

**Funktionelle Charakterisierung der  
SANT-Domänen des Korepressors  
N-CoR**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 08  
der Justus-Liebig-Universität  
in Giessen

**von**  
**Jens Tiefenbach**  
**aus Gladenbach**

Frankfurt im August 2003

vom Fachbereich 08 (naturwissenschaftlicher Fachbereich) der Justus-Liebig  
Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Renkawitz. PD. Dr. Thorsten Heinzel

# Inhaltsverzeichnis

## Zusammenfassung

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Regulation der Transkription durch Chromatinmodifikationen	1
1.2	Die Korepressoren N-CoR und SMRT	6
1.3	Interaktionen der Korepressoren N-CoR / SMRT	9
1.4	Regulation der Korepressoren N-CoR/SMRT	12
1.5	N-CoR/SMRT in der Embryonalentwicklung und in Krankheiten	13
1.6	Das SUMO Protein	15
1.7	Der SUMO-Konjugationsweg	17
1.8	Funktion der SUMO-Modifikation	18
1.9	Aufgabenstellung und Zielsetzung	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Chemikalien und Materialien	21
2.2	Plasmide	22
2.3	Antikörper	27
2.4	Spezielle Enzyme und Enzymkits	27
2.5	Peptide	28
2.6	Primer	28
2.7	<i>E.coli</i> Stämme und Anzuchtbedingungen	29
2.8	Zelllinien und Medien	30
2.9	Hefestamm und Anzuchtbedingungen	30
2.10	Lösungen und Puffer	31
2.11	Poymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
2.12	DNA Methoden	31
2.13	Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i>	33
2.14	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	34
2.15	Proteinbiochemische Methoden	34
2.16	<i>In vitro</i> GST-Pulldown	35
2.17	Immunoblot (Western Blot)	36
2.18	Immunopräzipitation (IP)	37
2.19	Methoden der Zellkultur	37
2.20	Transfektion von Säugerzellen	37
2.21	β-Galactosidasetest	38
2.22	Messung der Luziferaseaktivität / Repressionstest	38
2.23	Immunofluoreszenzanalyse	38
2.24	<i>In vitro</i> SUMO-Modifikation	39
2.25	Far-Western Hybridisierung	40
2.26	<i>In vivo</i> Markierung von <sup>3</sup> H Acetyl-Histonen	42
2.27	Histondeacetylasetest	43
2.28	Biacore	43
2.28	Methoden im Hefe-Zwei-Hybrid-System	44

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Far Western Blot Hybridisierung</b>	<b>47</b>
3.1.1	Sonde für die Far Western Blot Hybridisierung	47
3.1.2	Far Western Blot Hybridisierung mit der N-CoR SANT1+2-Domäne	48
<b>3.2</b>	<b>Identifikation von Interaktionspartnern des Korepressors N-CoR</b>	<b>51</b>
3.2.1	Hefe-Zwei-Hybrid Screen mit der N-CoR SANT1+2-Domäne	51
3.2.2	Interaktionspartner im Hefe-Zwei-Hybrid Screen	54
3.2.3	<i>In vitro</i> Proteininteraktionen mit den SANT-Domänen	59
3.2.4	Eingrenzung des Interaktionsbereichs innerhalb der N-CoR SANT1+2-Domäne	61
3.2.5	PIAS1 und die cDNA I interagieren mit zusätzlichen Regionen von N-CoR	63
<b>3.3</b>	<b>N-CoR enthält SUMO-Konsensussequenzen</b>	<b>64</b>
3.3.1	PIAS1 und N-CoR interagieren spezifisch <i>in vivo</i>	65
3.3.2	TDG interagiert mit N-CoR <i>in vivo</i>	67
3.3.3	N-CoR ist <i>in vivo</i> modifiziert	68
3.3.4	Detektion der N-CoR Sumoylierung	69
3.3.5	N-CoR <i>in vitro</i> SUMO-Modifikationstest	70
3.3.6	N-CoR und PIAS1 kolokalisieren <i>in vivo</i>	71
3.3.7	PIAS1 vermindert die Repression von N-CoR	73
3.3.8	Alaninsubstitutionen in der N-CoR SANT1-Domäne	74
3.3.9	Deletionen der N-CoR SANT1, SANT2 und SANT1+2-Domänen	77
3.3.10	Immunfluoreszenzfärbung der Gal-N-CoR $\Delta$ Sumo Mutanten	78
3.3.11	Repressionstest verschiedener N-CoR Mutanten	80
3.3.12	HDAC3 interagiert nicht mit N-CoR $\Delta$ SANT1	81
<b>3.4</b>	<b>Die SANT1-Domäne von N-CoR vermittelt die Histonbindung</b>	<b>83</b>
3.4.1	Die N-CoR SANT1-Domäne interagiert mit Histon H3 / H4	84
3.4.2	Die N-CoR SANT1+2-Domäne interagiert mit Histonpeptiden	85
3.4.3	Interaktion der SANT1-Domäne mit Histonen mittels Biacore-Messung	86
3.4.4	Kombination von Histoninteraktionsdomänen mit N-CoR SANT-Domänen	89
3.4.5	HDAC3 Aktivierung durch N-CoR DAD SANT1	91
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>94</b>
4.1	Die N-CoR SANT-Domänen vermitteln Proteininteraktionen	93
4.2	N-CoR ist SUMO modifiziert	96
4.3	Änderung der N-CoR Lokalisation durch heterologe Expression der SUMO-E3-Ligase PIAS1	98
4.4	Funktionelle Bedeutung der N-CoR Sumoylierung	100
4.5	Potentielle Interaktionspartner der N-CoR SANT-Domäne	103
4.6	Die N-CoR SANT Domäne vermittelt Histonbindung	104
4.7	Die SANT-Domäne als HDAC-Aktivierungsdomäne	109
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>126</b>

## Zusammenfassung

Der Korepressor N-CoR vermittelt die Repression von nukleären Hormonrezeptoren in Abwesenheit ihrer Liganden und ist darüber hinaus für die embryonale Entwicklung von Säugern entscheidend. N-CoR ist in der Zelle mit Histondeacetylasen (HDACs) komplexiert. Diese Enzyme bewirken im Zusammenspiel mit ihren Gegenspielern, den Histonacetyltransferasen, durch Deacetylierung und Acetylierung von Histonen eine dynamische Modifikation des Chromatins und beeinflussen so die Transkription von Genen. Die Interaktion zwischen regulatorischen Proteinen, Histonen und histon-modifizierenden Proteinen ist ein fundamentaler und konservierter Mechanismus der Genregulation in höheren Eukaryonten. Die Histonkodehypothese von Rice und Allis (2000) beschreibt, dass bestimmte Proteindomänen existieren, die spezifisch an posttranslational modifizierte Histone binden und so die Genexpression regulieren. Für Faktoren die Bromodomänen und Chromodomänen enthalten, konnten spezifische Interaktionen zu modifizierten Histonen gezeigt werden. Koregulatoren (Koaktivatoren und Korepressoren) und Transkriptionsfaktoren enthalten eine Fülle noch uncharakterisierter Domänen, die in ähnlicher Weise wirken könnten. Der Korepressor N-CoR enthält beispielsweise zwei uncharakterisierte SANT-Domänen. Die SANT-Domäne ist zwischen Hefe und Säugern konserviert und spielt vermutlich in der Chromatinmodifizierung oder Transkription eine Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Screeningmethoden zur Identifikation von Interaktionspartnern der N-CoR SANT-Domänen eingesetzt. Far-Western-Blot Hybridisierungen zeigten mehrere potentielle Interaktionspartner der N-CoR SANT 1+2-Domäne (As 425-758). In einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen war es möglich, Interaktionspartner der N-CoR SANT-Domäne zu isolieren. Insgesamt 14 verschiedene Proteine wurden in dem Hefescreen identifiziert. Die Proteine PIAS1, Ubc9, TDG, Hoxa-4, TAF<sub>II</sub>250 und cDNA I interagierten *in vitro* in einem Pulldown-Experiment spezifisch mit der N-CoR SANT1-Domäne. Die Interaktionen waren spezifisch für den Korepressor N-CoR und es konnte ein Unterschied zwischen der SANT1 und der SANT2-Domäne festgestellt werden.

Drei der im Hefescreen gefundenen Proteine (PIAS1, Ubc9 und Pc2) deuteten darauf hin, dass N-CoR durch die Konjugation von SUMO-Proteinen posttranslational modifiziert sein könnte. In Ko-Immunopräzipitationen konnte die Interaktion zwischen N-CoR und der SUMO-E3-Ligase PIAS1 *in vivo* bestätigt werden. Die N-CoR SUMO-Modifikation wurde indirekt *in vivo* und in einem *in vitro* Sumoylierungstest nachgewiesen. Endogenes N-CoR und PIAS1 kolokalisieren im Zellkern, wobei die heterologe Expression der SUMO-E3 Ligase die für N-CoR typische Aggregatbildung im Kern verhindert und eine diffusere Verteilung und eine

Häufung in der Nähe der Kernmembran induziert. In Kollokalisierungsstudien konnte ferner gezeigt werden, dass eine N-CoR- $\Delta$ SUMO Konsensussequenzmutante eine veränderte zytoplasmatisch-nukleäre Lokalisation aufweist. Dies traf ebenfalls auf  $\Delta$ SANT-Mutanten von N-CoR zu, die im Vergleich zum N-CoR Wildtypprotein eine unterschiedliche Lokalisation bei heterologer Expression von PIAS1 zeigten. Die Koexpression von PIAS1 reduzierte die Repression eines Luziferasereporters durch N-CoR. Andererseits war die Repression des Proteins ebenfalls durch Alanin-Substitution in potentiellen SUMO-Stellen vermindert.

Im Hefescreen wurden weiterhin Proteine wie RanBP9, Pc2, TDG, TAF<sub>II</sub>250, CGBP, BTBD1, Hoxa-4 und eine uncharakterisierte cDNA I als interessante N-CoR Interaktionspartner identifiziert. Einige dieser Proteine erlaubten aufgrund publizierter Daten eine hypothetische Deutung ihrer Funktion im N-CoR Korepressorkomplex. Vielversprechend für zukünftige Untersuchungen sind die Proteine Pc2, BTBD1, RanBP9, TDG und TAF<sub>II</sub>250, auf die im Rahmen dieser Arbeit aber nicht näher eingegangen werden konnte.

Die SANT-Domäne wurde ferner im Zusammenhang der Histoncodehypothese betrachtet. In Pulldown-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die N-CoR SANT1-Domäne Histonbindung vermittelt. Die N-CoR SANT1-Domäne interagiert mit hyperacetylierten Histonen, hauptsächlich mit H3 und in geringerem Umfang mit H4. Die SANT2-Domäne des Korepressors hingegen interagiert nicht mit Histonen. Untersuchungen mit Histonpeptiden zeigten eine starke Interaktion der N-CoR SANT1+2-Domäne mit unmodifizierten Histonpeptiden H2A, H2B, H3 oder H4. Mit der Biacore-Technologie wurde das Ergebnis der Interaktion zwischen der N-CoR SANT1-Domäne und den Histonen bestätigt. Eingeschlossen in die Untersuchung wurde die enzymatische Aktivität rekombinanter HDACs unter dem Gesichtspunkt der Histonbindung der SANT-Domäne. Für rekombinante HDAC3 konnte die Aktivierung durch die N-CoR Deacetylaseaktivierungs-Domäne, bestätigt werden. Eine Aktivierung weiterer HDACs mit SANT-Chimärenproteinen war nicht möglich.

Die spezifische Substraterkennung chromatinmodifizierender Proteine ist eine elementare Fragestellung für die Klärung der molekularen Mechanismen der Chromatinregulation. Die Entschlüsselung des Histoncodes und die Zusammensetzung bzw. das Wirken regulatorischer Proteinkomplexe wird auch für die nächsten Jahre eine wichtige Forschungsarbeit darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zusammenhänge zwischen den N-CoR SANT-Domänen und der Histoncodehypothese weiterentwickelt und spezifische Proteininteraktionen dieser Domäne charakterisiert.

# **1 Einleitung**

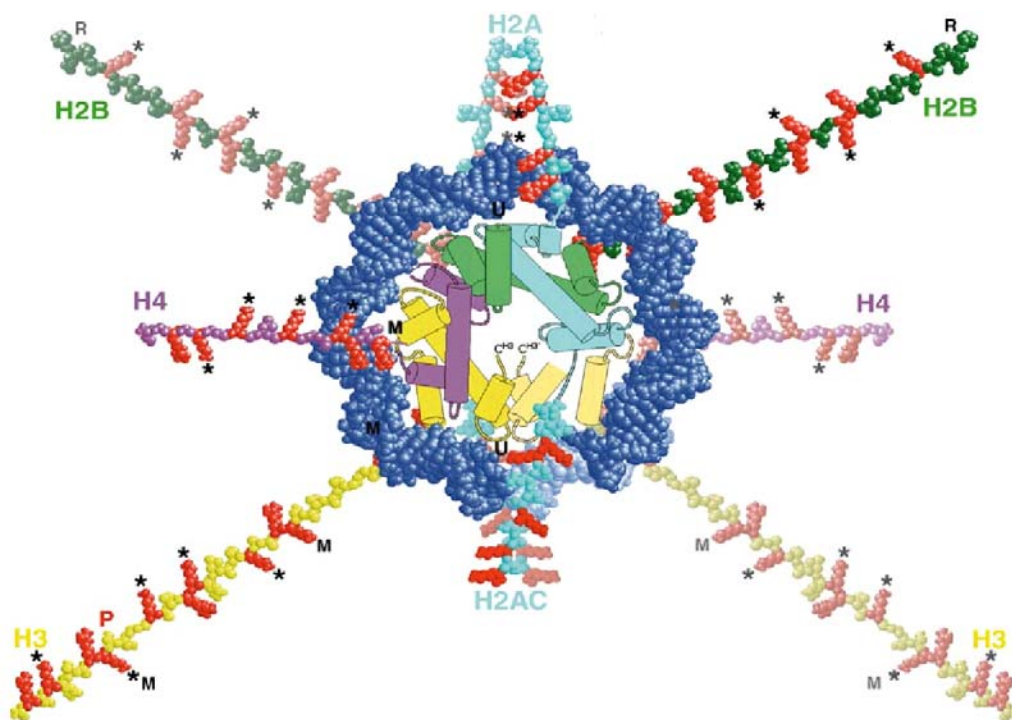
In mehrzelligen Organismen bewirkt die selektive Expression bestimmter Gene die Entstehung verschiedener Zelltypen, die in einer Fülle von Organen unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Die temporäre und zellspezifische Kontrolle der Genexpression ist einer der fundamentalsten Prozesse der Biologie. Die genetische Information eines Lebewesens ist auf ihrer DNA gespeichert, welche im Komplex mit Proteinen vorliegt und als Chromatin bezeichnet wird. Die Umschreibung von DNA-Abschnitten (Genen) in Ribonukleinsäuren bezeichnet man als Transkription. Die Enzyme, die diesen Vorgang katalysieren, sind DNA-abhängige-RNA-Polymerasen (RNA Pol). Die Initiationsrate der Polymerase an regulatorische DNA-Stellen (Promotoren) wird durch DNA-bindende Aktivatoren, basale Transkriptionsfaktoren, Koregulatoren (Koaktivatoren und Korepressoren) und chromatinmodifizierende Proteine unterstützt oder inhibiert. Modifikationen des Chromatins zeigen aktive (Euchromatin) oder stille (Heterochromatin) Bereiche der Genexpression an. Im Genom mehrzelliger Organismen dient ein hoher Prozentsatz der Genprodukte der Kontrolle der Genexpression: Diese Genprodukte sind lediglich für die Unterscheidung der zellspezifischen und temporären Transkription bestimmter Gene verantwortlich. Die Frage der Regulierung, der Zusammensetzung aber auch der Kommunikation dieser chromatinmodifizierenden Komplexe untereinander, ist elementar für das Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Entstehung vieler Erkrankungen, wie zum Beispiel Krebs zugrunde liegen.

## **1.1 Regulation der Transkription durch Chromatinmodifikationen**

Bei den chromatinassoziierten Proteinen handelt es sich um zwei generelle Gruppen DNA-bindender Faktoren, die hochkonservierten globulären Histone und die Nicht-Histon-Proteine. Das Nukleosom stellt die sich wiederholende Struktureinheit des Chromatins dar und besteht aus 146 Basenpaaren DNA, die um ein Histonoktamer, bestehend aus jeweils zwei Molekülen der Core-Histone H2A, H2B, H3 und H4, gewunden sind. Der C-Terminus der Core-Histone interagiert mit den jeweiligen anderen C-Termini und bildet so das Nukleosomen-Core (Arents et al., 1991; Luger et al., 1997). Die hydrophilen N-terminalen Bereiche der Core-Histone (Abb. 1.1) haben eine flexible Struktur und ragen aus dem Nukleosomen-Core heraus. Sie werden daher auch als Histonschwänze bezeichnet (Luger and Richmond, 1998). Jedes Nukleosomen ist durch Linker-DNA, an die ein Histon H1 und HMG Proteine binden, von dem nächsten Nukleosom separiert (Hill, 2001). Die DNA wird durch das Core-Histonoktamer und das Linker-Histon H1 zwischen den Nukleosom verpackt und



bildet Chromatinketten, welche ihrerseits in eine höhere Chromatinstruktur verpackt werden (Horn and Peterson, 2002). Die Chromatinstruktur ist äußerst dynamisch und bestimmte Aminosäuren der Core-Histone, besonders in den exponierten Seitenketten der N-Termini, sind Ziel posttranslationaler Modifikationen. Zu diesen kovalenten Modifikationen zählen Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und ADP-Ribosylierung. (Cheung et al., 2000; Strahl and Allis, 2000) Der basische Charakter der Histonschwänze führt beispielsweise durch Acetylierung zu einer veränderten ionischen Ladung des Histon N-Terminus und



**Abb. 1.1: Posttranslationale Modifikationen an Histon N-termini**

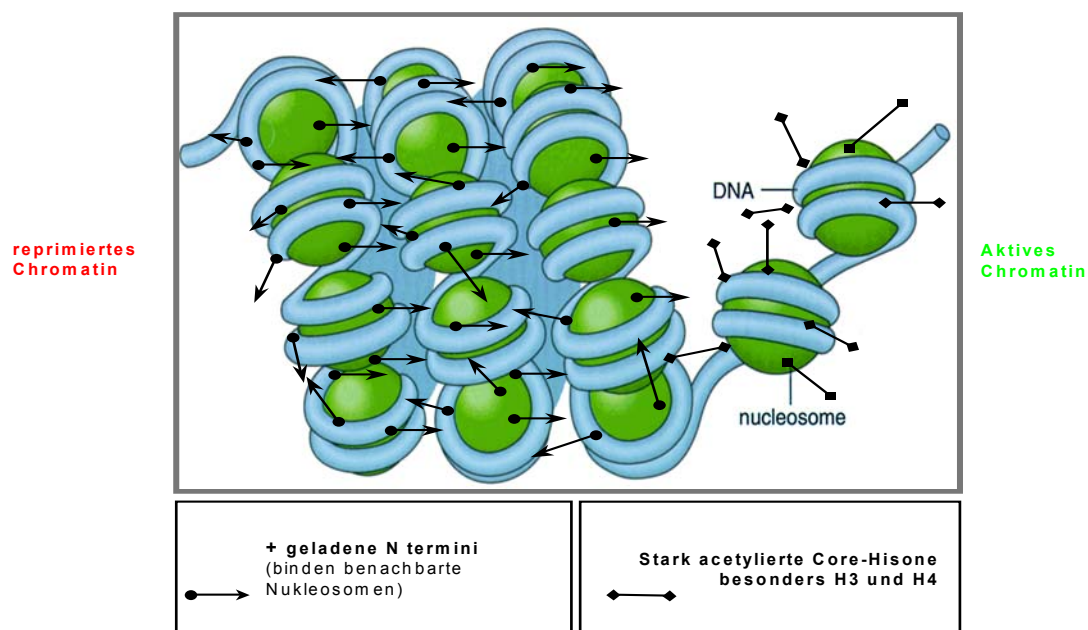
Histonmethylierung kann sowohl an einem Arginin sowie an einem Lysin erfolgen, Acetylierung und Ubiquitinierung erfolgen ausschließlich an Lysin, ADP-Ribosylierung und Phosphorylierung an Serinen der Histon N-termini. Die Lysine der Histone H3 und H4 sind ein häufiges Ziel posttranslationaler Modifikation, besonders von Acetylierung und Methylierung. Diese Modifikationen treten auch an Histon H2A und H2B auf (Wolffe and Hayes, 1999). M=Methylierung, P=Phosphorylierung, \*=Acetylierung, U=Ubiquitinierung.

resultiert in einer Änderung der Chromatinverpackung und der Bindung von Transkriptionsfaktoren und chromatinmodifizierenden Proteinen (Jenuwein and Allis, 2001). Das Lysin ist Ziel unterschiedlicher posttranslationaler Modifikationen. Diese können im Fall der Acetylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung reversibler Art sein oder im Fall der Methylierung einen permanenten Status besitzen. Ein einzelnes Lysin kann lediglich durch eine Modifikation verändert werden, jedoch können in einem Protein verschiedene Lysine unterschiedliche Gruppen tragen (Jenuwein and Allis, 2001).

Die Fähigkeit der Histone die DNA im Nukleus zu verpacken und zu kondensieren stellt über die Rekrutierung von DNA-bindenden Faktoren einen zusätzlichen komplexen Prozeß der nukleären Regulierung in bezug auf die Gentranskription, die DNA Replikation, die Rekombination und die DNA Reparatur dar. Die Chromatinstruktur selbst bildet durch Verhinderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an entsprechende DNA-Stellen eine Barriere für die Transkription (Orphanides und Reinberg, 2000). Nukleäre Hormonrezeptoren (NR) gehören zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die die Fähigkeit besitzen ihre Bindungsstellen (response elements) in dieser kompakten Chromatinstruktur zu finden und zu binden (Collingwood et al., 1999; Deroo and Archer, 2001; Hsiao et al., 2002). Die Aktivitäten solcher sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren, welche entweder reprimierend oder aktivierend auf die Expression wirken, werden von Kofaktoren beeinflusst, mit denen sie im Komplex vorliegen. Diese Kofaktoren verändern die Chromatinstruktur lokal und steuern so die Genexpression.

Die Rekrutierung chromatinmodifizierender Faktoren zur Veränderung der Chromatinarchitektur wird hauptsächlich durch zwei Strategien verfolgt. Einerseits durch ATP-abhängige chromatinmodifizierende Komplexe (CRCs) und andererseits durch Histon-modifizierende Proteine. Chromatinmodifizierende Komplexe sind zwischen Hefe und Mensch konserviert und benötigen ATP zur Veränderung der Chromatinstruktur (Becker und Hörz, 2002). Es handelt sich um Multiproteinkomplexe, die aufgrund der jeweiligen vorhandenen ATPase in drei Familien (Swi/Snf, ISWI und Mi-2/NURD) zusammengefaßt werden (Becker und Hörz, 2002). Der Mi-2/NURD Komplex besitzt zusätzlich Histondeacetylaseaktivität und verbindet daher die beiden Strategien der Chromatinveränderung: ATP-abhängige Chromatinmodifizierung und Histonmodifikation (Guschin et al., 2000). Histone unterliegen einer Vielzahl posttranslationaler Modifikationen. Die Acetylierung und Deacetylierung von Core-Histonen wurde intensiv studiert und als ein zentraler Regulationsmechanismus der eukaryotischen Genexpression beschrieben (Abb. 1.2). Aktives Chromatin enthält hyperacetylierte Histone, wohingegen die Deacetylierung mit inaktiven Chromatin korreliert (Deckert und Struhl, 2001; Grunstein, 1990; Khochbin et al., 2001; Kuo et al., 2000; Turner, 1993). Der Grad der Histonacetylierung in der Promotorregion wird durch die Rekrutierung von Koregulatorkomplexen und von den jeweils assoziierten enzymatischen Aktivitäten der Histonacetyltransferasen (HATs) oder Histondeacetylasen (HDACs) reguliert (Struhl, 1998). Drei HAT Familien wurden identifiziert: Die GNAT (SAGA/PCAF/Gcn5), die MYST (NuA4/TIP60) und die p300/CBP Familie (Brown et al., 2000; Narlikar et al., 2002). Die verschiedenen HATs sind in verschiedenen Komplexen enthalten und nehmen unterschiedliche biologische Funktionen wahr. Dies

kann einerseits in der Acetylierung von Core-Histonen oder andererseits der Acetylierung von Nicht-Histon-Proteinen resultieren. HDACs sind in drei Klassen zusammengefaßt: Klasse I HDACs (HDACs 1, 2, 3, und 8) ähneln dem Hefe RPD3 Protein und sind nukleär lokalisiert; Klasse II HDACs (HDACs 4, 5, 6, 7, 9, und 10) sind zu dem Hefeprotein HDA1 homolog und können im Zytoplasma wie auch im Nukleus enthalten sein. Die dritte Klasse HDACs bildet eine strukturell unterschiedliche Klasse von NAD-abhängigen Enzymen, die Ähnlichkeit mit den Hefe SIR2 (silent information regulator 2) Proteinen aufweisen (Gottschling, 2000; Gray und Ekstrom, 2001; Imai et al., 2000; Landry et al., 2000; Rundlett et al., 1996; Smith et al., 2000; Thiagalingam et al., 2003; Vidal und Gaber, 1991).



