *Mol Cell* **9**(4): 789-98.
- Jacobs, S. A. and S. Khorasanizadeh (2002). "Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail." *Science* **295**(5562): 2080-3.
- James, T. C., J. C. Eissenberg, et al. (1989). "Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*." *Eur J Cell Biol* **50**(1): 170-80.
- Johansen, K. M. and J. Johansen (2006). "Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation." *Chromosome Res* **14**(4): 393-404.
- John, S., R. B. Reeves, et al. (1995). "Regulation of cell-type-specific interleukin-2 receptor alpha-chain gene expression: potential role of physical interactions between Elf-1, HMG-I(Y), and NF-kappa B family proteins." *Mol Cell Biol* **15**(3): 1786-96.
- Johnson, K. R., D. A. Lehn, et al. (1988). "Complete murine cDNA sequence, genomic structure, and tissue expression of the high mobility group protein HMG-I(Y)." *J Biol Chem* **263**(34): 18338-42.
- Johnson, K. R., D. A. Lehn, et al. (1989). "Alternative processing of mRNAs encoding mammalian chromosomal high-mobility-group proteins HMG-I and HMG-Y." *Mol Cell Biol* **9**(5): 2114-23.
- Jove, M., A. Planavila, et al. (2005). "Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor kappaB activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells." *Endocrinology* **146**(7): 3087-95.
- Jung, B. P., D. G. Jugloff, et al. (2003). "The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells." *J Neurobiol* **55**(1): 86-96.
- Kalitsis, P., K. J. Fowler, et al. (2003). "Partially functional Cenpa-GFP fusion protein causes increased chromosome missegregation and apoptosis during mouse embryogenesis." *Chromosome Res* **11**(4): 345-57.
- Kamakaka, R. T. and S. Biggins (2005). "Histone variants: deviants?" *Genes Dev* **19**(3): 295-310.
- Katagiri, T., A. Yamaguchi, et al. (1994). "Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage." *J Cell Biol* **127**(6 Pt 1): 1755-66.
- Kerppola, T. K. (2006). "Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(6): 449-56.
- Kimura, H. (2005). "Histone dynamics in living cells revealed by photobleaching." *DNA Repair (Amst)* **4**(8): 939-50.
- Kimura, H. and P. R. Cook (2001). "Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B." *J Cell Biol* **153**(7): 1341-53.
- Klose, R. J., S. A. Sarraf, et al. (2005). "DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG." *Mol Cell* **19**(5): 667-78.
- Korner, U., M. Bustin, et al. (2003). "Developmental role of HMGN proteins in *Xenopus laevis*." *Mech Dev* **120**(10): 1177-92.
- Lachner, M., D. O'Carroll, et al. (2001). "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." *Nature* **410**(6824): 116-20.
- Laird, P. W. (2005). "Cancer epigenetics." *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**: R65-76.
- Lanahan, A., J. B. Williams, et al. (1992). "Growth factor-induced delayed early response genes." *Mol Cell Biol* **12**(9): 3919-29.
- Lee, H., R. Habas, et al. (2004). "MSX1 cooperates with histone H1b for inhibition of transcription and myogenesis." *Science* **304**(5677): 1675-8.
- Lever, M. A., J. P. Th'ng, et al. (2000). "Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells." *Nature* **408**(6814): 873-6.
- Lewis, E. B. (1978). "A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*." *Nature* **276**(5688): 565-70.
- Li, B., K. Y. Pilcher, et al. (1997). "Rapid preparation and identification of insert-containing recombinant plasmid DNA." *Biotechniques* **23**(4): 603-6, 608.
- Loyola, A. and G. Almouzni (2004). "Bromodomains in living cells participate in deciphering the histone code." *Trends Cell Biol* **14**(6): 279-81.
- Loyola, A. and G. Almouzni (2004). "Histone chaperones, a supporting role in the limelight." *Biochim Biophys Acta* **1677**(1-3): 3-11.
- Lu, B. Y., P. C. Emtage, et al. (2000). "Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*." *Genetics* **155**(2): 699-708.
- Luger, K. (2006). "Dynamic nucleosomes." *Chromosome Res* **14**(1): 5-16.
- Maison, C. and G. Almouzni (2004). "HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 296-304.
- Manabe, T., T. Katayama, et al. (2003). "Induced HMGA1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease." *Cell Death Differ* **10**(6): 698-708.
- Maresca, T. J., B. S. Freedman, et al. (2005). "Histone H1 is essential for mitotic chromosome architecture and segregation in *Xenopus laevis* egg extracts." *J Cell Biol* **169**(6): 859-69.
- Martin, C. and Y. Zhang (2005). "The diverse functions of histone lysine methylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 838-49.