**Abb. 1.2: Veränderung der Chromatinstruktur durch Histonmodifikation**

Posttranslationale Modifikationen an Histonen, wie Acetylierung und Deacetylierung führen zu einer lokalen Veränderung der Chromatinstruktur. Der Verlust der Acetylgruppen an Lysin-Aminosäuren im Histon bedingt eine kompaktere, reprimierte Chromatinstruktur, die es benachbarten Nucleosomen erlaubt, elektrostatische Wechselwirkungen einzugehen.

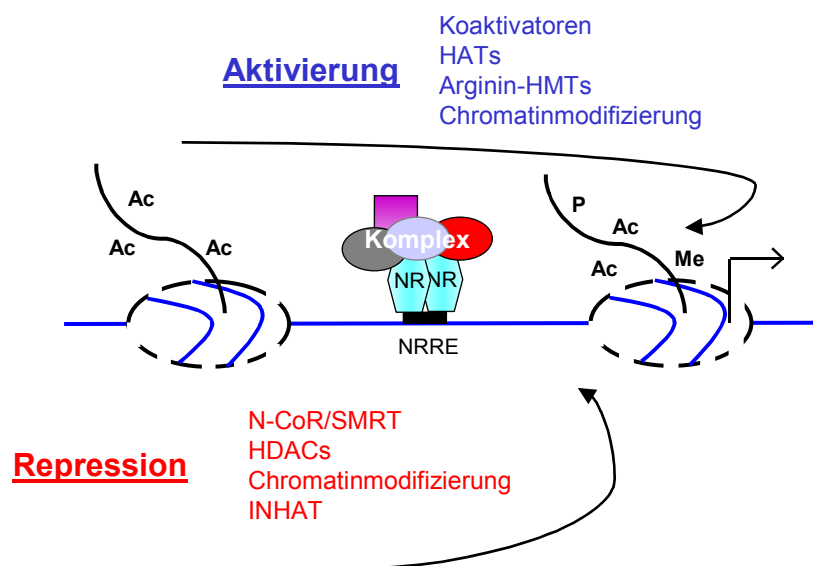
Posttranslationale Modifikationen der Core-Histone führen zur Rekrutierung von Faktoren, die diese Modifikationen durch spezifische Domänen erkennen. Je nachdem welche Modifikationen vorliegen und an welchen Aminosäuren diese erfolgen, ergibt sich ein bestimmter Histoncode, der von spezifischen Proteinen erkannt wird. Modifikationen der gleichen oder benachbarter N-Termini von Histonen sind möglicherweise wechselseitig voneinander abhängig und führen zu einer Fülle verschiedenster Kombinationen der Modifikationen. Strahl und Allis entwickelten diese Hypothese des Histoncodes (Strahl und Allis, 2000). Die Bromodomäne war die erste Domäne, der man eine solche spezifische Interaktion zu einer kovalenten

Histonmodifikation (acetylierte Lysine) zuweisen konnte (Dhalluin et al., 1999; Owen et al., 2000; Winston und Allis, 1999). Die Analyse der Humangenomsequenz zeigt, dass diese Domäne in ungefähr 134 Proteinen enthalten ist; beispielsweise in Transkriptionsfaktoren, die über Histonacetyltransferaseaktivität verfügen (Gcn5, PCAF, TAF<sub>II</sub>250). Das Protein TAF<sub>II</sub>250 besitzt eine Tandem Bromodomäne und interagiert präferentiell mit diacetylierten Histonpeptiden (Jacobson et al., 2000). Ferner konnte man zeigen, dass die Acetylgruppe des Lysin 9 im Histone H3 erst durch eine HDAC entfernt werden muß, bevor eine Methylgruppe durch eine Histonmethyltransferase (HMT) übertragen werden kann. Diese Methylierung ist eine stabile Modifikation und resultiert in der Bindung von Chromodomänen enthaltenden Proteinen, die diese Modifikation erkennen. Für das Protein HP1 (**heterochromatin protein I**) konnte gezeigt werden, dass dieses spezifisch und selektiv methyliertes Lysin 9 des Histons H3 bindet (Bannister et al., 2001). Die Assoziation des HP1 Proteins mit Histonen im Heterochromatin führt zu einer stärker kondensierten Chromatinstruktur und damit zu stark reprimierten Genbereichen. Mittlerweile wurde die Hypothese dahingehend weiterentwickelt, dass beispielsweise die Phosphorylierung eines Serins oder Threonins eine Möglichkeit der dynamischen Beeinflussung der Methylierung und damit der Transkription darstellt. Die Phosphorylierung einer Aminosäure N-terminal, in direkter Nachbarschaft des methylierten Lysins würde in transkriptionell stillen Genabschnitten erfolgen, und die Phosphorylierung C-terminal des methylierten Lysins würde in aktiven Bereichen festzustellen sein (persönliche Mitteilung Allis, Keystone Chromatin Meeting 2003).

Histonmodifizierende Proteine enthalten diverse Domänen (Chromo-Shadow, SANT), denen man bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Funktion zuordnen konnte. Es ist wahrscheinlich, dass manche dieser Domänen die Hypothese des Histonkods weiterführen. Der INHAT (**inhibitor of acetyltransferases**) Komplex enthält eine Acetyltransferase inhibierende Domäne, die Histone bindet und so spezifisch diese Stellen als Acetylierungssubstrat maskiert (Seo et al., 2001). In der Zelle existieren eine Fülle von Möglichkeiten wie Proteine mit Histonen in Wechselwirkung treten und so Einfluß auf die Transkription nehmen können.

## 1.2 Die Korepressoren N-CoR und SMRT

Die Chromatinmodifizierung durch nukleäre Hormonrezeptoren (NR) erfolgt durch die Rekrutierung bestimmter Koaktivator- oder Korepressorkomplexe. Die Rezeptoren können einerseits als Heterodimer oder als Homodimer die Transkription durch direkte Bindung an DNA Erkennungsstellen (response element; RE) aktivieren bzw. reprimieren oder andererseits durch Bindung an andere DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Expression eines Zielgenes nehmen (Abb. 1.3). Die molekulare Wirkung vieler nukleärer Hormonrezeptoren gehört aufgrund ihrer Bedeutung in der Biologie und Medizin und aufgrund ihrer einfachen Regulierbarkeit zu den gut untersuchten und sehr gut verstandenen Transkriptionsfaktoren. Nukleäre Hormonrezeptoren werden in einer Genfamilie zusammengefasst, deren einzelne Mitglieder die Transkription durch verschiedene Mechanismen regulieren (Aranda und Pascual, 2001; Glass und Rosenfeld, 2000).



**Abb. 1.3: Transkriptionsmodell Nukleärer Hormonrezeptoren**

Nukleäre Hormonrezeptoren (NR) binden spezifische Erkennungsstellen (response elements; RE) der DNA. In Anwesenheit des spezifischen agonistischen Liganden ist ein Koaktivator-Komplex assoziiert, in dem Histonacetyltransferasen, eventuell auch Arginin-Methyltransferasen enthalten sind. Durch diese enzymatischen Aktivitäten liegt das Chromatin in einer offenen transkriptionell aktiven Form vor und das Zielgen wird exprimiert. In Abwesenheit des Liganden bzw. in Anwesenheit des Antagonisten interagiert ein Korepressorkomplex mit den NR. Histondeacetylasen entfernen die Acetylgruppe von den Lysin-Aminosäuren und dies bewirkt eine transkriptionell inaktive Chromatinstruktur. Chromatinmodifizierende und INHAT Komplexe unterstützen durch Öffnen oder Schließen oder durch Maskierung bestimmter Substrataminosäuren diesen Prozeß.

Die Tatsache, dass der Thyroidhormonrezeptor und der Retinsäurerezeptor (T<sub>3</sub>R und RAR) in Abwesenheit ihrer entsprechenden Liganden aktiv die Transkription durch übertragbare Repressionsdomänen reprimieren können (Baniahmad et al., 1992),

fürte zur Entdeckung zweier Proteine, die für eine effektive Genrepression durch diese Rezeptoren erforderlich sind (Abb. 1.4). Das 270 kDa Protein N-CoR (**n**uclear receptor **co**-repressor) wurde in einem Hefesceen mit der Ligandenbindungsdomäne des T<sub>3</sub>R identifiziert und ist mit dem T<sub>3</sub>R-RXR Heterodimer in Abwesenheit des Liganden assoziiert (Hörlein et al., 1995). Andere Arbeitsgruppen isolierten ein homologes Protein SMRT (**s**ilencing **m**ediator of **r**etinoic und **t**hyroid **h**ormone receptors) (Chen und Evans, 1995; Ordentlich et al., 1999; Park et al., 1999).

N-CoR und SMRT besitzen beide eine zweigeteilte Interaktionsdomäne (NID) in ihrem C-Terminus über die sie mit nukleären Hormonrezeptoren interagieren (Li et al., 1997a; Zamir et al., 1996). In der NID ist ein L-X-X-X-I-X-X-X-I/L Motiv enthalten, welches als CoRNR Box bezeichnet wird (Hu und Lazar, 1999; Nagy et al., 1999; Perissi et al., 1999). Das L-X-X-X-I-X-X-X-I/L Motiv ähnelt dem L-X-X-L-L Erkennungsmotiv von Koaktivatoren der nukleären Hormonrezeptoren (Heery et al., 1997; McNerney et al., 1998). Die ausgebildete  $\alpha$ -Helix des L-X-X-X-I-X-X-X-I/L Motivs ist um eine Helixwindung länger als die der Koaktivatoren. Die Präferenz der Bindung von SMRT an den Retinsäurerezeptor (RAR) und N-CoR an den Thyroidhormonrezeptor (T<sub>3</sub>R) beruht auf den flankierenden Sequenzen des L-X-X-X-I-X-X-X-I/L Motivs der Korepressoren (Hu et al., 2001). Zusätzlich interagiert der T<sub>3</sub>R über eine weitere Domäne mit N-CoR, aber nicht mit SMRT (Cohen et al., 2001). Die Korepressoren enthalten ferner drei unabhängige Repressionsdomänen (RI, RII, RIII); diese Domänen können aktiv eine heterologe DNA-Bindungsdomäne reprimieren (Chen und Evans, 1995; Hörlein et al., 1995; Ordentlich et al., 1999; Park et al., 1999).

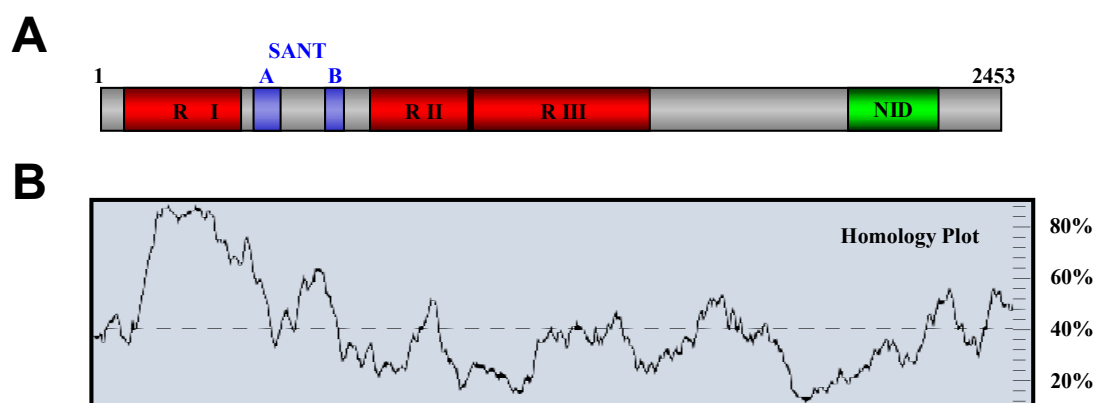


Abb. 1.4: Domänenstruktur von N-CoR und Homologie Plot zwischen N-CoR und SMRT

(A) N-CoR hat ein Molekulargewicht von 270 kDa. Der Korepressor enthält eine Interaktionsdomäne (NID) für nukleäre Hormonrezeptoren in seinem C-Terminus und drei autonome Repressionsdomänen (RI-RIII). Zwischen RI und RII sind zwei SANT-Domänen lokalisiert. (B) Bei den Korepressoren N-CoR und SMRT handelt es sich um homologe Proteine. Besonders der N-Terminus mit Repressionsdomäne I und SANT-Domänen ist stark konserviert. Im C-Terminus ist die Interaktionsdomäne der nukleären Hormonrezeptoren konserviert.

Weiterhin enthält der Korepressor N-CoR zwei SANT-Domänen, die zwischen Repressionsdomäne I und II lokalisiert sind (Aasland et al., 1996). Der Name der SANT-Domäne leitet sich von den vier Proteinen ab, in denen diese Domäne zuerst beschrieben wurde. Bei diesen Proteinen (SWI2, ADA2, N-CoR und TFIIB) handelt es sich um Transkriptionsfaktoren oder um chromatinassoziierte Proteine (Tab. 1.1). Die aus etwa 50 Aminosäuren bestehende SANT-Domänen werden in N-CoR von einer Linkerregion separiert, in deren Bereich sich ein coiled-coil Motiv befindet. Dieses Motiv ist ein häufiges Proteinfaltungs- und Aufbaumotiv, welches aus  $\alpha$ -Helices besteht, die umeinander gewunden sind und so ein Supercoilmotiv bilden. Die Sequenz des coiled-coils besteht aus sieben Wiederholungseinheiten, den Heptaden, die Polymer-ähnlich sind. Aufgrund der Homologie der SANT-Domäne zu der Myb-ähnlichen-Domäne wurde lange eine DNA-Bindung für die SANT-Domäne diskutiert (Aasland et al., 1996). Die Myb-ähnliche-Domäne ist verwandt mit der DNA-Bindungsdomäne der c-Myb Aktivatoren. Diese DNA-Bindungsdomäne besteht

<b>Funktion</b>	<b>Protein</b>	<b>SANT-Domänen</b>
<u>Repressor</u>	N-CoR	2
	SMRT	2
	CoREST	2
	Smrter	2
	MTA1,MTA2	1
<u>Chromatin Modifizierer</u>	Swi3	1
	ADA1,ADA2	1
	ISWI	1
	SNF2	1
<u>Transkriptions-faktoren</u>	TFIIB	1
	TTF1	2

**Tab.1.1: Aufstellung einiger SANT-Domänen enthaltender Proteine**

Die SANT-Domäne ist in 135 humanen Proteinen enthalten und damit vergleichbar häufig vorkommend in der Anzahl, wie die Chromodomäne (83 mal) oder die Bromodomäne (134 mal). SANT-Domänen enthaltende Proteine sind in die Transkription oder in die Chromatinmodifizierung involviert. Interessanterweise enthalten einige Proteine eine und manche bis zu vier SANT-Domänen. Sie kommen in Koaktivator- und Korepressor-komplexen vor.

typischerweise aus drei Tandemwiederholungen, wohingegen die Myb-ähnliche-Domäne meist nur eine oder zwei Kopien aufweist. Über zwei Myb/homeodomain-ähnliche Motive erfolgt Bindung von telomerischer DNA (Pflanze: TTTAGGG; Mensch: TTAGGG). Für N-CoR und viele andere Proteine, die SANT-Domänen enthalten konnte jedoch keine DNA-Bindung nachgewiesen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, daß die Enzymaktivität der Histondeacetylase 3 über die Bindung von SMRT und N-CoR, welche mittels einer Deacetylaseaktivierungs-

domäne (DAD) mit dem Enzym interagieren, reguliert wird (Guenther et al., 2001). Die volle DAD Funktion benötigt den N-terminalen Bereich der SANT1 Domäne, wohingegen die SANT2 Domäne für die Enzymaktivität und Bindung von HDAC3 überflüssig ist (Guenther et al., 2001; Zhang et al., 2002). Die SANT1 und SANT2 Domänen von N-CoR/SMRT besitzen lediglich 30% Übereinstimmung in der Aminosäureabfolge (Park et al., 1999; Tsai et al., 1999). Der Homologieplot der Korepressoren zeigt jedoch die hohe Homologie, die zwischen den beiden SANT1 Domänen von SMRT/N-CoR einerseits und den SANT2-Domänen von N-CoR und SMRT andererseits besteht (Abb. 1.4). Proteine, die SANT-Domänen enthalten, sind Komponenten verschiedener transkriptioneller und chromatinmodifizierender Komplexe (Tabelle 1.1). Für die SANT1-Domäne von CoREST konnte, ähnlich wie für die DAD von N-CoR/SMRT, gezeigt werden, dass eine Aktivierung der HDAC1 mit der SANT1-Domäne erfolgt (You et al., 2001). Das ADA2 Protein hingegen ist in dem chromatinmodifizierendem SAGA Komplex enthalten. Dieses SANT-Domänen Protein interagiert mit der Histonacetyltransferase Gcn5 und über die SANT-Domäne, mit Histonen und stimuliert die HAT-Aktivität des Proteins (Boyer et al., 2002). Die Funktion der SANT-Domäne, sowie der Unterschied zwischen den einfach und doppelt auftretenden SANT-Domänen der Koaktivatoren und Korepressoren ist bisher noch nicht ausreichend geklärt.

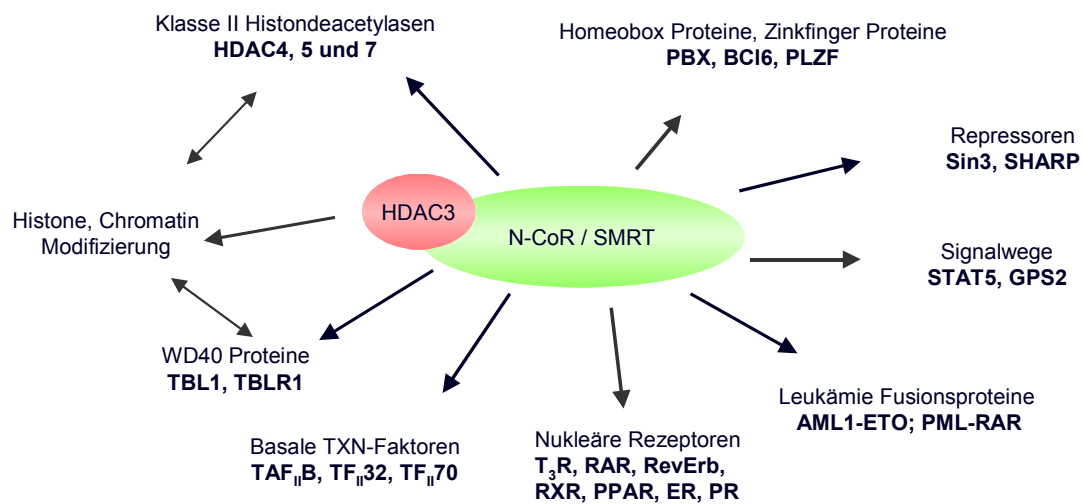
### **1.3 Interaktionen der Korepressoren N-CoR / SMRT**

N-CoR und SMRT fungieren als Korepressoren für verschiedene Mitglieder der Superfamilie der Nukleären Hormonrezeptoren. Die Rolle der Korepressoren in der Repression der T<sub>3</sub>R-RXR und RAR-RXR Heterodimere in Abwesenheit ihrer Liganden wurde zuerst publiziert (Chen und Evans, 1995; Hörlein et al., 1995; Zamir et al., 1996). N-CoR/SMRT interagieren ebenfalls mit v-ErbA, RevErb, COUP, PPAR $\alpha$  und PPAR $\delta$  und DAX1 (Busch et al., 2000; Chen und Evans, 1995; Crawford et al., 1998; Dowell et al., 1999; Shibata et al., 1997; Zamir et al., 1996). Steroidhormonrezeptoren scheinen in Abwesenheit des Liganden nicht mit N-CoR und SMRT zu interagieren (Chen und Evans, 1995; Hörlein et al., 1995). Der Östrogenrezeptor (ER), der Glukokortikoidrezeptor (GR) und der Progesteronrezeptor (PR) interagieren mit den Korepressoren in Gegenwart von Antagonisten und reprimieren so die Transkription (Jackson et al., 1997; Lavinsky et al., 1998; Smith et al., 1997; Xu et al., 1996, Schulz et al., 2002). In Chromatinimmunopräzipitations (ChIP) Tests waren N-CoR und SMRT auf dem Promotor des Östrogenregulators



Cathepsin D und dem pS2 Promotor in Gegenwart des Antagonisten Tamoxifen anwesend, aber nicht in Gegenwart von Estrogen (Shang et al., 2000).

Abhängig von der Reinigungsstrategie wurden verschiedene Histondeacetylasen, beispielsweise HDAC1, HDAC2 und HDAC3, in N-CoR und SMRT Komplexen identifiziert (Guenther et al., 2001; Jones et al., 2001; Li et al., 2000; Underhill et al., 2000; Wen et al., 2000). Manche beschriebene N-CoR Komplexe enthalten Faktoren, die in dem SAP-Komplex (**Sin-associated protein**) enthalten sind, wie HDAC1, HDAC2 und mSin3 (Heinzel et al., 1997; Zhang et al., 1997; Zhang et al., 1998c). HDAC1 und HDAC2 sind neben dem SAP-Komplex (Zhang et al., 1997; Zhang et al., 1998c) auch in dem NURD (**nucleosome remodeling und histone deacetylation**) Komplex enthalten (Tong et al., 1998; Xue et al., 1998; Zhang et al., 1998b; Zhang et al., 1999). In beiden Komplexen sind die Rb-assoziierten Proteine (**retinoblastoma protein**) RbAp-46 und RbAp-48 vorhanden sowie jeweils komplexspezifische Faktoren. Der NURD Komplex enthält beispielsweise noch MTA2, die ATPase Mi-2, und MBD2 (**methyl-CpG-binding domain protein**) und/oder MBD3 (Humphrey et al., 2001). Die HDACs sind mit verschiedenen Faktoren assoziiert, und diese Zusammensetzung resultiert in einer unterschiedlichen Funktion. HDAC1 und HDAC2 sind ebenfalls als Teil des CoREST Komplexes identifiziert worden (Humphrey et al., 2001; You et al., 2001). Weiterhin konnten



**Abb. 1.5: In der Literatur beschriebene Interaktionen mit dem N-CoR-HDAC3 Komplex**

Der N-CoR-HDAC3 Komplex interagiert mit einer Fülle von Proteinen. Zu diesen zählen unter anderem Nukleäre Hormonrezeptoren, basale Transkriptionsfaktoren, Histondeacetylasen, Homeoboxproteine, Leukämie-Fusionsproteine und andere Repressoren. Ferner besteht eine Verbindung zu Signaltransduktionswegen und chromatinmodifizierenden Komplexen.

verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die Repressionsdomäne III von N-CoR und SMRT direkt mit HDAC4, HDAC5 und HDAC7 interagiert (Huang et al., 2000; Kao

et al., 2000). Eine biochemische Reinigung über N-CoR oder HDAC3 Antikörper ergab weitere unterschiedlich zusammengesetzte Komplexe, die HDAC3, N-CoR oder SMRT und TBL1 (transducin (beta)-like Protein) enthielten (Guenther et al., 2000; Li et al., 2000; Underhill et al., 2000; Wen et al., 2000). TBL1 enthält sechs WD-40 Motivwiederholungen (Bassi et al., 1999). Dieses Motiv ist ebenfalls in den Hefe Korepressoren Tup1 und Groucho enthalten und homolog zu dem *Drosophila* Protein ebi, welches in die Signalübertragung des epidermalen Wachstums Faktorrezeptors (EGF-Rezeptor) involviert ist (Dong et al., 1999). Unter bestimmten Bedingungen existiert ebenfalls ein N-CoR-SMRT-HDAC3 Komplex, der das Krab-assoziierte-Protein (KAP-1) enthält (Underhill et al., 2000).

N-CoR und SMRT agieren aber auch als Korepressoren für unterschiedliche, nicht mit den nukleären Hormonrezeptoren verwandte Proteine, die in die unterschiedlichsten zellulären Prozesse involviert sind (Abb. 1.5). SMRT interagiert beispielsweise mit dem SR-Faktor (serum response factors), dem Aktivator Protein-1 (AP-1) und dem nukleären Faktor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). Diese Transkriptionsfaktoren übernehmen Aufgaben in der Stimulierung der Zellproliferation (Lee et al., 2000). N-CoR und SMRT beeinflussen ferner die Transkription der evolutionär verwandten POU-Homeodomänenfaktoren Pit-1 und Oct1 (Kakizawa et al., 2001; Xu et al., 1998). Diese Transkriptionsfaktoren übernehmen bedeutende Rollen in der embryonalen Entwicklung. Ferner interagieren die Repressoren mit dem Homeobox Protein PBX (Asahara et al., 1999; Shanmugam et al., 1999), welches ein bedeutender Faktor bei der Segmentierung ist. Eine Interaktion konnte ebenfalls zu dem BCL-6 Protein, einem POZ/Zinkfinger Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden. Dieser Faktor zeigt eine mögliche Rolle der Korepressoren in der Apoptose auf (Dhordain et al., 1998; Huynh und Bardwell, 1998; Wong und Privalsky, 1998). Das bHLH Protein MAD, MyoD und das HES verwandte Repressorprotein (HERPs) (Bailey et al., 1999; Heinzl et al., 1997; Iso et al., 2001) liegen ebenfalls im Komplex mit N-CoR/SMRT vor. Hier unterdrücken die Repressoren die Proliferation oder induzieren die terminale Differenzierung. Das Notch-aktivierte Adaptorprotein Su(H)/RBP-J/CBF1 beeinflusst die Differenzierung, Proliferation und Apoptose in vielen Entwicklungssystemen und interagiert ebenfalls mit N-CoR und SMRT (Kao et al., 1998). Für SMRT konnte ebenfalls die Interaktion mit STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5), welches eine zentrale Rolle im Cytokinsignalweg spielt, gezeigt werden (Maurer et al., 2002; Nakajima et al., 2001).

## 1.4 Regulation der Korepressoren N-CoR/SMRT

Die Funktion eines Proteins kann durch Veränderung der Konformation, der Lokalisation oder durch Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst werden. Ein weiterer effektiver Weg ist die Veränderung des Proteins nach seiner Synthese durch kovalente Modifikationen. Beispielsweise bewirkt die Polyubiquitinierung die proteosomale Degradation eines Proteins (Hochstrasser, 2000). N-CoR und SMRT scheinen durch verschiedene Mechanismen reguliert zu werden. Der N-Terminus von N-CoR interagiert mit mSiah2, einem Säugerhomolog des *Drosophila* Proteins Seven in absentia (Zhang et al., 1998a). mSiah2 ist in die proteosomale Degradation von Proteinen involviert (Hu et al., 1997; Li et al., 1997b; Tang et al., 1997). Kotransfektion von N-CoR und mSiah2 in neuronalen Zellen resultiert demnach in einer starken Verminderung der N-CoR Konzentration in der Zelle, ein Effekt, der in Gegenwart eines proteasomalen Inhibitors nicht auftritt (Zhang et al., 1998a).

Die Regulierung der Korepressoren kann ebenfalls durch die Assoziation mit anderen Repressoren erfolgen, um neue Korepressorkomplexe auszubilden. Mitglieder der Ski Protoonkogenfamilie, welche die Ski und Sno Proteine umfassen, bilden Komplexe mit N-CoR, SMRT, HDACs und mSin3 und regulieren die Repression der Transkription durch MAD und T<sub>3</sub>R $\beta$  (Nomura et al., 1999). Ein Korepressorkomplex der N-CoR und Ski oder Sno enthält, wurde als ein negativer Regulator des TGF $\beta$  Signalweges beschrieben (Luo et al., 1999; Stroschein et al., 1999). Ski oder Sno bilden mit N-CoR und den SMAD Proteinen Komplexe, die so die TGF $\beta$ -aktivierte Transkription reprimieren (Luo et al., 1999; Moustakas et al., 2001; Stroschein et al., 1999). SMRT interagiert ebenfalls mit dem transkriptionellen Repressor SHARP (SMRT/HDAC1 associated repressor protein) (Shi et al., 2001). Dieses Protein bindet den RNA Koaktivator SRA der Steroidrezeptoren und supprimiert die Aktivität der SRA-aktivierten Steroidrezeptor Transkription. Möglicherweise könnte SMRT so die Transkription eines Rezeptors in Anwesenheit des entsprechenden Liganden beeinflussen (Shi et al., 2001).

Im Fall der Regulation von nukleären Hormonrezeptoren wird die Assoziation von N-CoR und SMRT durch die Hormonbindung kontrolliert. Signaltransduktionsereignisse regulieren ebenfalls die Assoziation der Korepressoren mit den Rezeptoren. Werden MCF-7 oder HeLa Zellen mit Forskolin oder mit EGF (epidermal growth factor) behandelt, resultiert dies in Anwesenheit von Tamoxifen in einer verminderten Assoziation der Korepressoren mit dem Östrogenrezeptor (Lavinsky et al., 1998). Forskolin stimuliert den den PKA (protein kinase A) und EGF den ERK Mitogen-aktivierten Protein (Map) Kinase und PKC (protein kinase C) Weg. In

Mikroinjektionsversuchen konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass die Behandlung mit Forskolin oder EGF unter transkriptionellen Gesichtspunkten den Antagonisten Tamoxifen zu einem Agonisten der ER-Regulation konvertiert (Lavinsky et al., 1998). Davis und Koautoren konnten zeigen, dass die Aktivierung des ERK MAP Kinasewegs durch Thyroxin ( $T_4$ ) in einer Serin-Phosphorylierung des  $T_3R\beta 1$ -Rezeptores resultiert und dies zur Dissoziation von SMRT in einer Hormon-unabhängigen Weise führt (Davis et al., 2000).

SMRT wird seinerseits durch die MAP Kinase Kinase MEK-1 und MEK-1 Kinase (MEKK-1) phosphoryliert. Diese Modifikation von SMRT inhibiert die Interaktion zwischen SMRT und dem Thyroidhormonrezeptor sowie dem PLZF Protein (**p**romyelocytic leukemia zinc finger) (Hong und Privalsky, 2000). Im Gegensatz dazu stabilisiert die Phosphorylierung von SMRT durch CK2 (Casein Kinase II), die SMRT-Rezeptor Interaktion (Zhou und Hayward, 2001). Signaltransduktionswege haben neben dem direkten Einfluss auf die Protein-Protein Interaktion auch einen Einfluss auf die Lokalisation und Verteilung der Korepressoren N-CoR und SMRT in der Zelle. Die Phosphorylierung der NF $\kappa$ B p65 Untereinheit durch CamKIV (**cal**modulin-dependent **kinase IV**) resultiert in einem Austausch des Korepressors SMRT durch die Histonacetyltransferase CBP im Komplex und einer Translokation von SMRT in das Zytoplasma (Jang et al., 2001). MEK-1 und MEKK-1 Phosphorylierung von SMRT im Nukleus führen ebenfalls zu einer Verlagerung von SMRT in den Perinukleus oder das Zytoplasma (Hong und Privalsky, 2000). Die Korepressoren bringen beim Pendeln zwischen Zytoplasma und dem Nukleus selbst assoziierte Proteine mit. Dies trifft für das Protein Su(H)/RBP-J/CBF1 und verschiedene Histondeacetylasen zu (Wu et al., 2001).

## **1.5 N-CoR/SMRT in der Embryonalentwicklung und in Krankheiten**

Die Studien von Jepsen und Mitarbeiter mit N-CoR Knockoutmäusen zeigten eine fundamentale Rolle des Korepressors N-CoR in der Embryonalentwicklung auf (Jepsen et al., 2000). Die N-CoR Knockoutmäuse starben in der mittleren Phase der Embryonalentwicklung und zeigten Defekte in der Reifung von Erythrozyten, Thymozyten und in der Entwicklung verschiedener neuraler Strukturen. Die Blockade in der korrekten Bildung der Erythroid Blast-Forming Unit (BFU-E) liegt möglicherweise an einer gestörten Regulation des Thyroidhormonrezeptors. Untersuchungen der onkogenen Form von  $T_3R$ , des v-ErbA Rezeptors, unterstützten diese Vermutung. v-ErbA kann im Vergleich zu  $T_3R$  kein Hormon mehr binden (Munoz et al., 1988; Sap et al., 1986) und wirkt deshalb als ein konstitutiver

Transkriptionsrepressor (Damm et al., 1989). v-ErbA induziert ferner Erythroleukämie und Fibrosarcome in Hühnern und kann erythroide Zellen und Fibroblasten in Zellkultur transformieren (Gambacorta et al., 1996). Die konstitutive Repression der v-ErbA Zielgene erfolgt durch die Rekrutierung von N-CoR und HDACs und ist die Ursache für die Transformation in AEV-(Avian Erythroblastoses Virus) induzierter Leukämie (Busch et al., 2000; Ciana et al., 1998). N-CoR<sup>-/-</sup> Erythroblasten besitzen einen erhöhten Level des v-ErbA Zielgenes CAII (carbonic anhydrase II). Diese Tatsache läßt vermuten, dass N-CoR in Abwesenheit des Liganden für den T<sub>3</sub>R absolut essentiell ist und für die korrekte Entwicklung der Erythroblasten benötigt wird. Feng und Koautoren setzten eine N-CoR Mutante zur Klärung der biologischen Rolle der Korepressors ein, die eine Deletion der N-terminalen Repressionsdomäne besaß, aber noch die Rezeptorinteraktionsdomäne enthielt (Feng et al., 2001). Transgene Mäuse, die dieses dominant-negative N-CoR Protein in Hepatocyten exprimierten, zeigten eine erhöhte Proliferation der Hepatocyten und eine Herabsetzung der Thyroidhormon-vermittelten Transkription regulierter Zielgene (Feng et al., 2001).

Verschiedene Krankheiten sind auf molekulare Defekte zurückzuführen, an denen die Repressoren N-CoR und SMRT beteiligt sind. Die RTH (resistance to thyroid hormone) ist beispielsweise eine genetische Krankheit, die sich in einer verminderten Antwort auf Thyroidhormon äußert. Molekularbiologisch liegt ein mutierter T<sub>3</sub>R-β in der Zelle vor, der eine starke Interaktion mit N-CoR/SMRT eingeht. Die Korepressoren dissoziieren auch in Gegenwart des spezifischen Ligandens nicht mehr von dem mutierten Rezeptor (Kopp et al., 1996; Safer et al., 1998; Yoh et al., 1997). Ein Zusammenhang zwischen dem Korepressors N-CoR und dem Nervensystem wurde von Boutell und Koautoren beschrieben (Boutell et al., 1999). Die Autoren fanden heraus, dass der C-Terminus von N-CoR mit dem N-Terminus des Huntington Genprodukts, Huntingtin, interagiert. In Gehirnzellen von an Huntingtons verstorbenen Patienten ist N-CoR ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, wohingegen die Verteilung des Proteins in normalen Gehirnzellen sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär ist. Die Lokalisation des Korepressors N-CoR scheint daher in der Pathologie dieser Krankheit involviert zu sein.

Die Korepressoren N-CoR und SMRT spielen ebenfalls eine Rolle in verschiedenen Leukämien. APL (Acute promyelocytic leukemia) führt zu einem Reifungsstopp der myeloiden Entwicklung. Diese Krankheit entsteht durch die Fusion des RAR-α Rezeptors mit dem PML Gen (promyelocytic leukemia) oder dem PLZF Gen (Lin et al., 1999). Die aus der Translokation resultierenden Fusionsproteine sind beide in der Lage mit N-CoR oder SMRT zu interagieren (Hong et al., 1997). Im Fall von PLZF-

RAR ist die Interaktion so stark, dass selbst durch Zugabe des Liganden Retinsäure und eines Histondeacetylaseinhibitors keine therapeutische Wirkung auf die Leukämie erzielt wird. N-CoR und SMRT sind ebenfalls an der AML (**a**cute **m**yeloid **l**eukemias) Leukämie beteiligt. 12-15 % aller AMLs entstehen durch eine t (8;21) Translokation zwischen den Genen AML1 und ETO. N-CoR oder SMRT interagieren sowohl mit ETO als auch mit dem AML1-ETO Fusionsprotein. Das Protein AML1 reguliert verschiedene Gene, die für eine normale Hämatopoiese kritisch sind. Das Fusionsprotein hingegen reprimiert die Transkription dieser Gene. In Zellen in denen das Fusionsprotein AML1-ETO exprimiert ist, kommt es daher zu einem Verlust der Repression spezifischer hämatopoietischer Gene und als Folge zur Inhibition der Differenzierung hämatopoietischer Vorläuferzellen (Gelmetti et al., 1998; Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998). In ETO wurde eine 196 Aminosäuren umfassende Domäne identifiziert, die die NHR2-Domäne und die daran angrenzenden C- und N-terminal gelegenen Bereiche beinhaltet. Diese sogenannte CRD-Domäne (Core repressor domain) bindet an mSin3A und vermittelt transkriptionelle Repression unabhängig von N-CoR. ETO-Konstrukte, denen bestimmte strukturelle Elemente der CRD-Domäne fehlten, bildeten Komplexe mit niedrigerem Molekulargewicht aus. Die aus der Strukturfunktionsanalyse gewonnenen Daten ließen daraufschließen, dass es sich bei ETO um ein Protein mit modulartigem Aufbau handelt, wobei mehrere Regionen miteinander kooperieren, um maximale transkriptionelle Repression zu induzieren (Hildebrand et al., 2001). Als dritte Klasse von Leukämien, in der die Korepressoren SMRT, mSin3A und HDAC3 eine Rolle spielen, ist die aus der chromosomalen Translokation des TEL Gens (E26-transforming specific (ETS)-related) entstehende Leukämie zu nennen. Das TEL Protein kodiert einen starken Repressor (Chakrabarti und Nucifora, 1999; Wang und Hiebert, 2001). Zusammenfassend läßt sich sagen, dass der molekularen Wirkung der Korepressoren N-CoR und SMRT in Leukämien die Rekrutierung von Histondeacetylase zugrunde liegt. Dies führt zu einem Differenzierungsblock hämatopoietischer Zellen und zu unkontrolliertem Wachstum resultierend in der Entstehung der beschriebenen Krankheitsbilder.

## **1.6 Das SUMO Protein**

Neben der Transkription wird auch die Funktion von Proteinen durch verschiedene posttranslationale Modifikationen in der Zelle gesteuert. Die Konzentration eines Proteins in der Zelle wird durch die Kontrolle der Expression, der Aktivität, der Lokalisation und der Interaktion durch konstitutive oder reversible Modifikationen beeinflusst. Bei diesen handelt es um teilweise schon beschriebene Modifikationen, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, ADP Ribosylierung,

Carboxylierung, Adenylierung und Glykosylierung oder Prenylierung von Aminosäureseitenketten. Weiterhin gehören die Ubiquitinierung und Sumoylierung zu diesen posttranslationalen Modifikationen. Die Ubiquitinierung ist in die Proteindegradation durch das 26S Proteasom involviert. Bei der Ubiquitinierung wird enzymatisch eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus des 9 kDa Polypeptides Ubiquitin und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins des Akzeptorproteins hergestellt. Die Reaktion ist reversibel und kann durch Deubiquitinierung (Isopeptidasen) wieder umgekehrt werden. (Bonifacino und Weissman, 1998). Beispielsweise kann mit dem HDAC Inhibitor Valproinsäure (VPA), neben der Hemmung der katalytischen Aktivität von Klasse I HDACs, die proteosomale Degradation der HDAC2 induziert werden [Krämer, 2003 #1337]. Eine Anzahl Ubiquitin-verwandter Proteine wurde identifiziert. Diese können in zwei Klassen zusammengefaßt werden. Erstens Proteine, die nicht konjugiert werden können (Rad23, Dsk2p, Elongin B) und zweitens solche, die wie Ubiquitin auf Akzeptorproteine übertragen werden. Zu dieser zweiten Gruppe gehören die Interferon-induzierbaren Ubiquitin querreaktiven Proteine UCRP/ISG15, das Nedd8 Protein und SUMO1 (**S**mall **u**biquitin-related **m**odifier), welche 36, 57 und 18% Homologie zur Aminosäuresequenz von Ubiquitin aufweisen. SUMO besitzt demnach nur eine geringe Sequenzhomologie zu dem Ubiquitinprotein, ist aber strukturell mit Ubiquitin verwandt. NMR-Strukturanalysen ergaben, dass SUMO1 die charakteristische  $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta$  Ubiquitinfaltung enthält und in der dreidimensionalen Faltung mit Ubiquitin übereinstimmt (Bayer et al., 1998). Das GlyGly Motiv am C-Terminus beider Proteine, die Stelle der Verknüpfung zwischen SUMO und Akzeptorprotein ist ebenfalls strukturell bei beiden Proteinen gleich exponiert. Beide Proteine haben ferner annähernd das gleiche Molekulargewicht (11 und 9 kDa), und beide werden über eine Peptidbindung mit einer Lysin Aminosäure ihres Zielproteinens verknüpft. In Säugern existieren drei SUMO-Familienmitglieder, SUMO-1/Smt3C, SUMO-2/Smt3A und SUMO-3/Smt3B (Melchior, 2000; Muller et al., 2001). Wie für die Ubiquitinierung konnte man für SUMO-2 und SUMO-3 neben der Monosumoylierung auch Polysumoylierung feststellen (Saitoh und Hinchev, 2000; Tatham et al., 2001). Mit der Entdeckung der Akzeptoren RanGAP1 für SUMO1 (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996) und Cdc53 für Nedd8/Rub1 (Lammer et al., 1998; Liakopoulos et al., 1998) wurde klar, dass es sich bei den Ubiquitin verwandten Modulatoren nicht um Varianten von Ubiquitin handelt, sondern dass diese in der Zelle andere Aufgaben, als die der Proteindegradation übernehmen.

## 1.7 Der SUMO-Konjugationsweg

Der SUMO-Konjugationsweg ist analog zu der Ubiquitinierungsreaktion, allerdings sind SUMO-spezifische Proteine bei der Sumoylierungsreaktion involviert (Verger et al., 2003). Wie Ubiquitin wird SUMO erst als Vorläuferprotein exprimiert und muß vor der Reaktion proteolytisch durch C-terminale Hydrolasen prozessiert werden (Abb. 1.6). Das C-terminale Gly-Gly Motiv wird so für die Konjugationreaktion frei. Das so entstandene SUMO Protein wird dann in einer ATP-abhängigen Reaktion durch die E1-Enzyme AOS1-UBA2 aktiviert. Anschließend wird das aktivierte SUMO Protein auf das E2-Konjugations-Enzym übertragen. Im Gegensatz zur Ubiquitinierungsreaktion existiert für den SUMO Konjugationsweg nur das Ubc9 Protein als einziges E2-Enzym. Als letzter Schritt unterstützen oder ermöglichen E3-Ligations-Enzyme die Übertragung von SUMO auf ein Akzeptorprotein. Drei SUMO-E3-Ligase Klassen sind bekannt. Klasse I setzt sich aus den Hefeproteinen Siz1 und Siz2 und verschiedenen verwandten Mitgliedern der PIAS Protein Familie (**p**rotein **i**nhibitor of **a**ctivated **S**TAT) zusammen (Johnson und Gupta, 2001; Kahyo et al., 2001; Sachdev et al., 2001). Diese Proteine enthalten eine RING-ähnliche Domäne, die der RING-Fingerdomäne der Ubiquitin-E3-Ligasen ähnelt. Die zweite Klasse besteht lediglich aus RanBP2/Nup358, einer Proteinkomponente des

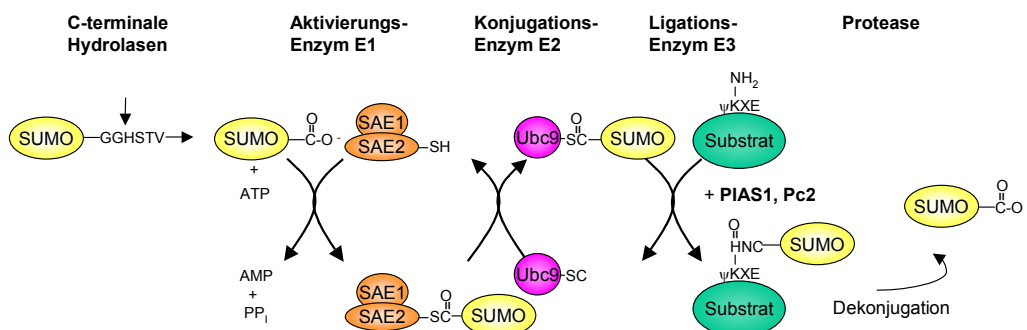


Abb. 1.6: SUMO-Übertragungsreaktionsweg

SUMO wird als Vorläuferprotein synthetisiert und durch Hydrolasen prozessiert, um das carboxyterminale Doppelgycinmotiv für die Konjugation freizulegen. Anschließend wird es dann durch die E1-Aktivierungsenzyme (SAE1(AOS1)/SAE2(UBA2)) aktiviert, durch das Ubc9 und E3-Ligations-Enzym auf das Substratprotein übertragen. Die resultierende Isopeptidbindung ist stabil und muß durch entsprechende Enzyme gespalten werden (verändert nach Verger et al., 2003).

nukleären Kernporenkomplexes. RanBP2 interagiert über spezifische Domänen mit RanGTP und RanGDP. Das Protein weist jedoch keine Homologie zu anderen E3-Ligasen auf. Das Polycomb Protein Pc2 wurde als letzte SUMO-E3-Ligase identifiziert und bildet eine dritte Klasse. Pc2 interagiert mit dem transkriptionellen Repressor CtBP Protein (**C**-terminal **b**inding **p**rotein) und dem Ubc9 Protein. In

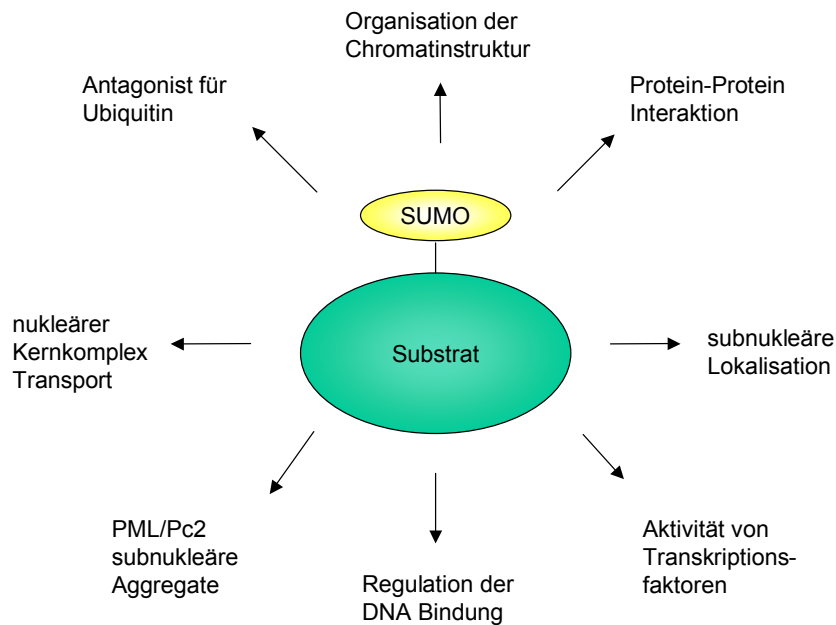


nukleären Polycomb-Aggregaten stimuliert Pc2 die Sumoylierung des CtBP (Kagey et al., 2003). Die E3-Ligations-Enzyme erhöhen möglicherweise die Affinität zwischen Ubc9 und dem Substrat und bringen diese so in eine optimale strukturelle Position für die Sumoylierungsreaktion. Für die Sumoylierung konnte eine Konsensussequenz ( $\Psi$ -K-X-E) in Substratproteinen ermittelt werden. Hierbei steht ( $\psi$ ) für eine hydrophobe Aminosäure, (K) für Lysin, (X) für eine beliebige Aminosäure und (E) für Glutaminsäure. Die Konsensussequenz ist allerdings nicht hoch konserviert, da neben einer Glutaminsäure an Position 4 auch eine Asparaginsäure möglich ist. Die Asparaginsäure tritt aber in der Sequenz bekannter SUMO-Stellen deutlich seltener auf. Zusätzlich enthalten viele Substratproteine zwei bis fünf Aminosäuren aufwärts oder abwärts des Lysins, ein oder mehrere Proline oder Glycine.