- McKinsey, T. A., C. L. Zhang, et al. (2001). "Control of muscle development by dueling HATs and HDACs." *Curr Opin Genet Dev* **11**(5): 497-504.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang, et al. (2002). "Signaling chromatin to make muscle." *Curr Opin Cell Biol* **14**(6): 763-72.
- Megeney, L. A. and M. A. Rudnicki (1995). "Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors." *Biochem Cell Biol* **73**(9-10): 723-32.
- Meshorer, E. and T. Misteli (2006). "Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation." *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Meshorer, E., D. Yellajoshula, et al. (2006). "Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells." *Dev Cell* **10**(1): 105-16.
- Misteli, T., A. Gunjan, et al. (2000). "Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells." *Nature* **408**(6814): 877-81.
- Monod, C., N. Aulner, et al. (2002). "Modification of position-effect variegation by competition for binding to Drosophila satellites." *EMBO Rep* **3**(8): 747-52.
- Muchardt, C., M. Guilleme, et al. (2002). "Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha." *EMBO Rep* **3**(10): 975-81.
- Murzina, N., A. Verreault, et al. (1999). "Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins." *Mol Cell* **4**(4): 529-40.
- Naidu, P. S., D. C. Ludolph, et al. (1995). "Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2707-18.
- Nan, X., R. R. Meehan, et al. (1993). "Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2." *Nucleic Acids Res* **21**(21): 4886-92.
- Narita, M., V. Krizhanovsky, et al. (2006). "A novel role for high-mobility group proteins in cellular senescence and heterochromatin formation." *Cell* **126**(3): 503-14.
- Nielsen, A. L., M. Oulad-Abdelghani, et al. (2001). "Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins." *Mol Cell* **7**(4): 729-39.
- Nielsen, P. R., D. Nietlispach, et al. (2002). "Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9." *Nature* **416**(6876): 103-7.
- Nowak, S. J. and V. G. Corces (2004). "Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation." *Trends Genet* **20**(4): 214-20.
- Ohkawa, Y., C. G. Marfella, et al. (2006). "Skeletal muscle specification by myogenin and Mef2D via the SWI/SNF ATPase Brg1." *Embo J*.
- Olson, E. N., E. Sternberg, et al. (1986). "Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor." *J Cell Biol* **103**(5): 1799-805.
- Pallier, C., P. Scaffidi, et al. (2003). "Association of chromatin proteins high mobility group box (HMGB) 1 and HMGB2 with mitotic chromosomes." *Mol Biol Cell* **14**(8): 3414-26.
- Pantaleon, M. and P. L. Kaye (1996). "IGF-I and insulin regulate glucose transport in mouse blastocysts via IGF-I receptor." *Mol Reprod Dev* **44**(1): 71-6.
- Park, K. Y., E. A. Sellars, et al. (2004). "The H19 differentially methylated region marks the parental origin of a heterologous locus without gametic DNA methylation." *Mol Cell Biol* **24**(9): 3588-95.
- Paroush, Z., I. Keshet, et al. (1990). "Dynamics of demethylation and activation of the alpha-actin gene in myoblasts." *Cell* **63**(6): 1229-37.
- Pash, J. M., J. S. Bhorjee, et al. (1990). "Persistence of chromosomal proteins HMG-14/17 in myotubes following differentiation-dependent reduction of HMG mRNA." *J Biol Chem* **265**(8): 4197-9.
- Perrella, M. A., A. Pellacani, et al. (1999). "High mobility group-I(Y) protein facilitates nuclear factor-kappaB binding and transactivation of the inducible nitric-oxide synthase promoter/enhancer." *J Biol Chem* **274**(13): 9045-52.
- Phair, R. D. and T. Misteli (2000). "High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus." *Nature* **404**(6778): 604-9.
- Phair, R. D., P. Scaffidi, et al. (2004). "Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins." *Mol Cell Biol* **24**(14): 6393-402.
- Plath, K., J. Fang, et al. (2003). "Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation." *Science* **300**(5616): 131-5.
- Postnikov, Y. V., L. Trieschmann, et al. (1995). "Homodimers of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 in nucleosome cores." *J Mol Biol* **252**(4): 423-32.
- Prasanth, S. G., K. V. Prasanth, et al. (2004). "Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance." *Embo J* **23**(13): 2651-63.
- Ram, T. G., R. Reeves, et al. (1993). "Elevated high mobility group-I(Y) gene expression is associated with progressive transformation of mouse mammary epithelial cells." *Cancer Res* **53**(11): 2655-60.
- Ramirez, T., Brocher, J., Stopper, H., Herrera, L.A., Hock, R. (2007, in Revision). "Chromatin remodeling by arsenite"
- Rangasamy, D., L. Berven, et al. (2003). "Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development." *Embo J* **22**(7): 1599-607.
- Reeves, R. (2001). "Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function." *Gene* **277**(1-2): 63-81.
- Reeves, R. and J. E. Adair (2005). "Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair." *DNA Repair (Amst)*.
- Reeves, R. and L. Beckerbauer (2001). "HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure." *Biochim Biophys Acta* **1519**(1-2): 13-29.
- Reeves, R., D. D. Edberg, et al. (2001). "Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells." *Mol Cell Biol* **21**(2): 575-94.
- Reeves, R. and M. S. Nissen (1990). "The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure." *J Biol Chem* **265**(15): 8573-82.