## **1.8 Funktion der SUMO-Modifikation**

Die SUMO-Modifikation wurde für eine große Anzahl von Proteinen in verschiedenen Signalwegen beschrieben (Abb. 1.7). Es erstaunt daher nicht, dass SUMO im Zusammenhang mit der Regulierung von Protein-Protein-Interaktionen (Matunis et al., 1998), subzellulärer bzw nukleärer Lokalisationen von Proteinen (Pichler und Melchior, 2002; Seeler und Dejean, 2001), von Protein-DNA Interaktion (Goodson et al., 2001; Hong et al., 2001), und der Regulierung der enzymatischen Aktivität (Hardeland et al., 2002) gesehen wurde. Ferner kann SUMO als Antagonist der Ubiquitinierung wirken (Desterro et al., 1998; Hoege et al., 2002).

Die bis jetzt beschriebenen SUMO-Zielproteine gehören zu verschiedenen Proteinkategorien wie Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionsfaktoren, Enzymen oder virale Proteinen. Dennoch besteht ein direkter Zusammenhang der Proteinsumoylierung mit der Genregulation. Mutationen in der Sumoylierungsstelle von Aktivatoren verstärken deren transkriptionelle Aktivität (Abdel-Hafiz et al., 2002; Bies et al., 2002; Eloranta und Hurst, 2002; Muller et al., 2000; Nishida und Yasuda, 2002; Poukka et al., 2000; Ross et al., 2002; Sapetschnig et al., 2002). Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass SUMO als negativer Regulator der Transaktivationsdomäne fungieren könnte. Die Überexpression von SUMO1 unterdrückt beispielsweise spezifisch die AP2 und AP2-vermittelte Transkription über den Koaktivator CBP (CREB-binding protein)/p300 (Eloranta und Hurst, 2002). Ferner wird die Androgenrezeptor vermittelte Transkription in Abhängigkeit von der Expression von SUMO1 und der E3 RING-Finger-ähnlichen-Domäne von PIAS1 und PIAS $\alpha$  reprimiert (Nishida und Yasuda, 2002). Diese Beobachtung trifft jedoch nicht



**Abb. 1.7: Funktionen von SUMO**

Die Funktion der Protein-Sumoylierung ist noch nicht vollständig geklärt. Die Fülle von Substratproteinen haben unterschiedliche funktionelle Rollen der SUMO-Modifikation aufgezeigt (verändert nach Verger et al., 2003).

für alle Proteine zu, da die Aktivität von p53 und LEF-1 nicht durch Sumoylierung beeinflusst zu sein scheint (Sachdev et al., 2001; Schmidt und Muller, 2002). Mutationsexperimente zeigten, dass das Lysin oder die Glutaminsäure im Elk-1 Protein essentiell für die Repression ist (Snowden et al., 2000; Yang et al., 2002). Die Bindung entweder von SUMO oder Ubc9 ist für diesen Effekt ausschlaggebend. Die transkriptionelle CRD1 Repressionsdomäne von p300 unterliegt ebenfalls einer SUMO-Modifikation. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die SUMO-Modifikation für die Interaktion zwischen HDAC6 und p300 elementar ist. Die durch p300 vermittelte Repression konnte durch Zugabe einer SUMO-spezifischen Protease oder durch die heterologe Expression einer katalytisch inaktiven SUMO-E2-Konjugase (Ubc9) aufgehoben werden (Girdwood et al., 2003). SUMO-Modifikation von CtBP1 bewirkt eine Lokalisationsänderung zwischen Nukleus und Zytoplasma. Darüberhinaus zeigte CtBP1, mit einer mutierten SUMO-Konsensussequenz, eine verminderte Repression der E-Cadherin Promotoraktivität (Lin et al., 2003). Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass für die Sumoylierung am häufigsten negative Effekte in der Transkription beobachtet wurden.

## 1.9 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Studien mit N-CoR Knockoutmäusen zeigten, dass der Korepressor N-CoR für die Embryonalentwicklung essentiell ist. Der Korepressor ist darüberhinaus an der kurzzeitigen Repression von nukleären Hormonrezeptoren (Hörlein et al., 1995) oder der langfristigen Repression durch REST/NRSF involviert (Jepsen et al., 2000). Verschiedene Krankheiten, die auf molekulare Defekte zurückzuführen sind, werden ebenfalls durch N-CoR beeinflusst. N-CoR liegt in der Zelle in verschiedenen Proteinkomplexen vor, in denen unter anderem Histondeacetylasen (HDACs) enthalten sind. Eine direkte Wechselwirkung des Korepressors N-CoR mit Chromatin, bzw. Histonen war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Der Korepressor N-CoR enthält zwei weitgehend uncharakterisierte SANT-Domänen. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Interaktionspartnern der N-CoR SANT-Domänen und deren anschließende Charakterisierung im Korepressorkomplex. Hierfür sollte zunächst untersucht werden, ob die N-CoR SANT-Domänen an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind. Darauf aufbauend, sollte mit einem geeigneten Screen (Far-Western Hybridisierung oder Hefe-Zwei-Hybrid) eine Expressionsdatenbank mit den N-CoR SANT-Domänen untersucht werden. Potentielle Interaktionspartner sollten mit *in vitro* und *in vivo* Methoden auf die Assoziation des Korepressors N-CoR getestet werden. In Repressionstests sollte ferner überprüft werden, inwiefern die Interaktion mit N-CoR oder eine Modifikation des Korepressors die Repression beeinflusst. Die SANT-Domänen von N-CoR wurden ebenfalls im Zusammenhang der Histoncodehypothese betrachtet. In Bindungsstudien sollte eine mögliche Interaktion der N-CoR SANT-Domänen mit Histonen untersucht werden. Die enzymatische Aktivität rekombinanter HDACs wurde ebenfalls unter dem Gesichtspunkt der Histonbindung der N-CoR SANT-Domäne experimentell untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Materialien

β-Mercaptoethanol	Sigma, Karlsruhe
Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose (Electrophoresis Grade)	LifeTech., USA
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
APS (Ammoniumpersulfat) 10% in H <sub>2</sub> O	Sigma, Steinheim
Bradford-Reagenz	BIO-RAD, München
Bromphenolblau	Fluka, Buchs (CH)
DOPA (drop out agar, für Hefe)	BIO 101/ CA, USA
CSM/SD (synthetic minimal medium, für Hefe)	BIO 101/ CA, USA
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Steinheim
ECL-Lösung 1 + 2	AmershamPharmacia
EDTA (Ethylen Diamin Tetra Acetat)	Sigma, Steinheim
EtOH (Ethanol)	Roth, Karlsruhe
Ethidium Bromid	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glutathion-Agarose	Sigma, Steinheim
H <sub>2</sub> O	Milli-Q gereinigt und autoklaviert
IPTG (Isopropylthio-beta-D-galactoside)	Roth, Karlsruhe
KCl (Kaliumchlorid)	Roth, Karlsruhe
Li-Ac (Lithium Acetat)	Sigma, Steinheim
MgCl (Magnesiumchlorid)	Fluka, Buchs (CH)
Milchpulver	Ja, Köln
NaCl (Natriumchlorid)	Roth, Karlsruhe
NaOH (Natronlauge)	AppliChem, Darmstadt
PAA (Polyacrylamid) 30% Acrylamid / 1% Bisacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
PEG 4000 (Polyethylenglykol)	AppliChem, Darmstadt
Protease-Inhibitor Mix (COMPLETE)	Roche, Mannheim
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
SDS (Sodium-Dodecyl-Phosphat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Thiamin	Sigma, Steinheim
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton-X 100	Fluka, Buchs (CH)
Tween 20	PharmaciaBiotech, Schweden
Trichostatin A (TSA)	Sigma
YPD (Vollmedium für Hefe)	BIO 101/ CA, USA
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β- D-Galactopyranosid)	Sigma, Steinheim
BenchMark prestained protein ladder	Life Technologies
Smartladder	Eurogentec

Enzyme und Puffer für die Molekularbiologie wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach) oder MBI bezogen. Weitere Grundchemikalien stammten von den Firmen Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg). Affinitätsmedien wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Sigma oder Invitrogen (NV Leek, Niederlande) bezogen. Plastikwaren und Filtersysteme für das Labor und die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Schleicher & Schuell (Dassel), Becton Dickinson (Heidelberg) oder Nalgene (Rochester, NY, USA) geliefert. Zellkulturmedien, Glutamin, Trypsin/EDTA-Lösungen und Antibiotika für die Zellkultur wurden von Serva bezogen, fötales Kälberserum von Biowhittaker (Verviers, Belgien). Bestandteile von Nährmedien zur Anzucht von Hefen wurden bei BIO101 gekauft.

Falls nicht anders vermerkt, wurden gängige Methoden sowie die Rezepte für Puffer aus Sambrook et. al., 1989 oder dem Buch „Short protocols in Molecular biology“ Ausubel et. al., 1995, entnommen. Etwaige Modifikationen sind an entsprechender Stelle vermerkt.

## 2.1.1 Radioaktive Reagenzien

[ <sup>35</sup> S]Methionin (>1.000 Ci/mmol; 10 mCi/ml)	Amersham Pharmacia Biotech
[γ- <sup>32</sup> P]ATP (>150 mCi/ml)	Amersham Pharmacia Biotech
[ <sup>3</sup> H] Na-Acetat (25 mCi)	NEN Life Science

## 2.2 Plasmide

### 2.2.1 Hefe-Expressionsvektoren

Name	Insert	Referenz
pACT2	Murine embryonale Tag 17 cDNA Expressionsbank	Matchmaker Yeast-Two-Hybrid Sytem, Clontech Inc.
pGBKT7	Bait-Vektor fusioniert mit Gal4 DNA-Bindungsdomäne	Matchmaker Yeast-Two-Hybrid Sytem, Clontech Inc.
pGBKT7 N-CoR SANT1+2	Bait-Konstrukt (Köder, N-CoR As 429-683) fusioniert mit Gal4 DNA-Bindungsdomäne	diese Arbeit.

### 2.2.2 Expressionsbanken

Name	Insert / Diversität	Referenz
pBluescript SK (+/-)	murine cDNA Expressionsbank, embryonaler Tag 13,5 aus Gewebe der Hirnanhangdrüse Diversität: 5*10 <sup>8</sup>	Stratagene
PBluescript SK (+/-)	murine cDNA Expressionsbank aus Milzgewebe, 8.-12. Woche Diversität: 5*10 <sup>8</sup>	Stratagene
pACT2	murine embryonale Matchmaker II Library cDNA Tag 17e Diversität: 3,5*10 <sup>6</sup>	Clontech

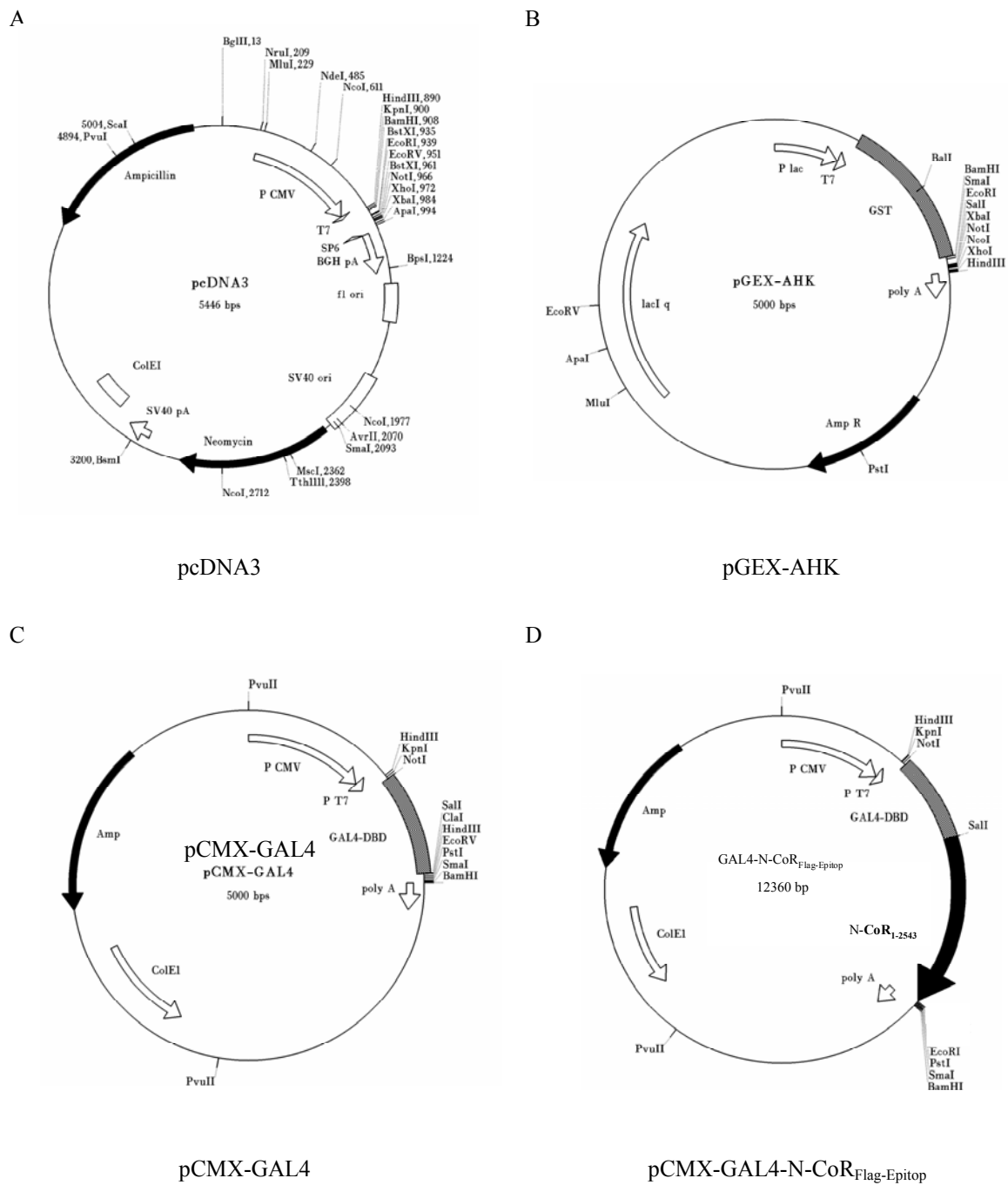
### 2.2.3 Bakterielle Expressionsvektoren

Name	Insert	Primer Ref.
pGEX 2TDK	GST	AG Heinzel
pGEX KGK N-CoR <b>429-758</b>	GST-SANT1+2-Domäne	EcoRI BamH1
pGEX AHK N-CoR <b>435-683</b>	GST-SANT1+2-Domäne	2 + 5
pGEX AHK N-CoR <b>435-492</b>	GST-SANT1-Domäne	2 + 3
pGEX AHK N-CoR <b>435-628</b>	GST-SANT1-Domäne+Linker	2 + 11
pGEX AHK N-CoR <b>493-628</b>	GST-Linker	10 + 11
pGEX AHK N-CoR <b>622-683</b>	GST-SANT2-Domäne	4 + 5
pGEX AHK N-CoR <b>599-707</b>	GST-SANT2+-Domäne	7 + 8
pGEX AHK N-CoR <b>493-683</b>	GST-Linker-SANT2-Domäne	10 + 5
pGEX AHK ADA2 <b>67-107</b>	GST-SANT	14 + 15
pGEX AHK MTA2 <b>282-341</b>	GST-SANT	12 + 13
pGEX AHK N-CoR <b>398-492</b>	DAD SANT1-Domäne	9 + 3
pGEX AHK N-CoR <b>398-492 N1</b>	DAD SANT1-Domäne N1	22
pGEX AHK N-CoR <b>398-492 N2</b>	DAD SANT1-Domäne N2	23
pGEX AHK N-CoR <b>398-492 N3</b>	DAD SANT1-Domäne N3	24
pGEX AHK N-CoR <b>1017-1506</b> N-CoR <b>435-492</b>	N-CoR HID+SANT1	16 + 17 2 + 3
pGEX AHK N-CoR <b>1017-1506</b> N-CoR <b>622-683</b>	N-CoR HID+SANT2	16 + 17 4 + 5
pGEX AHK mSin3 <b>436-899</b> N-CoR <b>435-492</b>	mSin3A PAH HID N-CoR SANT1	18 + 19 2 + 3
pGEX AHK mSin3 <b>436-899</b> N-CoR <b>622-683</b>	mSin3A PAH HID N-CoR SANT2	18 + 19 4 + 5
pGEX AHK mSin3 <b>524-899</b> N-CoR <b>435-492</b>	mSin3A HID N-CoR SANT1	20 + 18 2 + 3t
pGEX AHK mSin3 <b>524-899</b> N-CoR <b>622-683</b>	mSin3A HID N-CoR SANT2	20 + 18 5 + 4
pGEX AHK mSin3 <b>524-899</b> N-CoR <b>435-683</b>	mSin3A HID N-CoR SANT1+2	20 + 18 2 + 5
pGEX JDK N-CoR <b>1-393</b>	GST- Repressionsdomäne I	AG Heinzel
pGEX AHK N-CoR <b>94-393</b>	GST- Repressionsdomäne I	AG Heinzel
pGEX AHK N-CoR <b>970-1258</b>	GST- Repressionsdomäne II + III	AG Heinzel
pGEX AHK N-CoR <b>1679-2453</b>	GST-NID	AG Heinzel
pGEX AHK N-CoR <b>2218-2453</b>	GST-C'-Terminus	AG Heinzel
pGEX KGK CBP <b>1065-1460</b>	Bromodomäne	AG Heinzel

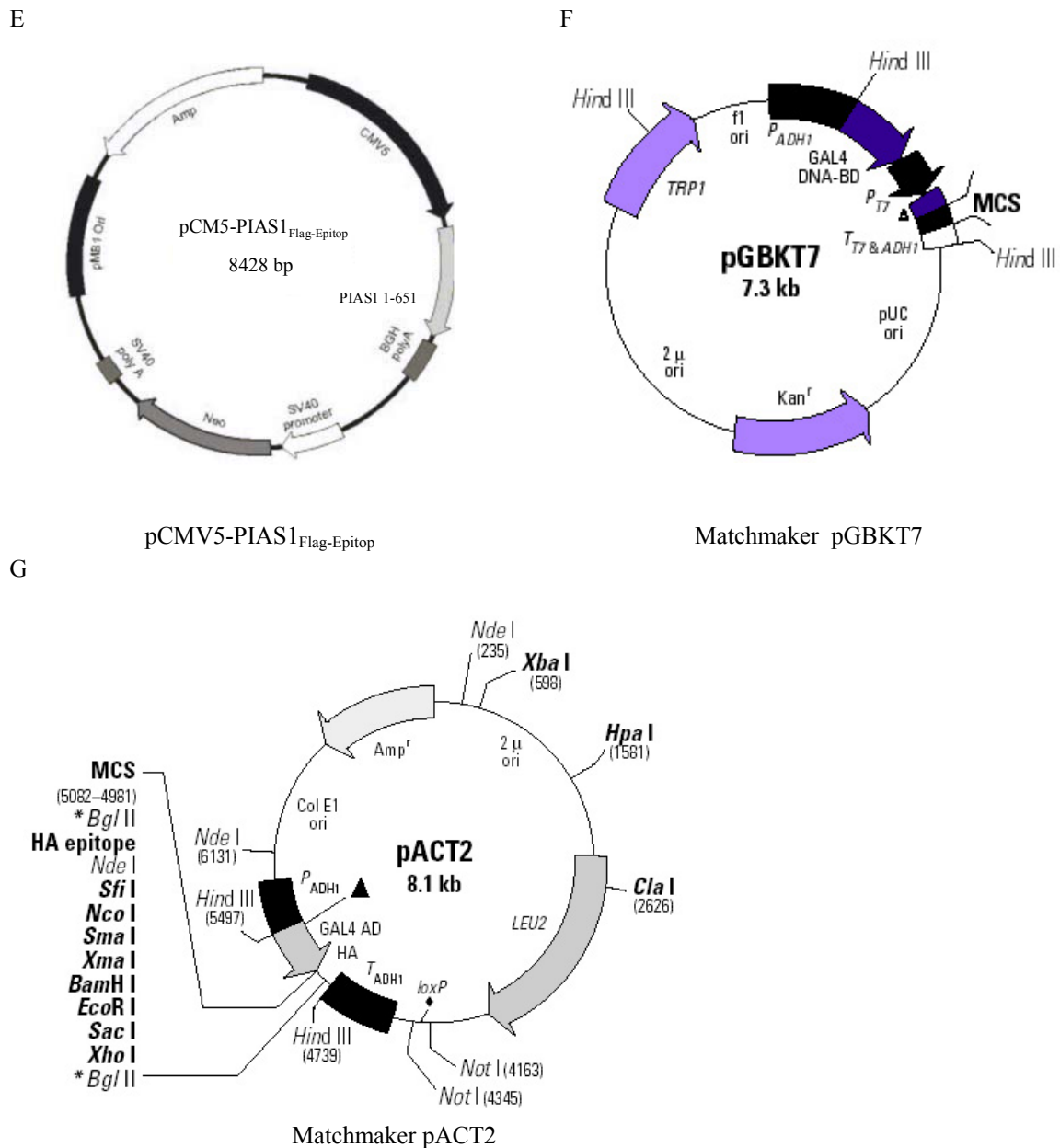
## 2.2.4 Eukaryontische Expressionsvektoren

Name	Insert	Referenz /Primer
pCMX GAL4-DBD N-CoR <sub>Flag-Epitop</sub>	As 1-2453	AG Heinzel (Heinzel et al., 1997)
pCMX GAL4-DBD	Gal-DBD	AG Heinzel (Heinzel et al., 1997)
pSP Vektor	-	AG Heinzel (Heinzel et al., 1997)
pCMX N-CoR $\Delta$ Sumo2 <sub>Ala</sub> (S2) <sub>Flag-Epitop</sub>	K 152 $\rightarrow$ A	diese Arbeit
pCMX N-CoR $\Delta$ Sumo3 <sub>Ala</sub> (S3) <sub>Flag-Epitop</sub>	K 194 $\rightarrow$ A	diese Arbeit
pCMX N-CoR $\Delta$ Sumo5 <sub>Ala</sub> (S5) <sub>Flag-Epitop</sub>	K 1117 $\rightarrow$ A	diese Arbeit
pCMX N-CoR $\Delta$ Sumo6 <sub>Ala</sub> (S6) <sub>Flag-Epitop</sub>	K 1330 $\rightarrow$ A	diese Arbeit
pCMX N-CoR $\Delta$ Sumo8 <sub>Ala</sub> (S8) <sub>Flag-Epitop</sub>	K 1443 $\rightarrow$ A	diese Arbeit
pCMX N-CoR <sub>Flag-Epitop</sub>	As 1-2453	AG Heinzel (Heinzel et al., 1997)
pCMX N-CoR $\Delta$ SANT1 <sub>Flag-Epitop</sub>	As 1-2453 $\Delta$ 436-484	diese Arbeit
pCMX N-CoR $\Delta$ SANT2 <sub>Flag-Epitop</sub>	As 1-2453 $\Delta$ 618-679	diese Arbeit
pCMX N-CoR $\Delta$ SANT1+2 <sub>Flag-Epitop</sub>	As 1-2453 $\Delta$ 436-484 + $\Delta$ 618-679	diese Arbeit
pT $\beta$ human TAF <sub>II</sub> 250	As 1-1872	AG Heinzel
pmT Sin3A	As 1-1282	AG Heinzel
pCDNA3.1 cDNA Hefeklon 102	Pc2 As 263-551	diese Arbeit
pCDNA3.1 cDNA Hefeklon 916	CGBP As 32-660	diese Arbeit
pCDNA3.1 cDNA Hefeklon 283	PIAS1 As 1-651	diese Arbeit
pCDNA3.1 cDNA Hefeklon 628	Ubc9 As 1-158	diese Arbeit
pCDNA3.1 cDNA Hefeklon 25	RanBP9	diese Arbeit
pCDNA3.1 cDNA Hefeklon 180	PIAS1 As 99-651	diese Arbeit
pCDNA3.1 cDNA Hefeklon 1044	cDNA I/ PAP7	diese Arbeit
pCDNA3.1 cDNA Hefeklon 646	- TDG As 1-397	diese Arbeit
pEF Dest <sub>V5-Epitop</sub> TDG	TDG As 1-397	AG Zörnig
pCMV5PIAS1 <sub>Flag-Epitop</sub>	PIAS1 As 1-651	
2xUAS Thyminkinasepromotor (TK) Luziferasegen Reporterplasmid	-	AG Heinzel (Heinzel et al., 1997)

### 2.2.5 Vektorkarten







**Abb. 1.1: Vektorkarten:**

**A, C, D.** und **E** Eukaryotische Expressionsvektoren. **A** Vektor wurde für die Klonierung der cDNA aus dem Hefevektor pACT2 genutzt. Die Klonierungen erfolgten über die Hind III / Xho I Stellen. **B** Bakterieller Expressionsvektor welcher für die Klonierung von GST-Fusionsproteinen verwendet wurde. Lag ebenfalls noch in den MCS KGK vor. **D** Vektor lag ebenfalls ohne Gal-DBD Fusion vor. **E** Expressionsvektor aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mirey. **F** und **G** Hefeexpressionsvektoren der Firma Clontech. P CMV = CMV-Promotor; T7 = T7-Promotor; MCS = “multiple cloning site“; poly A = Polyadenylierungssignal; SV40 poly A = “simian virus 40“-Polyadenylierungssignal; Neomycin (neo) = Neomycin-Resistenzgen; Amp = Ampicillin-Resistenzgen; Kan = Kanamycin-Resistenzgen GAL4-DBD = DNA-bindende Domäne (AS 1 – 147) des hefespezifischen Transkriptionsfaktors GAL4; P lac = Lac-Promotor; GST = Glutathion-S-Transferase; AD = Aktivierungsdomäne; bps = Basenpaare.

## 2.3 Antikörper

Spezifität	Spezies	Hersteller
TAF <sub>II</sub> 250	Maus, monoklonal	Upstate
N-CoR	Kaninchen, polyklonal	Upstate
HDAC3	Ziege, polyklonal	Santa Cruz
GMP-1	Maus, monoklonal	Zymed
Ubc9 (N-15)	Ziege, polyklonal	Santa Cruz
Gal4-DNA-Bindungsdomäne (RK5C1)	Maus, monoklonal	Santa Cruz
SUMO-1 (D-11)	Maus, monoklonal	Santa Cruz
TDG	Ratte, polyklonal	Biozol
Flag M2	Maus, monoklonal	Sigma
V5/ V5-HRP	Maus, monoklonal	Invitrogen
HDAC2 (H-54)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
Goat IgG	Kaninchen, polyklonal	Sigma
Mouse Ig, HRP-linked	Sheep	Amersham Biosciences,
N-CoR C-terminal	Kaninchen, polyklonal	AG Heintel
N-CoR C-terminal affinitätsgereinigt	Kaninchen, polyklonal	AG Heintel
N-CoR C-terminal	Meerschweinchen, polyklonal	AG Heintel

## 2.4 Spezielle Enzyme und Enzymkits

Name	Zweck	Referenz
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Inhibierung von RNAsen	Promega, Madison
QuikChange <sup>®</sup> Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Gerichtete PCR Mutagenese	Stratagen
TNT <sup>®</sup> T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	<i>in vitro</i> Transkriptions-Translations Reaktion; Proteinexpression	Promega
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Umschreiben von RNA in cDNA	Amersham Bioscience
RNeasy Mini Kit	Isolierung von RNA aus Extrakten/ Gewebe	Qiagen GmbH
Platinum Pfx DNA Polymerase	PCR Reaktion	Invitrogen

Die Protokolle der Hersteller wurden befolgt.

## 2.5 Peptide

Spezifität	Sequenz	Hersteller
human Histon H2A Peptid, biotinyliert	As 1-22 SGRGKQGGKARAKAKTRSSRAG-GK-biotin	Upstate Biotechnologie
human Histon H2B Peptid, biotinyliert	As 1-21 PEPSKSAPAPKKGSKKAITKA-GGK-biotin	Upstate Biotechnologie
human Histon H 3 Peptid, biotinyliert	As 1-21 ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA-GGK-biotin	Upstate Biotechnologie
Acetyl-human Histon H 3 (K9) Peptid, biotinyliert	As 1-21 ARTKQTAR <sub>[AcK]</sub> STGGKAPRKQLA-GGK-biotin	Upstate Biotechnologie
human Dimethyl-Histon H 3 (K9) Peptid, biotinyliert	As 1-21 ARTKQTAR <sub>[dimethylK]</sub> STGGKAPRKQLA-GGK-biotin	Upstate Biotechnologie
Phospho(S10)-Acetyl(K14)-human HistoneH3 Peptid, biotinyliert	As 1-21 ARTKQTARK <sub>[pS]</sub> TGG <sub>[AcK]</sub> APRKQLAG-GK-biotin	Upstate Biotechnologie
Histon H4 Peptid, biotinyliert	As 2-24 SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRR-GSGSK-biotin	Upstate Biotechnologie

## 2.6 Primer

Nr.	Oligo	Sequenz	Spezies
1	Gal DBD 5'	CGG AAG GAG GTG GTA CAA AGG	
2	SANT1 5'	GTT <b>GAA TTC</b> AAG GTT TAT AAA GAC AGA CAG	Maus
3	SANT1 3'	TTT GTT <b>CTC GAG</b> CTA TCC ATA ATT CCT TCT CAC G	Maus
4	SANT2 5'	GTT <b>GAA TTC</b> TCT ACA GAA CCT GTT GAG AC	Maus
5	SANT2 3'	GC TTT <b>CTC GAG</b> CTA CTG TTT ATG TTG CTG CAA AAG	Maus
6	SANT2 3' ohne stop	TTT GTT <b>CTC GAG</b> CTG TTT ATG TTG CTG CAA AAG	Maus
7	SANT 2+ 5'	GTT <b>GAA TTC</b> ATG ACA AGT GAA GCT GCA GC	Maus
8	SANT 2+ 3'	TTT GTT <b>CTC GAG</b> TCA GGC AGA AAC AGT GGA AGC	Maus
9	DAD SANT1	GTT <b>GAA TTC</b> ATG CGT CAG CTT TCT GTG ATT CCA CCT	Maus
10	SANT-Linker 5'	GTT <b>GAA TTC</b> ATG GTG AGA AGG ATT TAT GGA AAA CG	Maus
11	SANT-Linker 3'	TTT GTT <b>CTC GAG</b> TCA AGT CTC AAC AGG TTC TGT AG	Maus
12	SANT MTA2 5'	GTT <b>GAA TTC</b> CCG GTG CTC TGT CGG G	Maus
13	SANT MTA2 3'	TTT GTT <b>CTC GAG</b> CTA TGC TTC AGC AGC TTT CAA TC	Maus
14	SANT ADA2 5'	GTT <b>GAA TTC</b> ATG ACC TCA GAC TTC CCT	Maus

15	SANT ADA2 3'	TTT GTT <b>CTC GAG</b> CTA CAG TTG CTT CAG GTT CAG	Maus
16	N-CoR RIII 5'	CGG <b>GGA TCC</b> GAA GRC CTC CAA CCT GCT CC	Maus
17	N-CoR RIII 3'	TTT GTT <b>CTC GAG</b> TCC ATA ATT CCT TCT CAC G	Maus
18	Sin3A PAH III Hid 3'	GTT <b>GAA TTC</b> GAG TCG CAT AAA GAT ATA CC	Maus
19	Sin3A PAH III Hid 5'	CGG <b>GGA TCC</b> GGA GCC ACA CCT CCA GTG	Maus
20	Sin3A III 5'	CGG <b>GGA TCC</b> GGC TAT AAG GAG TCT GTA CAT CAT C	Maus
21	GST 5' <b>Mutagenese Oligo</b>	CGT TTG GTG GTG GCG ACC <b>Sequenz</b>	
22	N-CoR N1	GAA AAG GAG ATC TTT GCG GCC GCG TTT ATC CAG CAT CC	Maus
23	N-CoR N2	GCA TCC TAT TTG GCA GCG GCG AGT GTT CCT GAT TGT G	Maus
24	N-CoR N3	GG AAG AGT GTT CCT GCT TGT GCT GCA TAT TAC TAT TTA ACC	Maus
25	N-CoRΔSumo2 <sub>Ala</sub> (S2)	CCG GCA TTT GGA GTC GCC CAT GAA GCT CCT TCC	Maus
26	N-CoRΔSumo3 <sub>Ala</sub> (S3)	GTC GAT CGA GAA ATT GCG GCC GTA GAA CAG CAG ATC C	Maus
27	N-CoRΔSumo5 <sub>Ala</sub> (S5)	CCT TTG ACC TAC ATC GCG CAG GAA GAA TTT TCT CCG	Maus
28	N-CoRΔSumo6 <sub>Ala</sub> (S6)	C CCC AAA CAG ATA GCC AGG GAG AGC CCT CCC ATC C	Maus
29	N-CoRΔSumo8 <sub>Ala</sub> (S8)	GTA GTA GAA CGG GGA GCC TAT GAG GAT GTG AAA GCA GGC	Maus

## 2.7 *E. coli* Stämme und Anzuchtbedingungen

Stamm	Genotyp	Referenz
BL-21 Codon Plus (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm Tet<sup>r</sup> galλ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]</i>	Stratagene
DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrAA(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80d lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ<sup>-</sup>rpsL nupG</i>	Life Technologies
XL-1Blue MRF'	Δ( <i>mcrA</i> )183( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>ZΔ15M TZTn10(Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene

Plasmidhaltige Bakterien werden über Nacht bei 37°C und 220 rpm in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angezogen. Die langfristige Lagerung der plasmidhaltigen Stämme erfolgte bei -80°C in LB-Medium mit 25% Glycerin.

## 2.8 Zelllinien und Medien

Zelllinie	Herkunft/Eigenschaften	DSMZ-Nr./ Referenz
Jurkat	humane T-Zell-Leukämie Zelllinie, wurde aus dem Blut eines 14jährigen Junges mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) etabliert. Suspensionszelllinie. runde Zellen, die einzeln oder in kleinen Klümpchen wachsen.	ACC 282; (Schneider et al., 1990)
HeLa	human Zervix Karzinoma Zelllinie, wurde aus dem epitheliale Zervix einer 31jährigen Frau etabliert, späterer Diagnose lautete auf Adenokarzinom	ACC 57 Scherer et al., J. Exp. Med. 97: 695 (1953); Gey et al., Cancer Res. 12: 264 (1952)
293T	Nierenzelllinie, aus primärem embryonalem Nierengewebe etabliert. Zellen sind mit dem E1A-Genprodukt transformiert und exprimieren SV40 „large T“ Antigen. Zellen wachsen adhärent als Monolayer.	ACC 305 (Graham et al., 1977)
MCF7	humane Brustkrebszelllinie. Etabliert aus einer 69-jährigen Patientin mit metastasierendem Brustkrebs. Zellen sind positiv für die zytoplasmatische Lokalisation des Estrogenrezeptors	ACC 115 (Soule et al., 1973)
Cos7	Zelllinie der Grünen afrikanischen Meerkatze. Durch Transformation mit einem origin-mutierten SV-40 entwickelt aus CV-1 Zellen, einer Affenzelllinie ( <i>cercopithecus aethiops</i> ) entwickelt	ACC 60 (Gluzman, 1981)

Die verwendeten Säugerzelllinien werden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, zweimal wöchentlich mit Trypsin (5 min, 37°C) abgelöst und verdünnt wieder ausgesät. Dem Medium wird 10% hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Die Langzeit-aufbewahrung erfolgt in flüssigem Stickstoff in einem Medium aus 70% DMEM/20% FCS/10% DMSO.

## 2.9 Hefestamm und Anzuchtbedingungen

Stamm	Genotyp	Referenz
AH109	MATa, <i>trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	(James et al., 1996)

Die Anzucht der Hefen erfolgt in den entsprechenden Voll- oder Selektionsmedien bei 30°C für 24-40h. Die langfristige Lagerung erfolgt bei -80°C in YPDA-Medium mit 50% Glycerin.

## 2.10 Lösungen und Puffer

DNA-Gel Ladepuffer (6x):	Ficoll	15%
	EDTA	25 mM
	Bromphenolblau	0,05%
	Xylencyanol	0,05%
PBS (1x):	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,3 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM
SOC-Medium	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	Trypton	2% (w/v)
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSo <sub>4</sub>	20 mM
	+ Glukose (steril)	20 mM
	Tris-HCl pH 7,4	10 mM
TE (1x)	EDTA	1 mM
	Tris-Acetat	40 mM
TAE (1x)	EDTA	1 mM

## 2.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Spezifische DNA-Segmente wurden mit einer Biometra T-Gradient PCR-Maschine amplifiziert. Die Reaktion wird in einem 50 µl Ansatz bestehend aus DNA-Template, DNA-Polymerase-Puffer, je 10 pmol der entsprechenden Primer (3' und 5' Primer), 40 pmol des dNTP-Mix und 2 U DNA-Polymerase durchgeführt. Die Denaturierung der DNA-Matrize erfolgt für eine Minute bei 95°C, während für die 0,5 minütige Hybridisierung der Primer eine Temperatur ca. 5°C unterhalb des T<sub>m</sub>-Wertes gewählt wird. Die Polymerasereaktion wird bei 72°C (Taq-Polymerase) oder 68°C (Pfx-Polymerase) mit einer Minute pro Kilobasenpaar durchgeführt. Es erfolgten 18-30 Zyklen, die durch eine abschließende 10 minütige Synthesephase bei 72°C (68°C) abgeschlossen werden. Die PCR-Produkte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, analysiert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder Jet Sorb Extraction Kit aus dem Gel eluiert.

## 2.12 DNA Methoden

### 2.12.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen an für diese Nukleasen spezifischen Sequenzmotiven geschnitten werden. Dazu werden 1-10 Einheiten des jeweiligen Enzyms pro µg DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer (New England BioLabs/ MBI Fermentas) eingesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 1-20 h bei der vom Hersteller empfohlenen Inkubationstemperatur. Die Reaktion wird durch Zugabe von 6x DNA-Ladepuffer abgestoppt.

### 2.12.2 Dephosphorylierung von 5' Enden

Um die Selbstligation von linearisierten Vektoren in nachfolgenden Klonierungen zu verhindern, werden im Anschluß an den Restriktionsverdau 1-2 Einheiten Alkalische Phosphatase (New England BioLabs) pro µg DNA zugeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Alkalische Phosphatase entfernt 5'Phosphatgruppen, so daß eine Ligation nur noch mit dem Insert erfolgen kann, was die Ligationseffizienz erheblich erhöht.

### 2.12.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation kommt es zur Verknüpfung zweier DNA-Enden. Die Reaktion wird durch DNA-Ligasen katalysiert, wobei Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe gebildet werden. Ein Standard-Ligationsansatz bestehend aus 10–50 ng Vektor-DNA, 3–10 fachem molaren Überschuß an Insert-DNA, Ligasepuffer und 400 U T4-DNA-Ligase und wurde in einem Volumen von 20 µl angesetzt.

0,5-1µl geschnittener Vektor und Insert werden mit der SMART DNA-Leiter auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die DNA-Konzentrationen pro µl berechnet. Die einzusetzende Insertmenge bei vorgegebener Vektormenge wird nach folgender Formel berechnet

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} \cdot \text{Insertgröße [kb]}}{\text{Vektorgröße [kb]}} \leftarrow \text{molares Verhältnis Insert/Vektor}$$

Die Reaktion erfolgt bei 22 °C für 1 bis 2 Stunden. Um die Qualität des Vektors in der nachfolgenden Transformation abschätzen zu können, wird als Kontrolle eine Ligation ohne Insert durchgeführt. 2 µl des Ligationsansatzes wird anschließend für die Transformation von *E.coli* eingesetzt.

### 2.12.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gel- Elektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten, zur Reinigung von PCR-Produkten und zur Abschätzung von DNA-Konzentrationen eingesetzt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente zur Anode ist dabei proportional zur Größe, welche anhand eines DNA-Längenstandards abgeschätzt werden kann. Es werden in der Regel 1%ige TAE-Gele verwendet (Auftrennungsbereich 0,5-6 kb), die mit 0,002 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt werden, welches in die DNA interkaliert und unter UV-Bestrahlung Licht emittiert. Der Gellauf erfolgt in 1xTAE-Puffer bei einer kontinuierlichen Spannung von 10 mV/cm Gellänge. Anschließend werden die Fragmente unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und mit einer Videokamera fotografiert.

### **2.12.5 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Messung der Extinktion von DNA-Lösungen bei 260 und 280 nm gibt Auskunft über deren Konzentration und Reinheit. Eine  $OD_{260}$  entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA. Da aber auch aromatische Aminosäuren bei dieser Wellenlänge absorbieren wird zusätzlich die Extinktion bei 280 nm bestimmt, bei der Proteine stärker als DNA absorbieren. Ist der Quotient aus  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  kleiner als 1,8, so deutet dies auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol hin.

### **2.13 Transformation von Plasmiden in *E.coli***

Um neuklonierte Plasmide zu selektieren und zu vervielfältigen mußten sie in Bakterien eingebracht werden.

#### **2.13.1 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen**

A.) **Chemokompetente Bakterien (XL-1 blue):**

Lösung 1: 100 mM  $\text{RbCl}_2$ , 50 mM  $\text{MnCl}_2$ , 30 mM  $\text{KaAc}$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 13% Glycerol(v/v) pH 5,8; steril filtrieren

Lösung 2: 10 mM MOPS (pH 7,0), 10 mM  $\text{RbCl}_2$ , 75 mM  $\text{CaCl}_2$ , 13 % Glycerin (v/v) pH 7,0; steril filtrieren

600 ml Bakterienkultur werden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,48-0,5 angezogen und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 2000 rpm) geerntet. Die Zellen werden in 200 ml kalter Lösung 1 resuspendiert und für 1-2 h auf Eis inkubiert. Die Bakterien werden erneut durch Zentrifugation pelletiert und in 15 ml Lösung 2 resuspendiert. Aliquots von 200  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

B.) **Elektrokompetente Bakterien (DH10B):**

Eine Einzelkolonie der Bakterien wird über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen und am nächsten Tag in 500 ml LB bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Die Zellen werden anschließend für 10-15 min auf Eis gekühlt und 20 min bei 5.000  $\times g$  und 2 °C zentrifugiert. Die Zellen werden in 5 ml Eiswasser resuspendiert und 500 ml Eiswasser hinzugegeben. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation und die Zugabe von 5 ml und 500 ml Eiswasser. Die Zellen werden wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit gelöst. Die Zellen werden frisch verwendet oder zur Lagerung mit 10 % Glycerin versetzt, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die Transformationseffizienz dieser Zellen beträgt  $\geq 10^9$  pro  $\mu\text{g}$  DNA.

#### **2.13.2 Transformation in chemokompetente Bakterien**

10 ng eines GST-Expressionsvektors wird zu den chemokompetenten Zellen (BI21 codon+) gegeben, welche auf Eis aufgetaut wurden. Die Aufnahme der Fremd-DNA in die Zellen wird durch Kältestreß (30 min auf Eis) und anschließendem Hitzeschock (60 s, 42°C) forciert. Die Zellen werden kurz auf Eis abgekühlt und dann mit 500  $\mu\text{l}$



LB-Medium (ohne Antibiotika) 0,5 h bei 37°C vorkultiviert. Das Ansatzvolumen wird durch Zentrifugation halbiert, auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den angewachsenen Kolonien können dann zur Expression Flüssigkulturen inokuliert werden.

### **2.13.3 Transformation in elektrokompente Bakterien**

Die Transformation in elektrokompente Zellen (DH10B) wird zur Amplifikation von gering-konzentrierten Plasmidpräparationen, z.B. solchen aus Hefezellen oder Ligationsansätzen, verwendet. Von anderen Gruppen zugesandte DNA wurde ebenfalls auf diese Weise eingebracht. Die Elektroporations-Apparatur wird auf 2,5 kV und 25 µF eingestellt mit einem Pulse-Kontroller von 200 Ω. Es werden 5 µl der Hefe-Plasmid Präparation oder 1 pg Vektor zu 50 µl eisgekühlten elektrokompenten Zellen gegeben und für 1 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroküvetten gegeben und wie oben beschrieben gepulst. Die Zellen werden in 700 µl SOC-Medium aufgenommen und 30-60 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden abzentrifugiert, in 80 µl SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Platten ausplattiert.

## **2.14 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli***

### **2.14.1 Plasmidisolierung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation)**

Für analytische Zwecke wird Plasmid-DNA mit dem NucleoleoSpin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel isoliert. Es wird nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

### **2.14.2 Plasmidisolierung in präparativem Maßstab (Maxi-Präparation)**

Größere Mengen Plasmid-DNA werden aus 300 ml Kulturen mittels des Plasmid Maxi Kit der Firma Genomed präpariert. Dabei wird nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

## **2.15 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.15.1 Proteinexpression in *E. coli***

Zur Proteinproduktion werden die entsprechenden Expressionsvektoren in den *E.coli* Stamm BL21 codon Plus (DE3) transformiert und in 0,5 l bis 1 l LB- Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5-0,7 angezogen. Da die Multiple Cloning Site dieser Vektoren unter der Kontrolle eines vom Laktose-Operon abgeleiteten Promotor steht, kann die Expression durch Glukose reprimiert und durch IPTG induziert werden. Die Induktion erfolgt mit 0,5 bis 1 mM IPTG für 1 h bei 37°C oder für 3 h bei 30°C.

## 2.16 Verifikation von Proteininteraktionen *in vitro* mittels GST-Pulldown

Proteinexpression und Zellyse unter nativen Bedingungen

1 x LysS-Puffer: 50 mM Tris pH 7,8, 0,4 M NaCl, 0,5 mM EDTA, 10 % Glycerin, 0,1 % NP-40, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,5 mM PMSF, 1:1000 Protease-Inhibitoren-Mix

½ LysS-Puffer: 1:1 LysS +H<sub>2</sub>O

PPI-Puffer: 20 mM Hepes pH 7,9, 100 mM NaCl, 0,02% NP-40, 1 mM DTT, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % Glycerin, 0,5 mM PMSF, 1:1000 Protease-Inhibitoren-Mix

Nach Induktion (0,5 mM IPTG) und Expression (1 h 37°C) werden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert und in Lysispuffer resuspendiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation mit 10.000 xg bei 4 °C, wird der Überstand bei -80 °C eingefroren.

### 2.16.1 GST-Aufreinigung

Die Glutathion-Agarose-Matrix wird in Wasser gequollen und anschließend in PPI Puffer äquilibriert. 500  $\mu$ l UZ-Expressionsüberstand werden 50  $\mu$ l Glutathion-Agarose-Beads zugegeben und anschließend für eine Stunde bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Matrix wird 3 mal mit ½ LysS-Puffer gewaschen. Durch Zentrifugation wird das gebundene GST-Fusionsprotein (2500 rpm, 5 min) pelletiert. Die Expression wird durch Auftragen auf ein SDS-Gel verifiziert und durch Coomassie-Blau-Färbung eine Proteinabschätzung durchgeführt. Für eine große Aufreinigung werden entsprechende Volumina Bakterienlysate mit entsprechenden Beads versetzt und in gleicher Weise aufgereinigt.