- Reeves, R. and M. S. Nissen (1993). "Interaction of high mobility group-I (Y) nonhistone proteins with nucleosome core particles." *J Biol Chem* **268**(28): 21137-46.
- Robertson, K. D. (2005). "DNA methylation and human disease." *Nat Rev Genet* **6**(8): 597-610.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Sgarra, R., A. Rustighi, et al. (2004). "Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer." *FEBS Lett* **574**(1-3): 1-8.
- Sgarra, R., M. A. Tessari, et al. (2005). "Discovering high mobility group A molecular partners in tumour cells." *Proteomics*.
- Simon, J., A. Chiang, et al. (1992). "Ten different Polycomb group genes are required for spatial control of the *abdA* and *AbdB* homeotic products." *Development* **114**(2): 493-505.
- Simone, C., P. Stiegler, et al. (2002). "Activation of MyoD-dependent transcription by cdk9/cyclin T2." *Oncogene* **21**(26): 4137-48.
- Taguchi, Y., M. Yamamoto, et al. (1998). "Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage." *Proc Assoc Am Physicians* **110**(6): 559-74.
- Tallini, G. and P. Dal Cin (1999). "HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation: a common occurrence in human tumors." *Adv Anat Pathol* **6**(5): 237-46.
- Terada, K., A. Kitayama, et al. (2006). "Nucleosome regulator Xhmg3 is required for cell proliferation of the eye and brain as a downstream target of *Xenopus rax/Rx1*." *Dev Biol* **291**(2): 398-412.
- Thiru, A., D. Nietispach, et al. (2004). "Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin." *Embo J* **23**(3): 489-99.
- Th'ng, J. P., R. Sung, et al. (2005). "H1 family histones in the nucleus. Control of binding and localization by the C-terminal domain." *J Biol Chem* **280**(30): 27809-14.
- Thomas, J. O. and A. A. Travers (2001). "HMGI and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins." *Trends Biochem Sci* **26**(3): 167-74.
- Thuault, S., U. Valcourt, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition." *J Cell Biol* **174**(2): 175-83.
- Treff, N. R., D. Pouchnik, et al. (2004). "High-mobility group A1a protein regulates Ras/ERK signaling in MCF-7 human breast cancer cells." *Oncogene* **23**(3): 777-85.
- Trojer, P. and D. Reinberg (2006). "Histone lysine demethylases and their impact on epigenetics." *Cell* **125**(2): 213-7.
- Tureckova, J., E. M. Wilson, et al. (2001). "Insulin-like growth factor-mediated muscle differentiation: collaboration between phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-signaling pathways and myogenin." *J Biol Chem* **276**(42): 39264-70.
- Ueda, T., Y. V. Postnikov, et al. (2006). "Distinct domains in high mobility group N variants modulate specific chromatin modifications." *J Biol Chem* **281**(15): 10182-7.
- van de Klundert, F. A., H. J. Jansen, et al. (1994). "A proximal promoter element in the hamster desmin upstream regulatory region is responsible for activation by myogenic determination factors." *J Biol Chem* **269**(1): 220-5.
- Vassallo, M. F. and N. Tanese (2002). "Isoform-specific interaction of HP1 with human TAFII130." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 5919-24.
- Verschure, P. J., I. van der Kraan, et al. (2005). "In vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation." *Mol Cell Biol* **25**(11): 4552-64.
- Vinals, F. and F. Ventura (2004). "Myogenin protein stability is decreased by BMP-2 through a mechanism implicating ID1." *J Biol Chem*.
- Vire, E., C. Brenner, et al. (2005). "The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation." *Nature*.
- Wade, P. A. (2001). "Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation." *Oncogene* **20**(24): 3166-73.
- Wade, P. A. (2001). "Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression." *Bioessays* **23**(12): 1131-7.
- Wang, J., K. Guo, et al. (1997). "Rb functions to inhibit apoptosis during myocyte differentiation." *Cancer Res* **57**(3): 351-4.
- Wang, Z. F., A. M. Sirotkin, et al. (1997). "The mouse histone H1 genes: gene organization and differential regulation." *J Mol Biol* **271**(1): 124-38.
- Weiss, A. and H. Cedar (1997). "The role of DNA demethylation during development." *Genes Cells* **2**(8): 481-6.
- Weitzer, G., D. J. Milner, et al. (1995). "Cytoskeletal control of myogenesis: a desmin null mutation blocks the myogenic pathway during embryonic stem cell differentiation." *Dev Biol* **172**(2): 422-39.
- Wilson, E. M., M. M. Hsieh, et al. (2003). "Autocrine growth factor signaling by insulin-like growth factor-II mediates MyoD-stimulated myocyte maturation." *J Biol Chem* **278**(42): 41109-13.
- Wolffe, A. P. (1992). "New insights into chromatin function in transcriptional control." *Faseb J* **6**(15): 3354-61.
- Woodcock, C. L., A. I. Skoultchi, et al. (2006). "Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length." *Chromosome Res* **14**(1): 17-25.
- Wreggett, K. A., F. Hill, et al. (1994). "A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin." *Cytogenet Cell Genet* **66**(2): 99-103.
- Wu, J. and R. W. Lim (2005). "Regulation of inhibitor of differentiation gene 3 (Id3) expression by Sp2-motif binding factor in myogenic C2C12 cells: Downregulation of DNA binding activity following skeletal muscle differentiation." *Biochim Biophys Acta*.
- Yaffe, D. and O. Saxel (1977). "Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle." *Nature* **270**(5639): 725-7.
- Yamamoto, K., M. Sonoda, et al. (2004). "Polycomb group suppressor of zeste 12 links heterochromatin protein 1alpha and enhancer of zeste 2." *J Biol Chem* **279**(1): 401-6.
- Ye, Q., I. Callebaut, et al. (1997). "Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR." *J Biol Chem* **272**(23): 14983-9.

- Yie, J., M. Merika, et al. (1999). "The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome." Embo J **18**(11): 3074-89.
- Zaidi, M. R., Y. Okada, et al. (2006). "Misexpression of full-length HMGA2 induces benign mesenchymal tumors in mice." Cancer Res **66**(15): 7453-9.
- Zhang, R., W. Chen, et al. (2007). "Molecular Dissection of Formation of Senescent Associated Heterochromatin Foci." Mol Cell Biol.
- Zhou, X., K. F. Benson, et al. (1995). "Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C." Nature **376**(6543): 771-4.

## 8 Anhang

### 8.1 Zellkultur

#### 8.1.1 Zellkulturmedien

Zelllinie	Kulturmedium
C2C12:	DMEM 4500 mg/l Glucose 10% FCS (Gibco) 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) 1% L-Glutamin (Gibco)
Myogenese-Differenzierungsmedium:	DMEM 4500 mg/l Glucose (Gibco) 2% Pferdeserum (Gibco) 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco)
Osteogenese-Differenzierungsmedium:	DMEM 4500 mg/l Glucose (Gibco) 10% FCS (Gibco) 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) 1% L-Glutamin (Gibco) 0,5 µg/ml BMP-2 (Prof. Sebald PCII)
293T / Cos-7:	DMEM 1000 mg/l Glucose (Gibco) 10% FCS (Gibco) 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco)
HepG2:	DMEM 1000 mg/l Glucose 10% FCS (Gibco) 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) 1% L-Glutamin (Gibco)
Einfriermedium:	12,0 ml Kultivierungsmedium (inklusive 10 % FCS) 4,5 ml FCS (⇒ Enkonz.: 40 %) 1,5 ml DMSO

## 8.2 Antikörper

Antigen	Hersteller	Verdünnung WB	verdünnt in TBST	Verdünnung für Immunlokalisation in PBS
<b>Primärantikörper</b>				
H3	abcam	1:20000	3% BSA	
HMGA1	abcam	1:2500	3% BSA	1:250
H1	abcam	1:2000	5% dry milk	1:500
HP1 $\alpha$	A. Schepers	1:1000	3% BSA	1:100
HP1 $\beta$	A. Schepers	1:1000	3% BSA	1:100
MeCP2	abcam	-		1:500
MeCP2	upstate	1:2000	5% dry milk	-
gammaH2A.x	abcam			1:500
H2A.z	abcam	1:5000	5% dry milk	1:250
Dnmt1	Santa Cruz	-	-	1:250
PCNA	Santa Cruz			1:100
H3K4me2	abcam	1:5000	3% BSA	1:1000
H3K4me3	abcam	1:5000	3% BSA	1:1000
H3K9me1	abcam	1:2500	3% BSA	1:500
H3K9me2	abcam	1:1000	3% BSA	1:1000
H3K9me3	abcam	1:5000	3% BSA	1:1000
H3K9acetyl	abcam	1:10000	3% BSA	1:1000
H3K27me3	abcam	1:2500	3% BSA	1:200
H3K79me3	abcam	1:2000	3% BSA	1:200
H4K20me3	abcam	1:2000	3% BSA	1:500
Myogenin	BD	1:1000	5% dry milk	1:25
Desmin	Sigma	1:1000	5% dry milk	1:200
Myosin	Sigma	-		1:500
HA-tag	A. Schepers			1:50
Flag-tag	Chemicon			1:500
<b>Sekundärantikörper</b>				
anti-Kanninchen HRP	Jackson IR	1:10000	5% dry milk	
anti-Kanninchen HRP	Dianova	1:10000	5% dry milk	
anti-Kanninchen TexasRed	Dianova			1:100
anti-Kanninchen Cy2	Dianova			1:100
anti-Maus HRP	Jackson IR	1:10000	5% dry milk	
anti-Maus HRP	Dianova	1:10000	5% dry milk	
anti-Maus TexasRed	Dianova			1:100
anti-Maus FITC	Sigma			1:100
anti-Maus Cy2	Dianova			1:100
anti-Ziege HRP	Zymed	1:5000	5% dry milk	
anti-Ratte Cy5	Jackson IR			1:100