### 2.16.2 GST-Pulldown

Zur Bindung des möglichen Interaktionspartners werden auf Glutathion-Agarose-Beads gebundene GST-Fusionsproteine mit TNT translatierten Proteinen für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Die Beads werden anschließend fünfmal mit 1 ml PPI-Puffer gewaschen und in 20  $\mu$ l SDS-Ladepuffer resuspendiert. Nach 5 minütigem Aufkochen der Proben bei 95°C und 3 minütigem Abzentrifugieren bei 14.000 upm, wird der flüssige Überstand auf ein Gel aufgetragen. Das Gel wird zur Kontrolle gleichmäßiger Beladung mit Coomassie-Blau gefärbt und nach Entfärbung auf einer Whatmanmembran vakuumgetrocknet. Interaktionen werden durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

### 2.16.3 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellysaten erfolgt mit dem Protein Assay Kit der Firma Biorad, welcher auf der Methode von Bradford basiert.

### **2.16.4 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese**

SDS-Gel Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein kontinuierliches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht. Die Proben werden für 5 min bei 95°C in 2 x SDS-Ladepuffer (Roth) inkubiert und durch das SDS mit einer kontinuierlichen negativen Ladung versetzt. Der Gellauf erfolgte in Form von vertikalen Plattengelen mit 6 bis 12%igen Trenn- und 5%igen Sammelgelen in SDS-Laufpuffer. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel.

### **2.16.5 Coomassieblau-Färbung von Polyacrylamidgelen**

Coomassie-Färbelösung: 0,1% Coomassie G250, 40% Ethanol, 10% Eisessig

Entfärbelösung: 25% Ethanol, 10 % Eisessig

Zur Sichtbarmachung aller im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wird das Gel für 30 min in Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wird durch mehrfaches Wechseln der Entfärbelösung aus dem Gel entfernt. Das Gel wird zur Dokumentation auf einem Whatman-Papier getrocknet oder zwischen zwei Plastikfolien der Firma Bio-Rad getrocknet.

### **2.16.6 Ponceau-Färbung von Nitrocellulosemembranen**

Zum Nachweis der erfolgreichen Blottingprozedur, sowie der Überprüfung gleicher Proteinmengen in den einzelnen Spuren, wird die Membran für 5 min in Ponceau S-Lösung (Sigma) gefärbt und durch Waschen mit Wasser entfärbt.

## **2.17 Immunoblot (Western Blot)**

TBS (1x): 10 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl

TBS-T: TBS mit 0,05% Tween 20

Der Western Blot dient dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen durch Antikörper. Die durch SDS-Gel Elektrophorese aufgetrennten Proteine werden in einem Naßtransfer auf Nitrocellulose-Membranen bei 100 mA über Nacht bei 4°C übertragen. Dazu wurden 2 Lagen Whatmann 3MM Papier, 2 Lagen synthetisches Papier und die Nitrocellulosemembran in Transferpuffer eingeweicht. Das SDS-Gel wird auch die Nitrocellulosemembran gelegt und beidseitig Whatmann 3MM Papier und ein synthetisches Papier aufgebaut. Nach dem Blotten wurde die Membran für 1 h in 5% Milchpulver/BSA in PBS-T geblockt. Die Inkubation des 1. Antikörpers erfolgt für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wird dreimal je 10 min mit PBS-T gewaschen und mit dem 2. Antikörper, an den eine Peroxidase gekoppelt ist, für 30 min bei RT inkubiert. Nach drei erneuten Waschstschritten erfolgt

die Detektion der Peroxidase-Aktivität mit dem ECL-System der Firma Amersham und Nachweis der Lichtemission mit einem Röntgenfilm .

## **2.18 Immunopräzipitation (IP)**

Bei der Immunopräzipitation kann ein spezifisches Protein aus einem Totallysat isoliert werden. Dabei wird das Protein an einen spezifischen Antikörper gebunden, welcher wiederum über den F<sub>C</sub>-Teil an Protein A bindet. Protein A ist an eine Sepharose- oder Agarose-Matrix fixiert, die IP des Proteins kann so durch Zentrifugation der Protein A Matrix gewonnen werden. Zum Zellextrakt wird 1 µg des spezifischen Antikörpers gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt die Zugabe von 60 µl der Protein-A/G Sepharose-Beads und eine erneute Inkubation für eine Stunde bei 4 °C auf einem Drehrad. Die Matrix wird dreimal mit NETN-Puffer (0,05% NP-40) gewaschen und dabei jeweils für 30 sec bei 2.000 rpm zentrifugiert. Das gebundene Protein wird durch Zugabe von SDS-Gelladepuffer eluiert und der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen.

## **2.19 Methoden der Zellkultur**

### **2.20 Transfektion von Säugerzellen**

Säugerzellen können unter bestimmten Bedingungen von außen zugesetzte Fremd-DNA aufnehmen (Transfektion) und die von dieser DNA kodierte Gene exprimieren.

#### Transfektion

Dazu werden  $3 \cdot 10^6$  293 T Zellen in einer 10cm-Platte in einem Volumen von 10 ml DMEM Vollmedium ausgesät. 20 µg DNA und 61 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> werden in 500 µl angesetzt. Zu diesem Ansatz werden 500 µl 2x HBS vorsichtig zugetropft und mit einer 1ml-Pipette durch Ausblasen gemischt (ca. 15 sec). Das Medium wird von den Zellen entfernt und die Zellen mit 3 ml DMEM, welches 25 µM Chloroquine enthält überschichtet. Das Präzipitat wird im Anschluss vorsichtig auf die vorbereiteten Zellen getropft. Nach 8 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wird der Präzipitationsmix von den Zellen abgenommen und die Zellen mit 10 ml DMEM Vollmedium für weitere 48 h wachsen gelassen. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und in entsprechendem Lysispuffer geerntet. Die Expression des transfizierten Gens wurde im Immunoblot untersucht.

#### Transfektion für einen Luziferasereportertest

Harvest-Puffer: 1,25 ml 1 M MesTris pH 7,8; 25 µl 1 M DTT; 250 µl 10% Triton X-100; 2,5 ml Glycerin (10%)

Für einen Luziferasereportertest werden  $5 \cdot 10^5$  293 T Zellen/Loch in 12-Loch Platten ausgesät. 1,5 µg 2xUAS TK Luziferasereporter und 0,1 µg pSV40 β-Galactosidase werden mit 7,63 µl 2M CaCl<sub>2</sub> in einem 62,5 µl Volumen aufgenommen. Zu diesem Ansatz wurden 62,5 µl 2x HBS vorsichtig zugetropft und mit einer 1 ml-Pipette durch Ausblasen gemischt (ca. 15 sec). Das Medium wird von den Zellen entfernt und die Zellen mit 375 µl DMEM je Loch, welches 25 µM Chloroquine enthält, überschichtet. Das Präzipitat wird im Anschluss vorsichtig auf die vorbereiteten Zellen getropft. Nach 8 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wird der Präzipitationsmix von den

Zellen abgenommen und die Zellen mit 5 ml DMEM Vollmedium für weitere 48 h wachsen gelassen. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und in 150 µl Harvest-Puffer geerntet. Die Extrakte werden 10 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile werden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand weiterverwendet.

## **2.21 β-Galactosidasetest**

100x Mg: 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 4,5 M β-Mercaptoethanol  
ONPG: 4 mg/ml ONPG in 100 mM NaPi pH 7,5  
(o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid)  
NaPi 41 ml 200 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 9 ml 200 mM  
NaHPO<sub>4</sub>  
(Natriumphosphat-Puffer pH7,5)

Die Kotransfektion des SV-40-β Galactosidase Vektors bei einer Transfektion erlaubte die Durchführung eines β-Gal-Tests. Hierfür wird 1 µl 100x Mg Lösung, 22 µl ONPG (Substrat), 72 µl 100 mM NaPi pH 7,5 mit 10 µl Zellextrakt in eine Mikrotiterplatte pipettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird mit 200 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt und sofort danach bei einer OD von 420 nm in einem Photometer gemessen.

## **2.22 Messung der Luziferase-Aktivität/Repressionstest**

Luziferin: 16,7 ml 5 mM KHPO<sub>4</sub>, 5 mg Luziferin  
(Endkonzentration 3000µg/ml)  
Luziferinpuffer: 1,25 ml 1 M MesTris, 250 µl 1M MgCl<sub>2</sub>, 24 mg  
ATP, 8,25 ml H<sub>2</sub>O  
Substratpuffer: 1:1 Verhältnis von Luziferin und Luziferinpuffer

Die Zellen werden mit PBS gewaschen. In einer 96 Loch Platte werden 10 µl Zelllysate je Loch des Transfektionsansatzes pipettiert. Das Luminometer wird so programmiert, dass 50 µl Substratpuffer je Loch dazugeben wird. Nach Zugabe des Substratpuffers erfolgt nach 20 sec die Messung. Die exprimierte Luziferase katalysiert nach Zugabe des Luziferinsubstrats eine Reaktion bei der Licht emittiert wird, welches durch einen Photoelektronenvervielfacher detektiert werden kann. Das emittierte Licht ist somit proportional zur Transaktivierungsaktivität des Faktors.

## **2.23 Immunfluoreszenzanalyse**

Die Färbung zellulärer und heterolog exprimierter Proteine erfolgt mittels Immunfluoreszenz. Dazu werden die Zellen auf Deckgläser in einer Zellkulturschale ausgesät und zum gegebenen Zeitpunkt mit 3% Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen werden zweimal je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Um die Zellmembran für die Aufnahme der Antikörper zu permeabilisieren, wird das Präparat mit 0,1% Triton X-100/PBS 5 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wird das PBS abgesaugt, und nach Trocknung des Glases der Ort der Färbung mit einem Wachsstift eingegrenzt. Nach 1 h Blocken (3% BSA in PBS) erfolgt die Inkubation mit Primäantikörper (verdünnt in Blocklösung) bei 4°C über Nacht. Nicht gebundener Antikörper wird durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundäantikörper (1:1000)

1 h bei RT im Dunkeln gefärbt. Nach erneutem Waschen werden die Salze mit Aqua dest. gewaschen, das Präparat getrocknet und mit Vectashield/DAPI auf einem Objektträger aufgebracht. Nach Trocknen und Fixierung mit Nagellack können Bilder mit einem Fluoreszenzmikroskop (Konfokal Scanning Laser Mikroskop, Leica DM IRBE) aufgenommen werden.

## **2.24 In vitro SUMO-Modifikation**

TB Puffer: 20 mM Hepes, pH 7.3, 110 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 1 mM DTT und 1 µg/mL jeweils von Leupeptin, Aprotinin und Pepstatin

Der Kit (AG Melchior/ MPI für Biochemie, Martinsried, Germany) beinhaltet die folgenden Reagenzien (rekombinante aus Bakterien gereinigte Proteine) die für ungefähr 1000 Reaktionen in den angegebenen Konzentrationen ausreichen (SUMO trägt ein Flag-Epitop und besitzt ein freies GlyGly-Motiv an dem C-Terminus)

- Ziege α-RanGap1 Antikörper (100 µl Serum, Konzentration 1:7000 in 5% Milch-PBS-0.2% Tween. Nitrozellulosemembranen eignen sich besser als PVDF Membranen für die Detektion von RanGap1 im Western Blot)

- Aos1/Uba2:	2 x 50 µl;	Konzentration: 0.5 mg/ml,
- Ubc9:	3 x 20 µl;	Konzentration: 0.5 mg/ml,
- SUMO1(aa 1-97):	1 x 200 µl;	Konzentration: 1.0 mg/ml,
- RanGap1:	1 x 50 µl;	Konzentration: 1.0 mg/ml,
- Gst-BP2ΔFG	2 x 20 µl;	Konzentration: 1.0 mg/ml

Alle Proteine waren in TB Puffer (TB) aufgenommen und wurden jeweils in 1µl Aliquots (Ubc9, Aos1/Uba2 und RanBP2) bei -80°C gelagert und nur einmal benutzt. RanGAP und SUMO können häufiger aufgetaut und wieder eingefroren werden.

Alle Verdünnungen müssen in TB Puffer mit 0.05% Tween 20 + 0.2 mg/ml Ovalbumin durchgeführt werden. Unter diesen Bedingungen können die angefertigten Verdünnungen öfters benutzt werden.

### **2.24.1 Bedingung für RanGap1-SUMO Modifikation**

(SUMO-Modifikation von RanGAP > 50% in 30 min)

RanGap1	100 ng (für eine 20 µl Reaktion, 1 µl einer 1:10 Verdünnung in TB)
SUMO1	40 ng (für eine 20 µl Reaktion, 1 µl einer 1:25 Verdünnung in TB)
Aos1/Uba2	20 ng (für eine 20 µl Reaktion, 1 µl einer 1:25 Verdünnung in TB)
Ubc9	10 ng (für eine 20 µl Reaktion, 1 µl einer 1:50 Verdünnung in TB)
ATP	1 mM
Tween 20	0.05%
Ovalbumin	0.2 µg/µL

Das Tween und Ovalbumin verhindert eine unspezifische Absorption der Proteine an das Reaktionsgefäß. Die Reaktion wird bei 30°C für 30 Minuten durchgeführt. durch Aufkochen mit SDS Ladepuffer wird die Reaktion gestoppt. Ein Viertel des Reaktionsansatzes wird auf ein 8% SDS-Gel aufgetragen und in einem Western Blot mit αRanGap1 Antikörper nachgewiesen. Typischerweise werden 100% SUMO-Modifikation von RanGap1 unter diesen Bedingungen erreicht (mit 5 ng Aos1/Uba2 sind es lediglich 50% Modifikation in 30 min).

## 2.24.2 Bedingung für PIAS1-SUMO Modifikation

Das SUMO1 Protein und das Substratprotein müssen in großem Überschuß zur SUMO-E3-Ligase in der Reaktion vorliegen. Der Nachweis erfolgt mit einem spezifischen Antikörper gegen das Zielprotein oder bei Verwendung <sup>35</sup>S TNT-translatierter Proteine über das Auflegen eines Röntgenfilm durch Autoradiographie.

Substratprotein	1000 ng
SUMO1	1000 ng
Aos1/Uba2	150 ng
Ubc9	10 ng
PIAS1	5 ng oder IP aus Zelllysate (1-50 ng)
ATP	1 mM
Tween 20	0.05%
Ovalbumin	0.2 µg/µL

Die Reaktion wird bei 30°C für 30-60 Minuten inkubiert und durch Aufkochen des Ansatzes mit SDS Ladepuffer gestoppt. 1/10 der Reaktion wird auf ein SDS-Gel Aufgetragen und im Western Blot durch Detektion mit einem spezifischen Antikörper oder durch Auflegen eines Röntgenfilm sichtbar gemacht. (Achtung: Aos-1 ist His-Epitop markiert, SUMO, Ubc9, Uba2 und RanGAP1 besitzen kein Epitoptag, RanBP2 liegt als GST-Fusion vor).

## 2.25 Far-Western Hybridisierung

### 2.25.1 Herstellen der Sonde für die Far-Western Hybridisierung

10 x HBB:	250 mM Hepes-KOH pH 7,7, 250 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Hyb (75) + 1% Magermilch:	20 mM Hepes KOH pH 7,7, 75 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1% Magermilch, 0,05% NP-40, 1 mM DTT
6 M Guanine-HCl in 1 x HBB:	286,5 g + 50 ml 10x HBB in 500 ml, 1 mM DTT
10x HMK Kinase Puffer (ohne DTT):	200 mM Tris pH 7,5, 1 M NaCl 120 mM MgCl <sub>2</sub>
Rinderherzproteinkinase A (Sigma)	2,5 U in 50 µl 40 mM DTT
HMK-Stop-Puffer :	10 mM Naphosphat pH 8, 10 mM Napyrophosphat, 10 mM EDTA, 1mg/ml BSA
Elutionspuffer:	100 mM Tris pH 8, 120 MM NaCl, 20 mM Glutathion reduziert (Sigma)
NETN-Puffer :	20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% Glycerin, 1x Proteaseinhibitorcocktail, 0,5 mM PMSF, 0,5% NP-40

Zwischen dem GST Protein und dem Fusionspartner ist eine Kinasestelle lokalisiert. 500 µl GST-Fusionsprotein wird 3mal mit 1 ml HMK-Puffer gewaschen und die Beads nach dem letzten Waschschrift in einer 50%igen Suspension in HMK-Puffer aufgenommen. Zu dieser 500 µl Suspension werden 4 µl <sup>32</sup>PγATP (6000 Ci/ mMol) und 5 µl Rinderherzproteinkinase A gegeben und 30 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Reaktion wird mit 1 ml HMK-Stop Puffer beendet und die Suspension anschließend auf eine Poly-Prep-Säule der Firma Bio-Rad überführt. Die Matrix auf der Säule wird nun so lange mit NETN Puffer gespült bis das Eluat auf einem Geigerzähler einen Ausschlag von 0,5 bei max. Einstellung erreicht (etwa nach 150 ml NETN Puffer). Die Matrix wird nun mit 250 µl Elutions-Puffer 5 min inkubiert, und das Eluat in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gesammelt. Insgesamt werden 5 Fraktionen je 250 µl von der Säule eluiert. 2 µl jeder Fraktion werden mit Szintillationslösung in einem Szintillationszähler gemessen oder Alternativ auf einem SDS-Gel aufgetrennt und durch Auflegen eines Röntgenfilms kann die Markierung des GST-Fusionsproteins sichtbar gemacht werden.

### **2.25.2 Far-Western Hybridisierung**

Gewebeextrakte oder Immunopräzipitationen werden auf ein SDS-Gel geladen und nach der Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Für eine Denaturierungs-Renaturierungs-Reaktion der Proteine auf der Membran, wird die Nitrozellulosemembran zweimal je 10 min in 1 x HBB/1 mM DTT gewaschen. Anschließend 10 min in 25 ml 6 M Guanidin-HCl in 1 x HBB/1 mM DTT inkubiert. Dieser Schritt wird wiederholt, aber diesmal die Lösung nicht verworfen, sondern in dem gleichen Volumen 1 x HBB/1 mM DTT auf 3 M Guanidin-HCl verdünnt. In dieser Lösung wird die Membran erneut 10 min inkubiert. Die 1:1 Verdünnungen der Inkubationslösung wurde bis zu einer Konzentration von 0,187 M Guanidin-HCl wiederholt und die Membran jeweils 10 min inkubiert. Die Membran durchläuft demnach die Guanidin-HCl Konzentrationen 6 M, 6 M, 3 M, 1,5 M, 0,75 M, 0,375 M und 0,187 M. Nach dem letzten Denaturierungsschritt wird jeweils zweimal mit 1 x HBB/1 mM DTT gewaschen. Die Nitrozellulosemembran wird in 1 x HBB/1 mM DTT / 5% Magermilch+0,05% NP-40 + GST-Extrakt für eine Stunde geblockt. Die Blocklösung wird verworfen und die Nitrozellulosemembran in 1 x HBB/1mM DTT + 1% Magermilch, 0,05% NP-40 30 min inkubiert. Die Membran wird anschließend über Nacht in Hybridisierungslösung (Sonde: 100000-250000 cpm/ml) inkubiert. Nach der Hybridisierung wird viermal mit 1 x HBB/1 mM DTT je 15 min gewaschen. Die Nitrozellulosemembran wird anschließend auf Whatman-Papier getrocknet und in Folie eingepackt. Als letzter Schritt wird ein Röntgenfilm zur Detektion der Interaktion zwischen Proteinen auf der Membran und der Sonde aufgelegt und bei – 80°C lagern.

### **2.25.3 Far-Western-Screen Hybridisierung**

40 ml LB-Broth (+ 0,2 % Maltose) werden mit dem XL1-Blue Bakterienstamm angeimpft und über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wird die Bakterienkultur in ein 50 ml Falcongefäß überführt und 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in 10 mM MgSO<sub>4</sub> des ½ Ausgangsvolumens (20 ml) aufgenommen. 500 µl (große Platte) oder 200 µl (kleine Platte) XL1-Blue Bakterien suspension werden mit 1-3 µl Phagen (Expressionsbank) 15 min bei 37°C inkubiert. Der aufgekochte Top-Agar wird auf Falcongefäße verteilt



und im Wasserbad bei 45°C gelagert. Nach der 15minütigen Bakterien-Phagen Inkubation wird der Ansatz zu dem Top-Agar pipettiert und nach Mischung sofort auf die LB-Platten gegossen. Eine Blasenbildung muß absolut vermieden werden. In der 1. Runde des Screens werden ungefähr 50-70 000 Plaques pro große Platte (137 mm) kalkuliert. Dafür werden 7-8 ml Topagar mit 500 µl Bakteriensuspension und Phagen ausgegossen. Für eine kleine Platte (87 mm) werden 3 ml Topagar mit 200 µl Bakteriensuspension plus Phagen ausgegossen. In der 2. Runde werden auf einer kleinen Platte ungefähr 500-1000 Plaques und in der 3. Runde ungefähr 500 Plaques pro Platte kalkuliert.

*Inkubation der Platten:* Die Platten werden bei 42°C inkubiert bis die ersten Plaques zu sehen sind (4-6 Stunden). Während dieser Zeit werden Nitrozellulosefilter mit Orientierungslinien und Nummern gekennzeichnet. Die Filter werden dann in frisch gefiltertem 10 mM IPTG getränkt und anschließend 10 min getrocknet. Bei Erscheinen der ersten Plaques, werden die Filter auf die Bakterien aufgeleift und der Brutschrank auf 37°C herabgefahren. Die Bakterien werden mit den Filtern für mindestens 6 h inkubiert. Das Hybridisierungsverfahren entspricht dem der Far-Western Hybridisierung.

## **2.26 *In vivo* Markierung von <sup>3</sup>H-Acetyl-Histonen**

Lyse-Puffer: 25 mM Tris pH 7,5, 1 mM EGTA, 0,05% NP-40, 1 mM PMSF, 300 mM TSA

Extraktions-Puffer: 25 mM Tris pH 7,5, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 2 M NaCl, 300 mM TSA

2-8 x 10<sup>7</sup> Jurkat oder 293T Zellen werden in RPMI oder DMEM Vollmedium gezüchtet. Die Zellen werden auf eine 10 cm Platte überführt und dem Ansatz wird 5 mCi Na-<sup>3</sup>H-Acetat (2-10 Ci/mmol) zugegeben (entspricht 50 µM). Nach 15 minütiger Inkubation bei 37 °C werden die Zellen mit 300 nM Trichostatin A (TSA) für weitere 2-3 h inkubiert. Nach Überführung der Zellen in ein 50 ml Falcon werden diese bei 1500 rpm 3 min pelletiert. Der Mediumüberstand wird abgenommen und das Zellpellet in 5 ml Lyse-Puffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne werden im Anschluß durch Zentrifugation (2500 rpm 3 min) isoliert und in 900 µl Extraktionspuffer ohne NP-40 aufgenommen. Nach Sonifizierung (eg. 40 Pulse halbe Energie, mit der kleinen Spitze) wird dem Ansatz 1% NP-40 zugegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wird dem Ansatz 0,4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugegeben und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird nun bei 15 000 rpm 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird auf ein Volumen von 4 ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit 40 ml Aceton gemischt. Die Fällung der Histone erfolgt bei Raumtemperatur über Nacht und ausgefallenes Salz wird nach dieser Inkubation durch Zugabe von max 10 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Der Ansatz wird auf zwei Corex-Röhrchen verteilt und bei 9000 rpm 40 min und 15 °C zentrifugiert. Der Überstand wird gewaschen und das Pellet mit 1 ml Aceton gewaschen und im Anschluß getrocknet. Danach wird das Histonpellet mit 200 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und Histone erneut mit 1,5 ml Aceton über Nacht gefällt. Erneute Zentrifugation bei 9000 rpm 40 min und 15 °C resultiert in einem Histonpellet, welches in 500 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen werden kann. 100 µl Histonlösung besitzen ungefähr 500000 cpm was 0,1 Acetat pro Histonprotein entspricht. 1 µl wird in 5 ml Szintillationslösung pipettiert und 5 µl der Histonlösung auf ein SDS-Gel aufgetragen.

## **2.27 Histondeacetylasetest**

HDAC Puffer: 50 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 mM DTT, 0,01 % NP40.