### 8.3 Oligonukleotide

PCR-Produkt	Accession-Nr.	Primername	Primer-Sequenz	Primer-T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>	Fragmentgröße	Zyklen
Alkalische Phosphatase	X13409	Maus alk. Phosphatase 5'	TTTTCAGTACTGGCCATCGGCACCT	63,50 °C	60 °C	412 bp	30
		Maus alk. Phosphatase 3'	TGGTGTTCATCGCGTGCGCTC	67,70 °C			
Ctcf	NM_181322.2	CTCF FOR	AGGTGCCACAGACACAGACTTAGTGGTA	60,25 °C	57 °C	448 bp	30
		CTCF REV	GTGTTTGAAATCAGTCAGACTGAGGCTC	59,65 °C			
Cyclind1	NM_007631	mCyclinD1 FOR	ACTGCTTCTGGTGAACAAGCTCA	55,61 °C	55 °C	358 bp	31
		mCyclinD1 REV	AGACCAGCCTCTTCCTCCACTT	55,00 °C			
Dnmt1	NM_010066.2	mDnmt1 FOR	GATGGCGTCATAGCCGATAAGCTAC	59,16 °C	61 °C	360 bp	32
		mDnmt1 REV	GTTGCCGAAGAACCGGTAGCTATCT	59,92 °C			
Eed	NM_021876.1	mEed FOR	GATTGTGTGCGATGGTTAGGCGA	60,66 °C	58 °C	362 bp	32
		mEed REV	TCGCAGACAGCTATGAGGATGCTG	60,35 °C			
Ezh2	NM_007971.1	mEzh2 FOR	ACTTACTGCTGGCACCGTCTGATGT	57,97 °C	58 °C	461 bp	32
		mEzh2 REV	CAAGGTTCTGAAGCTAAGGCAGCT	60,25 °C			
Gapdh	XM_132897	mGapdh FOR	GGGCCCACTTGAAGGGTGGAGC	64,46 °C	57 °C	387 bp	25-27
		mGapdh REV	GTCAGATCCACGACGGACACATTGG	63,20 °C			
Hmga1	AF285780 / BC008125	mHMGA1 FOR	GAGCTCATGAGCGAGTCGGGCTCA	65,53 °C	60 °C	354 bp	27
		mHMGA1 REV	CCAAGTCTCCTCCTCAGAGGACTC	60,56 °C			
Id1	NM_010495	Id1 FOR	ATGAAGGTCGCCAGTGGCAGTG	60,84 °C	57 °C	444 bp	33
		Id1 REV	GCGACACAAGATGCGATCGTCCG	62,29 °C			

## Anhang

PCR-Produkt	Accession-Nr.	Primernamen	Primer-Sequenz	Primer-T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>	Fragmentgröße	Zyklen
Id2	NM_010496	Id2 FOR	ATGAAAGCCTTCAGTCCGGTGAGG	61,40 °C	60 °C	405 bp	31
		Id2 REV	TTAGCCACAGAGTACTTTGCTATCATTCGA	60,65 °C			
Id3	NM_008321	Id3 FOR	ATGAAGGCGCTGAGCCCGGTG	64,98 °C	57 °C	360 bp	32
		Id3 REV	TCAGTGGCAAAGCTCCTCTTGTCC	61,64 °C			
Igf1	NM_010512	IGF-I(1) FOR	CTTCACACCTCTTCTACCTGGCGC	60,14 °C	60 °C	376 bp	33
		IGF-I(1) REV	GTA CTTCCTTTCTCTCTTTGCAGC	60,04 °C			
Igf1r	NM_010513	IGF-I rec FOR	CCTACCAGGGCTTGTCCAACGAG	60,66 °C	57 °C	428 bp	35
		IGF-I rec REV	GTT CATGTGAGCGTAAGGCTGTCTCTC	60,50 °C			
Igf2	NM_010514	IGF-II FOR	ATGGGGATCCCAGTGGGGAAGT	61,25 °C	55 °C	447 bp	32
		IGF-II REV	GA ACTCTTTGAGCTCTTTGGCAAGCA	61,09 °C			
Igf-bp1	NM_008341	Igfbp1 FOR	CCA ACTGCCACCAGTATTTTAATGTAC	56,33 °C	55 °C	440 bp	33
		Igfbp1 REV	CAGACACAGATCTGTGTGAGACGATG	57,51 °C			
Igf-bp2	NM_008342	Igfbp2 FOR	GTACAACCTTAAGCAGTGCAAGATGTCT	57,50 °C	56 °C	378 bp	30
		Igfbp2 REV	CTCTAACAGAAGCAAGGGAGGTTTCAG	59,94 °C			
Igf-bp3	NM_008343	IGFBP-3 FOR	GCACAATGCTGGGAGTGTGGAAAG	61,49 °C	55 °C	439 bp	32
		IGFBP-3 REV	CTGCACGCTGAGGCAATGTACGT	60,99 °C			
Igf-bp4	NM_010517	IGFBP-4 FOR	CTCGTTGTGATTTCTCCGATTGTAG	60,46 °C	57 °C	461 bp	33
		IGFBP-4 REV	ATCTCACATTCTTCTCTCTCTGCA	61,19 °C			
IL-6	NM_031168	mIL-6_5'	ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGAGAC	52,74 °C	55 °C	390 bp	30
		mIL-6_3'	GTTGTTCTTCATGTACTCCAGGTAGC	54,48 °C			

## Anhang

PCR-Produkt	Accession-Nr.	Primernamen	Primer-Sequenz	Primer-T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>	Fragmentgröße	Zyklen
Mecp2	NM_010788.2	MeCP2 FOR	TGGGCCTGAGATACCACCTGTTTCTA	60,84 °C	60 °C	365 bp	30
		MeCP2 REV	CCAGGACAGACCTAGCTGGGCTG	60,92 °C			
Mef2a	NM_001033713	Maus MEF2A 5' Sac	GAGCTCATGGGGCGAAAGAAGATACAAATCACA	69,10 °C	60 °C	409 bp	30
		Maus MEF2A 3' Eco	GAATTCGGCCAGGAGGGCCTCGTTT	68,20 °C			
Msx1	NM_010835.1	mMsx1 Marker FOR	GCTACACACTTCCTCCTGGTTGTCG	59,94 °C	57 °C	434 bp	35
		mMsx1 Marker REV	ACCTACCTTGGTGAAGCAGCAGCA	60,94 °C			
Myf-5	NM_008656	Maus MYF5 5' Sac	GAGCTCATGGACATGACGGACGGCTG	68,10 °C	60 °C	378 bp	27
		Maus MYF5 3' Eco	GAATTCGATTCCTGAGGATCTCCACCTGGG	69,00 °C			
Myf-6	X59060	Maus MYF6 5' Sac	GAGCTCATGATGATGGACCTTTTTGAAACTGGC	68,90 °C	58 °C	362 bp	30
		Maus MYF6 3' Eco	GAATTCGCACAGTCCGACGCTTCAGGG	69,50 °C			
MyoD	NM_010866	MyoD FOR	TGCCTTCTACGCACCTGGAC	55,06 °C	55 °C	369 bp	32
		MyoD REV	TTTGAGCCTGCAGGACACTGA	55,69 °C			
Myogenin	NM_031189	Maus Myogenin 5' Sac	GAGCTCATGGAGCTGTATGAGACATCCCCCTAT	68,00 °C	50 °C	369 bp	31
		Maus Myogenin 3' Eco	GAATTCGGCGCAGGATCTCCACTTTAGG	66,90 °C			
Myosin light chain	U77943	Maus Myosin LC II 5'	AGAAGGCCAAGAGAAGGGCAGGAG	62,00 °C	52 °C	400 bp	30
		Maus Myosin LC II 3'	GGGGAAGGCTGCCACATGTTC	63,30 °C			
Osteocalcin	L24431	Maus Osteocalcin 5'	ATCTTTCTGCTCACTCTGCTG	48,80 °C	60 °C	249 bp	30
		Maus Osteocalcin 3'	AGTGATACCGTAGATGCGTTTGTA	52,60 °C			
p21	NM_007669.2	mCdkn1a (p21) FOR	ACTGATATCAACCCATCTGCATCCGT	60,62 °C	58 °C	467 bp	33
		mCdkn1a (p21) REV	ACATTCCTTCCAGTCCACTGAGCT	60,23 °C			

## Anhang

PCR-Produkt	Accession-Nr.	Primername	Primer-Sequenz	Primer-T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>	Fragmentgröße	Zyklen
pRb	NM_009029.1	mRb1 FOR	CACCCAACACATGCTTTGAACTGAAG	60,60 °C	57 °C	358 bp	32
		mRb1 REV	GACCCTGGAAGATGTACCATTCCAGA	60,28 °C			
Suz12	NM_199196.1	mSuz12 FOR	AGCTCCAAGCACTGTGGTTGAATAACAT	61,18 °C	58 °C	447 bp	31
		mSuz12 REV	TGCTCAGAACCCACTACCCAGAGG	60,34 °C			
Tgf-β	AJ009862	TGF-beta FOR	TGGAGCAACATGTGGAACTCTACCAG	60,27 °C	57 °C	414 bp	33
		TGF-beta REV	AGTCAATGTACAGCTGCCGCACAC	60,08 °C			
Yy1	NM_009537.2	mYY1 FOR	AGTGTGGTCCCAACAGGAGGACA	59,24 °C	58 °C	271 bp	32
		mYY1 REV	TGAAGTATGCATGTAAGTACCCATTCT	59,00 °C			
α-Aktin	M12347	Maus alpha actin 5' Sac	GAGCTCATGTGCGACGAAGACGAGACCAC	67,40 °C	60 °C	362 bp	25
		Maus alpha actin 3' Eco	GAATTCGGGATCTTCTCCCGGTTAGCTTTGG	69,10 °C			

## Anhang

geeignet für (Plasmid)	Vektorprimer	Primersequenz	T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>		
pEGFP-N, pmRFP-N	pEGFP-N Seq pCMV	GCTGGTTT TAGTGAACCGTCAGA	53,51 °C	48 °C		
pEGFP-N, pMiFC-YN	pEGFP-N Seq GFP	CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG	67,57 °C	48-57 °C		
pEGFP-N, pmRFP-N	pmRFP-N (Seq) REV	CCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGC	58,19 °C	48 °C		
pLIB	pLIB 5' Seq	AGCCCTCACTCCTTCTCTAG	46,88 °C	48 °C		
pLIB	pLIB 3' Seq	GGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGT	62,22 °C	48 °C		
pCR-Topo2.1, pDrive	Topo For	CAGGAAACAGCTATGAC	36,21 °C	48 °C		
pCR-Topo2.1, pDrive	Topo Rev	CTGGCCGTCGTTTTAC	43,59 °C	48 °C		
pBiFC-YC, pBiFC-YN	BiFC CMV 5' FOR	ACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT	60,82 °C	57 °C		
pBiFC-YC	BiFC-YC HA-Tag FOR	ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACG	59,34 °C	57 °C		
pBiFC-YC	BiFC-YC 3' REV	ATGAACCACGACAAGCAGAAGAACG	60,38 °C	57 °C		

RNA-Oligo für siRNA	RNA-Sequenz
mHMGAla Ex5 Sense	AAGUCACCACAGCUCCAGGGA
mHMGAla Ex5 AntiS	UCCCUUGGAGCUGUGGUGACUU
mAla Ex5-2 Sense	AAGGGGCAGACCCAAGAAACU
mAla Ex5-2 AntiS	AGUUUCUUGGGUCUGCCCCUU