Extraktionslösung: 0,1 M HCl mit 0,16 M ACOH; Essigsäure-aethylester

Die verwendeten GST-Fusionsproteine, werden mit reduziertem Glutathion von der Agarose-Matrix eluiert. 60 µl dieser GST-Fusionen werden mit 2 µl <sup>3</sup>H Histonsubstrat für 2,5 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Gegebenenfalls wird dem Ansatz noch ein Histondeacetylaseinhibitor (100 mM TSA) zugegeben. Nach dieser Inkubation werden die freien <sup>3</sup>H Acetylgruppen mit 50 µl 0,1 M HCl mit 0,16 M ACOH und 600 µl Essigsäure-aethylester extrahiert. Dazu wird der Ansatz kurz gevortext und 5 min bei Raumtemperatur schütteln gelassen und anschließend 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. 500 µl der oberen Phase werden zu 4 ml Rotizint pipettiert und im Szintillationszähler gemessen.

## **2.28 Biacore**

Mit der Biacore-Technologie kann eine Protein-Protein-Interaktion festgestellt werden. Ein Bindungspartner wird auf einen Sensorchip gebunden und im Anschluss fließt dann in einer Flusszelle Lösung des anderen Partners über den Sensorchip. Eine Optik misst über die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) wie viel Masse zu jedem Zeitpunkt an den Chip gebunden ist. Interagieren die Proteine, erhöht sich die Masse an der Oberfläche des Sensorchips (Assoziation). Die Masse fällt wieder während der Dissoziation. Mit der SPR werden die Veränderungen der Masse an der Oberfläche des Sensorchips durch Messung des Brechungsindex während der Assoziation und Dissoziation gemessen. Die so gewonnenen Daten werden in einem Sensogramm, in der Einheit RU dargestellt (Relative response; 1 pg protein /mm<sup>2</sup>). Es wurde das Biacore®X Gerät verwendet.

### **2.28.1 Bindung von GST-Fusionen über α-GST-Antikörper**

Mit diesem Kit können GST-Fusionsproteine über die Bindung an einen immobilisierten α-GST-Antikörper auf einen Chip auf die Interaktion zwischen dem Fusionsprotein und dem Bindungspartner untersucht werden. Die Bindung des Fusionsproteins an den α-GST-Antikörper ist stabil (typische Dissoziationsrate <3 RU/min bei einem Bindungslevel von 1000 RU)

Der Kit enthält

Ziege α-GST-Antikörper, affinitätsgereinigt und steril filtriert 0,8 mg/ml in 150 mM NaCl

Rekombinantes GST (*Schistosoma japonicum*), 0,2 mg/ml in HBS Puffer (10 mM Hepes pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% (v/v) Surfactant P20)

Coupling Lösung (10 mM Na-acetate pH 5,0)

Regenerationslösung (10 mM Glycin pH 2,2)

Weiterhin wird der Amine Kopplungskit (BR-1000-50) und der CM5 Chip benötigt

- 1 Der α-GST-Antikörper wird auf 30 µg/ml in Kopplungslösung (3 µl α-GST-Antikörper + 77 µl Kopplungslösung) verdünnt.
- 2 Immobilisierung des α-GST-Antikörper auf dem CM5 Sensorchip

- gewählte Flußrate 5 µl/min
- Aktivierung des Chips mit 30 µl NHS/EDC Lösung
- Bindung von 35 µl α-GST-Antikörper
- Deaktivierung mit 35 µl Ethanolamine

Eine typische Immobilisierungsrate unter diesen Bedingungen bei 25 °C sind 10000 RU.

Das GST-Fusionsprotein lag in einer Konzentration von 50 µg/µl in sterilfiltriertem PBS Puffer vor. 30 µl dieser Lösung wurden mit einer Flußrate von 5µl/min über die Flusszelle Fc2 geleitet.

Für Bindungsstudien wurden 30 µl Bindungspartner in PBS/500 mM NaCl mit einer Flußrate von 5µl/min über beide Flusszellen (Fc1 und Fc2) geleitet.

Die Regeneration des Chips erfolgte mit Regenerationslösung. Der Chip konnte danach für eine neue Messung verwendet werden. Siehe auch BIAapplications ([www.biacore.com](http://www.biacore.com))

## **2.29 Methoden im Hefe-Zwei-Hybrid-System**

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ermöglicht es, Protein-Protein-Interaktionen in zellulären Systemen zu untersuchen. Das zentrale Element des Hefe-Zwei-Hybrid-System ist das Protein GAL4, ein Hefe-Transkriptionsfaktor, der aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer Aktivierungsdomäne besteht. Um die Transkription auszulösen, bedarf es lediglich der räumliche Nähe der beiden Domänen. Diese Tatsache macht man sich in einem Zwei-Hybrid-Screen zunutze, indem man miteinander interagierende Proteine mit den beiden Domänen fusioniert und über die Wechselwirkungen der Fusionsproteine einen vollständigen Transkriptionsfaktor regeneriert. Dieser ermöglicht dann die Transkription von Selektionsmarkergenen. Im verwendeten Hefestamm AH109 kodieren diese Reportergene jeweils für ein Protein der Adenin- und Histidin- (*ADE2*, *HIS3*) und stellen bei Transkription von “Gal4-response-Elementen” das Wachstum auf den jeweiligen Selektivmedien sicher. Über die Stärke der Promotoren läßt sich die Stärke der Protein-Protein-Wechselwirkung bestimmen. Im vorliegenden Fall besitzt *ade2* einen starken, *his3* einen schwachen Promotor.

### **2.29.1 Lösungen und Medien**

SD (Synthetic Dropout)-Medium  
(Flüssig-Selektionsmedium):

1,7g YNB (Yeast Nitrogen Base)  
5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0,59 g CSM-Aminosäuremix

YPD-Medium (Vollmedium):

YPD-Medium der Firma Bio101

DOBA (Dropout base agar)  
Medium zur Herstellung von  
Selektionsagarplatten)

DOBA Basis der Firma Bio101 mit  
entsprechendem CSM-Aminosäuremix

### 2.29.2 Transformation von Plasmiden in *S. cerevisiae*

LiAc/TE : 100 mM LiAc pH7,5, 10 mM Tris, 1 mM EDTA  
LiAc/TE/PEG: 100 mM LiAc pH7,5, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 40% PEG  
4000

Für die Transformation von Plasmiden in Hefe werden mehrere Kolonien des AH109-Stammes in 1 ml YPD resuspendiert und stark gevortext. Anschließend wird der Ansatz in 50 ml YPD überführt und bei 30 °C 18-24 h zu einer  $OD_{600} > 1,5$  wachsen gelassen. Frische 150 ml YPD Medium werden mit der AH109 Hefestammsuspension so angeimpft, dass eine  $OD_{600} = 0,2-0,3$  erreicht wird. Der Ansatz wird bei 30° C auf eine  $OD_{600} = 0,5$  wachsen gelassen und dann für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 1000 x g zentrifugiert. Das Pellet wird in 15 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 1000 x g zentrifugiert. Das Pellet wird in 5 ml LiAc/TE-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Der Transformationsansatz aus

100 µg Träger-DNA (Lachs Sperm DNA: 10 mg/ml)  
0,1 µg Plasmid  
100 µl Hefesuspension  
600 µl LiAc/TE/PEG

wird 30 Minuten bei 30 °C und 15 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend 2 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µl TE Puffer resuspendiert und davon 70 µl auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Hefen werden 7 Tage bei 30°C inkubiert.

### 2.29.3 Transformation der Library-Vektoren in *S. cerevisiae*

Die Hefekolonien, die das Baitprotein exprimierten, werden für die Transformation der Library-Vektoren in 50 ml SD –L über Nacht kultiviert. Die Hefen werden mit 400 ml YPD bis zu einer  $OD_{600}$  von  $0,5 \pm 0,1$  angezogen, 2 min bei 2.000 rpm zentrifugiert und das Pellet zweimal mit Wasser und einmal mit LiAc/TE-Puffer gewaschen. Die Zellen werden in 10 ml LiAc/TE aufgenommen.

Der Transformationsansatz (verteilt auf 10 Ansätze a 2ml):

50 µg Library-DNA  
1 mg Träger-DNA (Lachs Sperm DNA: 10 mg/ml))  
1 ml Hefesuspension  
6 ml LiAc/TE/PEG-Puffer

wurde 30 min bei 30 °C und 15 min bei 42 °C inkubiert. Die Zellen werden 5 min bei 3.500 rpm zentrifugiert, die Einzelansätze vereinigt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird in 10, ml TE Puffer resuspendiert und je 200 µl auf große DOBA –LTH Platten ausplattiert. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) der Zellen, die auf DOBA –LT Platten ausplattiert werden, konnte die Transformationseffizienz berechnet werden.

### 2.29.4 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen

Lysispuffer: 8 M Urea, 5% SDS, 40 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 mM EDTA,  
0,4 g/ml Bromphenolblau, 0,7% β-Mercaptoethanol, Protease-Inhibitoren

Die Bait-Proteinextrakte aus Hefe werden zum Nachweis der Expression des Baitproteins benötigt. Die transformierten Klone werden in 5 ml SD –L über Nacht kultiviert und am nächsten Tag in 50 ml YPDA angezogen bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wird. Für den weiteren Versuch werden 20 OD-Einheiten verwendet, welche mit Eis 5 min bei 1000 xg bei 4 °C zentrifugiert werden. Das Pellet wird mit kaltem Wasser gewaschen und der Ansatz erneut zentrifugiert. Die Zellen werden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert. Der Hefelysispuffer wird auf 60 °C vorgewärmt und je 200 µl zu den gefrorenen Zellen gegeben. Ebenfalls vorgewärmte Glas-Perlen (400 µl) werden dem Ansatz beigefügt und dieser für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach 10 min werden die Ansätze auf Eis gekühlt und einzeln für 1 min gevortext. Die lysierten Zellen werden bei 4 °C für 5 min mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, auf Eis gelagert und das Pellet mit 100 µl Lysispuffer erneut bei 95 °C für 5 min inkubiert. Der Ansatz wird wie oben zentrifugiert und der Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. Es werden 40 µl des Ansatzes aufgekocht, auf ein 12 prozentiges Gel aufgetragen und die Proteinexpression im Western Blot mit einem Antikörper gegen die Gal4-DNA-Bindedomäne nachgewiesen.

### **2.29.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae***

Die DNA-Isolierung aus Hefezellen wird mit Hilfe des Yeast plasmid extraction Kit der Firma BIO 101 durchgeführt.

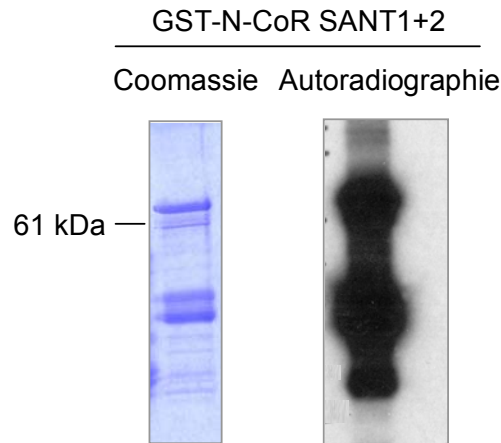
## 3 Ergebnisse

Der Korepressor N-CoR ist an der Repression nukleärer Hormonrezeptoren beteiligt. Neben drei autonomen Repressionsdomänen (RI-RIII) und einer zweigeteilten Rezeptorinteraktionsdomäne (NID) besitzt das Protein zwei uncharakterisierte SANT-Domänen. Diese etwa 50 Aminosäure großen Domänen sind zwischen Repressionsdomäne I und II lokalisiert. Der Name der SANT-Domäne leitet sich von vier Proteinen (SWI2, ADA2, N-CoR und TFIIB) ab, in denen diese Domäne erstmals beschrieben wurde (Aasland et al., 1996). Bei näherer Betrachtung SANT-Domänen enthaltender Faktoren fällt auf, dass diese überwiegend Funktionen in der Transkription oder in der Modifikation von Chromatin wahrnehmen. Die Funktion der SANT-Domäne in so unterschiedlichen Proteinen (Aktivatoren und Repressoren) ist noch nicht ausreichend geklärt und bedarf weiterer Forschung. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die SANT-Domänen des Korepressors N-CoR näher charakterisiert und es konnte festgestellt werden, dass diese Interaktionen mit anderen Proteinen ermöglichen und darüber hinaus die Histonbindung vermitteln können.

### 3.1 Far-Western-Blot Hybridisierung

#### 3.1.1 Sonde für die Far-Western-Blot Hybridisierung

In einer Far-Western-Blot Hybridisierung wurde zunächst untersucht, inwiefern die SANT-Domänen von N-CoR in Protein-Protein Interaktionen involviert sind. Zunächst wurde durch Restriktionsverdau aus einer N-CoR cDNA ein Fragment der SANT1+2-Domänen isoliert (As 425 bis 758) und anschließend in den Vektor pGEX kloniert. Dieser Vektor ermöglichte eine induzierte bakterielle Expression von N-CoR SANT1+2 als GST-Fusionsprotein (Glutathion-S-Transferase). Die Reinigung des Fusionsproteins aus dem Bakterienextrakt erfolgte über GST-Bindung an eine Glutathion-Agarosematrix (Beads) (Abb. 3.1). Der Aminosäurebereich zwischen GST und dem Fusionspartner enthält eine Proteinkinasestelle, so dass das gereinigte GST-Fusionsprotein mit dem Enzym Proteinkinase A und  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP radioaktiv markiert werden konnte. Nach der Markierungsreaktion wurde das N-CoR SANT1+2 Protein mit reduziertem Glutathion von der Matrix eluiert. Die erfolgreiche radioaktive Markierung (Phosphorylierung) des Proteins wurde durch Auftrennung auf einem SDS-Gel und anschließende Autoradiographie festgestellt (Abb. 3.1). Die Effizienz der radioaktiven Markierung konnte durch Messung im Szintillationszähler bestimmt werden. Für eine Hybridisierung wurden 250 000 cpm/ ml der Sonde verwendet.



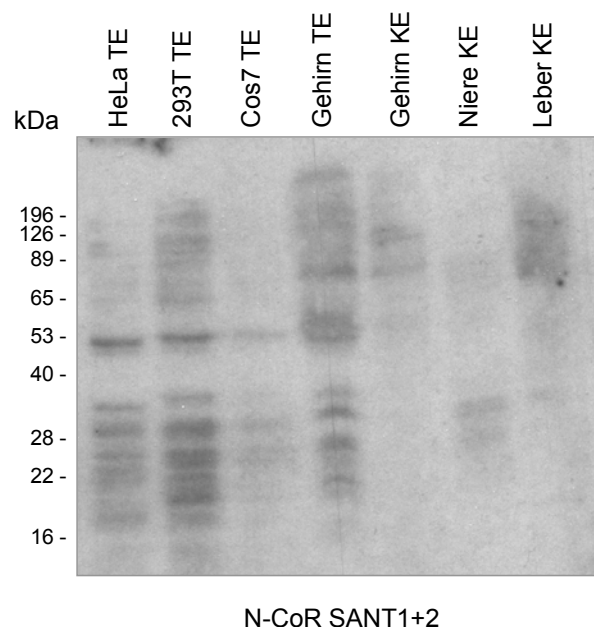
**Abb. 3.1: Sonde für die Far-Western-Blot Hybridisierung**

GST-N-CoR-SANT1+2 wurde in *E. coli* BL21codon+ exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte nach Lyse der Bakterien mit einer Glutathion-Agarosematrix (Beads). 20  $\mu$ l dieser Beads wurden mit 2 $\times$ Lämmli Puffer aufgekocht und im Anschluss auf ein SDS-Gel aufgetragen. Proteine im Gel wurden mit Coomassie Blau gefärbt. Das GST-N-CoR-SANT1+2 Protein hat ein Molekulargewicht von 62 kDa, Banden mit geringerem Molekulargewicht stellen Abbauprodukte des Proteins dar. GST-N-CoR-SANT1+2 wurde mit  $^{32}$ P $\gamma$ ATP und Rinderherzkinase A für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Elutionspuffer mit reduziertem Glutathion wurde 10 Minuten auf den Beads inkubiert und das Fusionsprotein in Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden im Szintillationszähler gemessen und 10 000 cpm der stärksten Fraktion auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde getrocknet und ein Röntgenfilm für 12 h aufgelegt und danach entwickelt.

### 3.1.2 Far-Western-Blot Hybridisierung mit der N-CoR SANT1+2-Domäne

Die Far-Western-Blot Hybridisierung zeigt direkte Interaktion zwischen transferierten Membranproteinen und der Sonde (N-CoR SANT-Domänen) an. Extrakte aus verschiedenen Zelllinien (HeLa, 293T und Cos7) und Geweben (Gehirn, Niere und Leber der Maus) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach ihrem Molekulargewicht durch Elektrophorese getrennt. Die separierten Proteine wurden im Anschluss auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde anschließend mit GST-Totalextrakt geblockt, um unspezifische Interaktionen der GST-Sonde mit Proteinen der Extrakte zu verhindern. Nach dieser Behandlung wurde die radioaktive GST-N-CoR SANT1+2 Sonde (250 000 cpm je ml Lösung) mit der Membran inkubiert. Nach dem Waschen der Membran wurde diese getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Methode der Far-Western-Blot Hybridisierung zeigt Interaktionen der Sonde mit Proteinen auf der Membran an. Die Detektion dieser Interaktionen wird über die Schwärzung des Röntgenfilms sichtbar. 293T und HeLa Extrakte zeigten ein ähnliches Bandenmuster in dieser Hybridisierung mit der N-CoR SANT1+2-Domäne (Abb. 3.2). Mehrere Proteinbanden waren im Bereich von 15 kDa bis über 200 kDa zu sehen. Proteine mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, 22 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 53 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 90 kDa und 120 kDa zeigten eine starke Interaktion mit der N-CoR SANT1+2-Domäne. Hingegen waren

deutlich weniger Proteine im Cos7 Totalextrakt enthalten, die mit der N-CoR Sonde interagierten. Totalextrakt und Kernextrakt aus Mäusegehirn ergaben in der Far-Western-Blot Hybridisierung unterschiedliche Bandenmuster. Der Totalextrakt aus diesem Gewebe enthielt deutlich mehr Interaktionsproteine als der nukleäre Extrakt. Die Proteine hatten ein Molekulargewicht von 20 kDa bis deutlich über 200 kDa. Im Kernextrakt konnte man drei bedeutende Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 70 kDa, 89 kDa und 95 kDa erkennen. Die Kernextrakte aus der Mäuseniere und Mäuseleber ergaben lediglich schwache undefinierte Proteinbanden mit der N-CoR SANT1+2-Domäne. Die Far-Western-Blot Hybridisierung zeigte, dass im Totalextrakt verschiedener Zellkulturzellen (HeLa und 293T) und im Mäusegehirnextrakt potentielle Interaktionsproteine der N-CoR SANT1+2-Domäne enthalten sind.



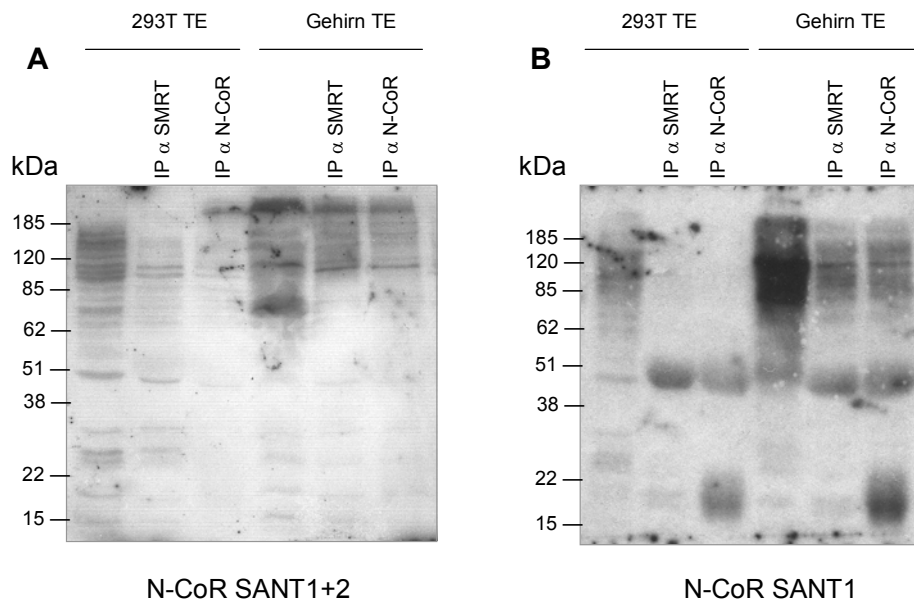
**Abb. 3.2: Far-Western-Blot Hybridisierung mit der N-CoR SANT1+2-Domäne**

Totalextrakte (TE) und Kernextrakte (KE) aus Zellkulturen (HeLa, 293T und Cos7) oder Geweben (Gehirn, Niere und Leber der Maus) wurden auf einem SDS-Gel durch Elektrophorese getrennt und im Anschluss an den Gellauf auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit bakteriellem GST Extrakt für eine Stunde geblockt. 250 000 cpm/ml der N-CoR SANT1+2 Sonde wurden 4h bei 4°C inkubiert und anschließend 4 mal gewaschen. Interaktionen zwischen der Sonde und Proteinen aus Extrakten wurde durch Auflegen eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

HeLa Zelleextrakte und Maus Gehirnextrakte wurden mit  $\alpha$ N-CoR und  $\alpha$ SMRT Antikörpern und Protein A/G Sepharosematrix immunopräzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach dem Gellauf auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit Guanidin-Hydrochlorid zuerst denaturiert und anschließend wieder renaturiert, um eine möglichst native Konformation der Proteine auf der Membran zu erreichen. Die Sonden (N-CoR



SANT1+2 / N-CoR SANT1) wurden mit den Membranen inkubiert und die Membran für mehrere Stunden im Anschluss gewaschen. Nach dem Trocknen der Membranen wurde ein Röntgenfilm aufgelegt (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3: Far-Western-Blot Hybridisierung mit N-CoR SANT1+2 und N-CoR SANT1**

$\alpha$ N-CoR und  $\alpha$ SMRT Antikörper Immunopräzipitationen (IP) (293T oder Gehirn Totalextrakte) und Totalextrakte (TE) als Ladekontrolle wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Proteine auf der Membran wurden mit 8 M Guanidin-Hydrochlorid denaturiert und stufenweise mit 4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M, 0,25 M und 0,123 M Guanidin-Hydrochlorid wieder renaturiert. Die Membran wurde mit GST Extrakt für eine Stunde geblockt. 250 000 cpm/ml der N-CoR SANT1+2 (**A**) oder N-CoR SANT1 (**B**) Sonde wurden 12 h bei 4°C inkubiert und die Membran anschließend für mehrere Stunden gewaschen. Ein Röntgenfilm wurde zur Detektion aufgelegt und dieser nach 12 h entwickelt.

Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht wurden in den Hybridisierungen sichtbar. Im HeLa Gesamtzell-extrakt waren ungefähr 20 verschiedene Proteine mit einem Molekulargewicht von 15 kDa bis 185 kDa mit der N-CoR SANT1+2-Domäne auszumachen. Die Immunopräzipitation mit  $\alpha$ N-CoR und  $\alpha$ SMRT Antikörper zeigte ein ähnliches Muster; dies traf für beide Extrakte zu (HeLa-TE und Gewebeextrakt). Im Gewebeextrakt gab es Proteine mit einem höheren Molekulargewicht, die mit der N-CoR SANT1+2-Domäne interagierten (90-300 kDa). Die N-CoR SANT1 Sonde zeigt in der IP mit  $\alpha$ N-CoR und  $\alpha$ SMRT Antikörper im 293T Extrakt keine Proteininteraktionen. Im Mäuse-Gehirnextrakt zeigte sich jedoch ein ähnliches Proteinmuster, wie mit der SANT1+2 Sonde (Abb. 3.3 B). Mehrere potentielle Interaktionspartner wurden mit der Far-Western-Blot Hybridisierung detektiert. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die N-CoR SANT-Domänen Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Zur Identifikation potentieller Interaktionspartner wurde

deshalb ein Far-Western Hybridisierungsscreen und ein Hefe-Zwei-Hybrid Screen durchgeführt.