## 8.4 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	Chromodomäne
cDNA	complementary DNA
CHUD	chromatin unfolding domain
CLSM	kofokales Laser Scanning Mikroskop
CSD	Chromoshadowdomäne
CTP	Cytosintri-phosphat
Cy	Cyanin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destiliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtri-phosphat
DsRed	<i>Discosoma</i> red fluorescent protein
DTT	Dithiotreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethyl-diamin-tetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EtBr	Ethidiumbromid
FA	Formaldehyd
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
g	Gramm
GMSA	Gel-Mobility-Shift-Assay
GTP	Guanidintri-phosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HMG	High Mobility Group
HP	Heterochromatin Protein
HRP	horseradish peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertami
LiCl	Lithiumchlorid
m	Meter
M	molar
m <sup>5</sup> CTP	5-Methyl-Cytosintri-phosphat
mA	Milli-Ampere

---

MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRFP	monomeres rot fluoreszierendes Protein
mRNA	messenger RNA
n	nano
NBD	Nukleosomale Bindungsdomäne
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.a.	per analysis (für die Analyse)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase-Ketten-Reaktion
s	Sekunde
SAP	Shrimp-Alkalische Phosphatase
SB	Natrium-Borat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TTP	Thymidintriphosphat
Tween-20	Polyoxyethylen-20-Sorbitan-Monolaurat
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## 8.5 Lebenslauf und integrierte Publikationsliste

Persönliche Daten	
<b>Name</b>	Jan Brocher
<b>Privatadresse</b>	Bahnhofstraße 22 97070 Würzburg
<b>geboren :</b>	26.07.1977 in Bad Mergentheim, Baden-Württemberg
<b>Nationalität:</b>	deutsch
<b>Familienstand:</b>	ledig
Hochschulausbildung	
<b>2003 - 2007</b>	Promotion im Lehrstuhl Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg als Student des DFG-geförderten <a href="#">Graduierten Kolleg 639</a> (Molekulare und strukturelle Grundlagen der Tumorstabilität) <b>Betreuer:</b> PD. Dr. Robert Hock <b>Thema:</b> HMGA1a-Proteine als Regulatoren zellulärer Differenzierung
<b>2003</b>	Diplomarbeit im Lehrstuhl Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg <b>Betreuer:</b> Prof. Dr. Peter Seibel (BBZ, Leipzig) <b>Thema:</b> Neue Methoden zur Herstellung von $\rho_0$ -Zellen unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen
<b>2002</b>	Diplom in Biologie, Universität Würzburg
<b>2000</b>	Vordiplom in Biologie, Universität Würzburg
<b>1998</b>	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians Universität Würzburg
Zivildienst	
<b>1997 - 1998</b>	Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz in Bad Mergentheim
Schulausbildung	
<b>1997</b>	Abitur am Wirtschaftsgymnasium in Bad Mergentheim
<b>1994-1997</b>	Wirtschaftsgymnasium in Bad Mergentheim
<b>1988-1994</b>	Kopernikus-Realschule in Bad Mergentheim
<b>1984-1988</b>	Ottmar-Schönhuth-Grundschule in Wachbach

<b>Publikationsliste</b>	
<b>2007</b>	<b>Brocher J., Hock R.</b> Impact of HMGA1 proteins on myogenesis and heterochromatin organization during differentiation <i>eingereicht</i>
<b>2007</b>	<b>Ramirez, T., Brocher, J., Stopper, H., Herrera, LA., Hock, R.</b> Chromatin remodeling by arsenite <i>in Revision</i>
<b>2007</b>	<b>Thomae A., Pich D., Brocher J., Spindler MP., Berens C. Hock R., Hammerschmidt W., Schepers A.</b> Interaction between HMGA1a and ORC creates site-specific replication competence <i>eingereicht</i>
<b>2006</b>	<b>Hock R., Witte F., Brocher J., Schutz M., Scheer U.</b> Expression of HMGA2 variants during oogenesis and early embryogenesis of <i>Xenopus laevis</i> [ <a href="#">PMID: 16584807</a> ]
<b>Vorträge</b>	
<b>2007</b>	Welcome Trust Center für Zellbiologie (WTCCB) Edinburgh Titel: Impact of HMGA1a proteins on myogenesis and heterochromatin organization during differentiation
<b>2007</b>	EMBL Heidelberg Titel: Impact of HMGA1a proteins on myogenesis and heterochromatin organization during differentiation
<b>2006</b>	2. Internationales Studenten-Symposium der Internationalen Graduiertenschule Life Sciences - Klasse Biomedizin; Würzburg Titel: The Impact of HMGA1a on cellular differentiation and its interaction partners on chromatin.
<b>2006</b>	1. Internationaler Chromatin Workshop (SFB/Transregio 5 Heidelberg-München); Reimlingen Titel: Caught in action: HMGA1a in differentiation and interaction partners on chromatin
<b>2006</b>	Joint Retreat des Graduierten Kolleg 639 (Tumorinstabilität) und des Graduierten Kolleg 1048 (Organogenese); Title: HMGA1a in differentiation and its interaction partners on chromatin
<b>2003-2007</b>	Fortschrittsberichte im Rahmen eines wöchentlichen Doktoranden-Seminars des Graduierten Kollegs und jährlicher Retreat des Graduierten Kolleg 639.

<b>Posterpräsentationen</b>	
<b>2006</b>	1. Internationaler Chromatin Workshop (SFB/Transregio 5 Heidelberg-München); Reimlingen <b>Brocher J.</b> , Hock R. Titel: Impact of HMGA1a proteins on differentiation and interaction partners on chromatin
<b>2006</b>	61 <sup>st</sup> jährliches Treffen der Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Gastroenterologische Endoskopie und Deutsche Gesellschaft für Viszeralchirurgie (DGVC) Luhrs H., <b>Brocher J.</b> , Hock R. Titel: Epigenetic status of cells in the adenoma-carcinoma sequence of coloncarcinoma
<b>2005</b>	28. DGZ-Tagung; Heidelberg <b>Brocher J.</b> , Hock R. Titel: Altering dynamics of HMGA protein - consequences for chromatin structure and function
<b>2005</b>	13. AEK/AIO-Krebs Kongress; Würzburg <b>Brocher J.</b> , Hock R. Titel: Interfering with HMG dynamics <i>in vivo</i>
<b>2004</b>	21. Internationales GUM-Meeting; Würzburg <b>Brocher J.</b> , Hock R. Titel: HMG proteins as drug targets in cancer therapy
<b>2004</b>	1. Graduiertentag der Internationalen Graduiertenschule Life Sciences – Klasse Biomedizin; Würzburg <b>Brocher J.</b> , Hock R. Titel: HMG proteins in differentiation and as targets in cancer therapy
<b>Ämter</b>	
<b>2005 and 2006</b>	Studentischer Sprecher des DFG-geförderten <a href="#">Graduierten Kolleg 639</a> – Molekulare und strukturelle Grundlagen der Tumorstabilität
<b>Organisatorische Aktivitäten</b>	
<b>2005</b>	1. Internationales Studenten-Symposium der Graduierten Schule Würzburg (flyer and poster design)
<b>2006</b>	2. Internationales Studenten-Symposium der Graduierten Schule Würzburg

## **8.6 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Weiterhin habe ich noch keinen Promotionsversuch unternommen, oder diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Würzburg, den

---

Jan Brocher

## 8.7 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Betreuer PD Dr. Robert Hock, für meine Promotionsstelle, für die guten Ideen und unglaublich interessanten Projekte, die zielstrebige Führung während der gesamten Doktorarbeit, die nicht zuletzt verantwortlich für all die hier präsentierten Ergebnisse war. Danke auch die nötige Freiheit beim Arbeiten, das offene Ohr und die vielen Tipps bei allen sinnigen und unsinnigen Fragen, die Diskussionen und die Vermittlung des Wissens in all dem Schaffen.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. H. Stopper für die Übernahme der Zweitkorrektur, Dem Graduiertenkolleg 639 für die Finanzierung und Prof. Dr. U. Scheer für Teile der finanziellen Unterstützung danken.

Danke an meine Mitbewohnern und Mit-Biologen Toni, Daniel, Svenja und ganz besonders Holger für diese unglaublich wunderbare Zeit, die vielen wissenschaftlichen und vor allem nicht-wissenschaftlichen Gespräche, jegliche Hilfe und meine Ernährung. Dazu kommen all meine Freunde. Ihr seid wie eine zweite Familie!

Alle Mitarbeiter des Lehrstuhls Zoologie I, besonders Hannah, Hannes, Rike, Martin und Manfred sei gedankt für alle Tipps und die angenehme und kollegiale Atmosphäre. Natalia für die Hilfe und die nette Zusammenarbeit an der Hood. Claudia für die unzähligen Sequenzen. Katrin und Johanna für die Hilfe bei den Hydren. Thomas Fischer für die FACS-Analysen.

Danke sagen möchte ich allen, von denen ich lernen durfte und denen ich etwas beibringen konnte: Sascha, Annina und Floh für so manch coole Unterhaltung und die angenehme Zusammenarbeit. Ich drück' euch die Daumen für die Zukunft!  
Dankeschön an die ganzen F2-Praktikanten für all die Fragen, die gute Atmosphäre und Unterstützung im Labor.

Ich danke auch all den Fehlern,... dass ich sie machen und aus ihnen lernen durfte. Ich hoffe nie zu vergessen, dass sie, neben Neugier und Offenheit Neuem gegenüber, eine der wichtigsten Quellen neuen Wissens und der Erfahrung darstellen.

Dank auch an alle „normalen“ Menschen, die mich das Labor mal haben vergessen lassen. Besonders an Bruno und Slavi, die ganzen Karateka aus Bad Mergentheim und Lauda und meine Jam-Kollegen (keep on rockin'). Dank an die Musik für ihre Existenz und die Erfindung von Computer und Pizza.

Ganz besonderer Dank gilt den besten Eltern, die man sich vorstellen kann: Liebe Mama, lieber Papa, ihr habt mich immer ermuntert, unterstützt und aufgefangen, wenn es nötig war. Ohne euch wäre all dies nicht zu realisieren gewesen wäre.

Al final... muchas gracias Tzutzy, mi vida, dass ich bei dir einfach ich sein darf, für all die unendliche und bedingungslose Liebe und dafür, dass du immer für mich da bist!