## 3.2 Identifikation von Interaktionspartnern des Korepressors N-CoR

### 3.2.1 Hefe-Zwei-Hybrid Screen mit der N-CoR SANT1+2-Domäne

Die verwendeten Phagen-Expressionsbanken (murine cDNA Expressionsbank, embryonaler Tag 13,5 aus Gewebe der Hirnanhangdrüse oder murine cDNA Expressionsbank aus Milzgewebe, 8.-12. Woche) besaßen hohe Diversitäten und die einzelnen Experimente erzielten gute Effizienzen ( $2 \times 10^6$  unabhängige cDNAs je Screen). Die Far-Western Hybridisierungsscreene ergaben trotzdem in mehreren durchgeführten Versuchen mit der N-CoR SANT1+2 Domäne keine Klone, die sich in weiteren Screeningrunden amplifizieren ließen. Der Far-Western Hybridisierungsscreen eignete sich demnach nicht zur Identifizierung von Interaktionspartnern der N-CoR SANT-Domänen.

Im Gegensatz zu dieser *in vitro* Methode, in der die Proteine der Phagen-Expressionsbank durch Bakterien exprimiert werden, liegen in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen die Proteine der Expressionsbank in einer nativen Proteinkonformation vor. Zudem können posttranslationale Modifikationen der Proteine in der Hefe erfolgen, die in Bakterien nicht existieren. In einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen wird eine Domäne oder eine Region eines Proteins mit der Gal-DNA-Bindungsdomäne (Gal-DBD) fusioniert. Die Größe des fusionierten Proteins sollte aus Gründen der Proteinstruktur nicht unter 50 Aminosäuren liegen. Für diesen Hefe Screen wurde der Aminosäurebereich 429 bis 683 von N-CoR gewählt (Abb. 3.4). Dieser Bereich enthält die zwei N-CoR SANT-Domänen und das coiled-coil Motiv.

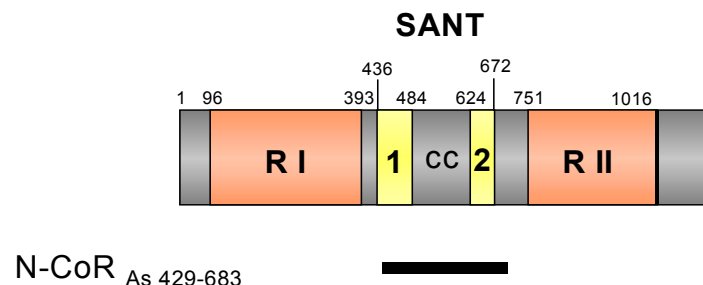
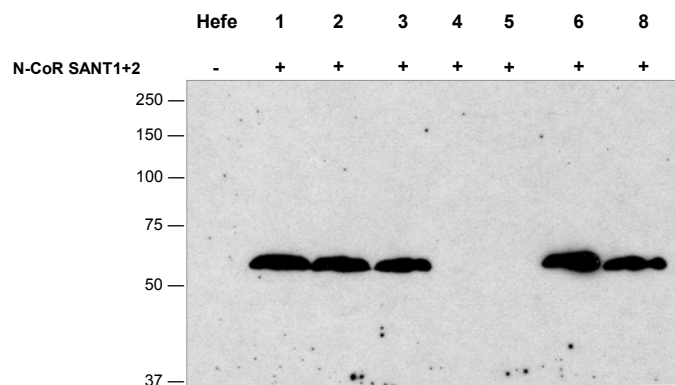


Abb. 3.4: Baitkonstrukt (Köder) N-CoR SANT1+2 (As 429-683) im Hefe-Zwei-Hybrid Screen

Als Baitkonstrukt (Köder) für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurde die Region zwischen Aminosäure 429 und 683 in N-CoR gewählt. In diesem Bereich befinden sich die beiden SANT-Domänen (SANT1 und SANT2) und die Linkerregion mit dem coiled-coil Motiv (cc; Aminosäure 506-543). Aminoterminal grenzt die Repressionsdomäne I (R I; Aminosäure 96-393) an die SANT1-Domäne, und carboxyterminal von der SANT2-Domäne ist Repressionsdomäne II (R II; Aminosäure 751-1016) lokalisiert.

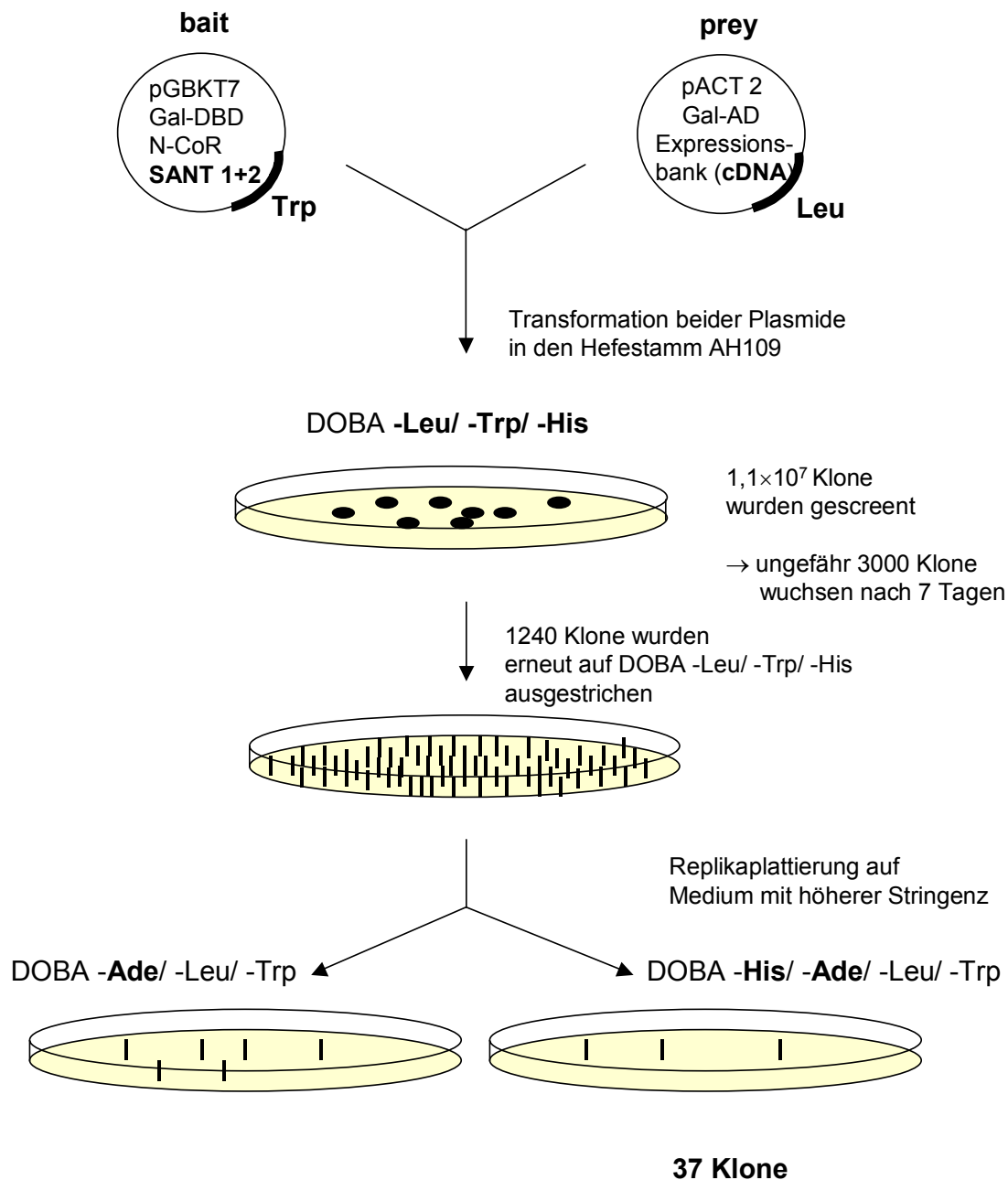
Das entsprechende Fragment wurde mittels PCR aus einer Maus N-CoR cDNA amplifiziert. Die Primer enthielten Restriktionsschnittstellen, so dass nach dem Restriktionsverdau das Fragment in den Hefe-Expressionsvektor pGBKT7 (Bait-Vektor) kloniert werden konnte. Der so generierte Bait-Vektor N-CoR SANT1+2 (Köder) wurde in den *S. cerevisiae* Stamm AH109 transformiert und Hefen mit dem Vektor pGBKT7 auf Medium (DOBA -Leucin) selektiert. Die korrekte Proteinexpression von N-CoR SANT1+2 wurde durch das Herstellen von Hefeextrakten und anschließendem Western Blot mit einem  $\alpha$ Gal4-DBD Antikörper überprüft (Abb. 3.5). Der Klon, der die beste Expression zeigte, wurde für den nachfolgenden Screen verwendet. Vor der Transformation der Expressionsbank wurde der Klon zusätzlich auf die autonome Aktivierung der Reportergene ( $\beta$ -Galactosidase, -Adenin, -Histidin) untersucht. Hefen die auf DOBA -Leucin wuchsen, konnten auf entsprechenden Selektionsplatten (DOBA -Adenin, DOBA -Histidin) nicht wachsen und der Blau-Weiß-Test für die Expression von Galactosidase war in der Hefe negativ. Das Baitkonstrukt N-CoR SANT1+2 aktiviert die Reportergene nicht und konnte in dem Hefestamm AH109 für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen verwendet werden.



**Abb. 3.5: Western Blot zur Überprüfung der N-CoR SANT1+2 Expression in der Hefe**

Nach Transformation des Bait-Vektors pGBK T7 N-CoR SANT1+2 wurde aus Klonen, die auf DOBA -Leucin wuchsen, Hefeextrakte hergestellt. 10  $\mu$ l dieser Extrakte wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteinexpression des Baitkonstrukts durch Western Blot mit dem Antikörper gegen  $\alpha$ Gal4-DNA-Bindungsdomäne überprüft. Fünf der sieben untersuchten Klone zeigen Expression von Gal-DBD-N-CoR SANT1+2 (Hefe 1, 2, 3, 6 und 8). Hefeextrakt aus untransfizierten Zellen diente als Negativkontrolle

Eine murine embryonale Expressionsbank (pACT2; Pray-Vektor (Beute)) wurde in diesen Gal-N-CoR SANT1+2 Domänen exprimierenden Hefestamm transformiert. Die Expressionsbank besaß eine theoretische Diversität von  $3,5 \times 10^6$  unterschiedlichen cDNAs. Der Transformationsansatz wurde auf fünfzig 15 cm DoBA -His-Leu-Trp Platten ausgestrichen. Die erste Selektion erfolgte unter mäßig stringenten Bedingungen, da vorangehende Transformationen zeigten, dass kein Hefewachstum unter höchster Stringenz (DOBA -HALT) mit N-CoR SANT1+2 als Bait erfolgte.



**Abb 3.6: Schema des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens**

Der Vektor pGBK T7 N-CoR SANT1+2 wurde in den Hefestamm AH109 transformiert und auf DOBA -Leucin (-Leu) Platten selektiert. Die Hefe zeigte mit dem N-CoR SANT1+2 Konstrukt keine autonome Aktivierung der Reportergene (Galactosidase, Adenin, Histidin). 500 µg der Maus embryonalen cDNA-Library wurde in den Hefestamm AH109 N-CoR SANT1+2 transformiert und auf DOBA -Leucin -Tryptophan -Histidin ausgestrichen. Von den 3000 resultierenden Klonen wurden nahezu die Hälfte erneut auf DOBA -Leu-Trp-His ausgestrichen und danach auf DOBA -Leu-Trp-Adenin oder DOBA -Leu-Trp-His-Ade replikaplattiert. 37 Hefeklone zeigten Wachstum unter diesen stringenten Bedingungen.

Insgesamt wurden 1,1×10<sup>7</sup> Klone untersucht, dies entspricht etwa einer dreifachen Abdeckung der Diversität der Expressionsbank. Nach 7 Tagen Inkubation bei 30 °C auf DOBA -His-Leu-Trp wuchsen ungefähr 3000 Hefeklone (Abb. 3.6). Von diesen

wurde annähernd die Hälfte (1240 Klone) auf stringenteres Medium DOBA -ALT und DOBA -HALT ausgestrichen. Unter dieser hohen Stringenz konnten lediglich noch 37 Klone wachsen. Die Expressionsbankplasmide wurden aus den einzelnen Hefeklonen isoliert und die DNA in den *E. coli* Stamm DH10B durch Elektroporation transformiert. Die Selektion zwischen Bait- und Expressionsbank-Vektor erfolgte aufgrund unterschiedlicher Antibiotikaresistenzen. Auf LB Ampicilin Platten konnten nur Bakterien mit den Ampicilin Resistenz vermittelnden Prey-Vektoren wachsen. Nach der Isolierung der Vektor-DNA aus den Bakterien erfolgte ein Restriktionsverdau zur Überprüfung der cDNA Fragmente. Die isolierten Prey-Vektoren enthielten cDNAs mit einer Größe von 800-3000 Basenpaaren. Die cDNA der isolierten Vektoren wurde mit einem Primer gegen die GAL4-Aktivierungsdomäne sequenziert.

### 3.2.2 Interaktionspartner im Hefe-Zwei-Hybrid Screen

17 verschiedene cDNAs, die für 14 Proteine kodieren, konnten im Screen isoliert werden (Tab. 1). PIAS1, Ubc9 und Thymin DNA Glycosylase wurden jeweils mit zwei verschiedenen unabhängigen cDNAs gefunden. Bei sieben Proteinen (PIAS1, TDG, Pc2, Ubc9, CGBP, Hoxa-4 und TAF<sub>II</sub>250) handelte es sich um nukleäre Proteine, die eine Rolle in der Transkription spielen oder zu den chromatinassoziierten Faktoren zählen. Die Proteine  $\alpha$ -Actinin 2, eIF3 und Alpha Fetoprotein haben eine zytoplasmatische Lokalisation, dies trifft mit großer Wahrscheinlichkeit auch für die cDNA I zu. Für BTBD1, RanBP9 und die cDNA II kann keine Aussage getroffen werden, da keine Hinweise aus der Literatur bekannt sind. Insgesamt 9 mal wurde der Klon cDNA I gefunden. Als zweithäufigster Klon ist  $\alpha$ -Actinin 2 (5 mal) zu nennen, gefolgt von PIAS1, BTBD1 und Thymin DNA Glycosylase (jeweils 4 mal). RanBP9 und Ubc9 wurden insgesamt jeweils in zwei Hefeklonen als Interaktionspartner isoliert. Alle anderen Klone wurden nur einmal im Screen charakterisiert.

Die isolierten Library-Plasmide wurden zur Kontrolle in den Hefestamm AH109 N-CoR SANT1+2 oder in einen Hefestamm der lediglich die Gal4-DNA Bindungsdomäne exprimiert, retransformiert. Der Transformationsansatz wurde auf DOBA -Ade-Leu-Trp und DOBA -Hist-Ade-Leu-Trp ausgestrichen. Die Retransformation der Klone cDNA I und  $\alpha$ -Actinin 2 zeigte in dem Hefestamm, der lediglich die GAL4-DNA Bindungsdomäne exprimierte ebenfalls Wachstum. Allerdings waren die Retransformanden von cDNA I im Blau-Weiß-Test negativ.  $\alpha$ -Actinin 2 zeigte in der Retransformation in den Gal-DBD exprimierenden Hefestamm Wachstum und  $\beta$ -Galactosidase Aktivität. Die Transformation von eIF3 und der cDNA II ergab weder mit den Hefen der Baitkonstrukte noch mit dem Gal4-

DBD exprimierendem Hefestamm Klone. Die Proteine  $\alpha$ -Actinin 2 und eIF3 wurden in die weitere Experimente nicht mehr einbezogen. Alle anderen Interaktionspartner wuchsen nur in den Hefen mit den transformierten Baitkonstrukten und zeigten im Blau-Weiß-Test spezifische  $\beta$ -Galactosidase Aktivität.

Protein	Häufigkeit	unabhängige cDNAs	$\beta$ -Gal.-Test
<b>cDNA I</b> (Nr.: 5330404D19) Gocap1/Pap 7	9	1	+++
<b><math>\alpha</math>-Actinin 2</b>	5	1	++
<b>PIAS1</b> (protein inhibitor of activated STAT protein)	4	2	+++
<b>TDG</b> (thymine DNA glycosylase)	4	1	++
<b>BTBD1</b> (BTB (POZ) domain containing 1)	4	2	++
<b>Ubc9</b> (ubiquitin conjugating enzyme E2)	2	2	+
<b>RanBP9</b> (Ran-binding-protein 9)	2	1	+++
<b>Pc2</b> (chromobox homolog 4)	1	1	++
<b>CGBP</b> (CpG binding protein)	1	1	++
<b>Hoxa-4</b> (Homeobox protein Hox-A4)	1	1	+
<b>TAF<sub>II</sub>250</b> (TBP associated Factor 250)	1	1	-
<b>eIF3 p40</b> (Eukaryotic translation initiation factor 3)	1	1	++
<b>AFP</b> (Alpha Fetoprotein)	1	1	-
<b>cDNA II</b> (FLJ20734 fis)	1	1	-

**Tabelle 3.1: Liste der Interaktionspartner**

14 Proteine konnten durch Sequenzierung der cDNA identifiziert werden, insgesamt wurden 17 verschiedene cDNAs gefunden. Drei der Proteine (PIAS1, TDG und Ubc9) wurden mit zwei unterschiedlichen cDNAs gefunden. Sieben Proteine wurden mehr als einmal im Screen identifiziert, die restlichen Proteine konnten jeweils nur in einem Hefeklon nachgewiesen werden. cDNA I, Pias 1 und RanBP9 zeigten eine sehr starke (+++), 6 Klone eine starke (++) und 2 eine schwache Blaufärbung (+) im  $\beta$ -Galactosidase-Test. TAF<sub>II</sub>250, AFP und die cDNA II waren negativ im  $\beta$ -Galactosidase-Test.

Auf den folgenden Seiten werden die Interaktionspartner der N-CoR SANT-Domänen näher charakterisiert:

### **Nukleäre Proteine / Transkriptionsfaktoren**

**Protein Inhibitor Of Activated STAT Protein (PIAS1)** gehört zur PIAS-Familie. In dieser Familie werden die vier Proteine PIAS1, PIAS3, PIASx ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Splicevariante) und PIASy zusammengefaßt. PIAS Proteine enthalten ein LXXLL Koregulator Motiv, welches als Interaktionsmotiv zwischen nukleären Hormonrezeptoren und Koregulatoren beschrieben ist. Das PIAS1 Protein wurde ursprünglich als spezifischer Inhibitor von STAT1 beschrieben. PIAS1 und PIAS3 blocken die DNA-Bindungsaktivität von aktivierten STAT1 und STAT3 und inhibieren so die STAT-vermittelte Transkription (Greenhalgh und Hilton, 2001; O'Shea et al., 2002). Für PIAS1 und PIASx wurde ferner eine SUMO-E3-Ligaseaktivität beschrieben (Kahyo et al., 2001; Nishida und Yasuda, 2002). Diese Proteine vermitteln und verstärken die Übertragung von SUMO auf Zielproteine. Vier Hefeklone enthielten PIAS1 cDNA. Eine der cDNAs kodierte ab Aminosäure 2 und die drei anderen cDNAs ab Aminosäure 99 des Proteins bis zum C-Terminus des Proteins.

**Ubiquitin-conjugating enzyme (Ubc9)** ist als einziges SUMO-E2-Konjugationsenzym in der SUMO-Übertragungskette beschrieben. Die Oberfläche von Ubc9 ist größtenteils positiv geladen und damit komplementär zur negativ geladenen Oberfläche des SUMO-Proteins. Ubc9 interagiert mit SUMO Substratproteinen. (Melchior, 2000). Zwei cDNAs, die den gesamten Proteinbereich abdecken, wurden im Hefescreen isoliert.

**Chromobox-homolog 4 (Pc2)** gehört zur Familie der Polycomb und Thrithorax Proteine. Neben einer Chromodomäne (**chromatin organisation modifier**) besitzt es einen zu anderen Polycomb Proteinen hochkonservierten Carboxyterminus. In transienten Reportertests wirkt Pc2 als transkriptioneller Repressor. Das Protein lokalisiert im Zellkern in bestimmten nukleären Aggregaten (Alkema et al., 1997). Pc2 wurde ebenfalls als spezifische SUMO-E3 Ligase des CtBP (**C-terminal binding protein**) Proteins beschrieben (Kagey et al., 2003). Eine cDNA dieses Proteins wurde isoliert (As 263 bis 551).

**Thymin DNA Glycosylase (TDG)** ist eine T:G spezifische Thymin DNA Glycosylase. Das Enzym leitet die Reparatur von G/T und G/U Fehlpaarungen ein, die häufig in methylierten CpG-Stellen im Chromatin vorkommen (Hardeland et al., 2001). Neben der DNA-Reparatur wurde für TDG die Interaktion mit

Transkriptionsfaktoren, wie c-Jun, CBP und RAR/RXR beschrieben (Um et al., 1998). Es tritt in transienten Transfektionen sowohl als Aktivator, im Fall von CBP, oder auch als Repressor im Fall von TTF-1 auf (Thyroid Transcription Factor-1) (Missero et al., 2001; Tini et al., 2002). Im Hefe-Screen wurden 4 cDNAs gefunden (zwei Klone codierten ab Aminosäure 1 und zwei ab Aminosäure 85).

**CpG-binding protein (CGBP)** bindet unmethylierte CpG Dinukleotide und ist im Nukleus in Aggregaten lokalisiert. Die Verteilung im Kern unterscheidet sich von heterochromatin-assoziierten Proteinen wie HP1, Methyl-CpG-binding Protein 1 und MBD2. CGBP bindet Chromatin in transkriptionell aktiven Bereichen (Euchromatin). Die DNA-Bindungs-Domäne von CGBP besteht aus einer cysteinreichen CXXC-Domäne, die ansonsten nur in wenigen anderen Proteinen wie Dnmt1, MBD1, humanem Trithorax-Protein und MLL-2 vorkommt. CGBP enthält ebenfalls zwei Kopien der PHD-Domäne (**plant homeodomain**), die in Proteinen enthalten ist, die eine Veränderung der Chromatinstruktur bewirken und somit Einfluss auf die Genexpression nehmen. (Carlone et al., 2002; Lee und Skalnik, 2002). Die cDNA codierte ab Aminosäure 32 des Proteins.

**Hoxa-4** gehört zu einer hochkonservierten Familie von Transkriptionsfaktoren, welche eine fundamentale Rolle in der embryonalen Morphogenese spielen. In den meisten Vertebraten existieren 39 HOX Gene, die in vier Gruppe (HOXA - HOXD) organisiert sind. HOX Proteine enthalten eine Homeodomäne, die eine spezifische DNA-Bindung vermittelt (Hughes und Kaufman, 2002). Die Interaktion mit anderen Homeodomänen-Proteinen (PBC-Familie) kann die DNA-Bindung mancher HOX Proteine verstärken. HOX-PBX Komplexe können reprimierend oder aktivierend auf die Transkription wirken, je nachdem ob Koaktivatoren oder Korepressoren im Komplex assoziiert sind (Lufkin, 1997). Die cDNA codierte ab Aminosäure 146 des Proteins.

**TBP assoziierter Faktor 250 (TAF<sub>II</sub>250)** ist die größte Untereinheit des TFIID Komplexes. Das Protein enthält zwei Bromodomänen und zwei Kinasedomänen. Die Bromodomäne bindet spezifisch acetylierte Lysine in den N-Termini von Histonen. Der Carboxyterminus und der Aminoterminus des Proteins enthält eine Kinasedomäne. TAF<sub>II</sub>250 gehört zu den basalen Transkriptionsfaktoren der RNA Polymerase II Transkription (Wassarman und Sauer, 2001). Die cDNA codierte ab Aminosäure 286 des Proteins.

**Ran-binding-protein 9 (RanBP9/RanBPM)** wurde ursprünglich als Interaktionspartner von Ran, einer kleinen Ras-ähnlichen GTPase beschrieben. RanBP9 hat ein Molekulargewicht von 90 kDa und zeigt eine nukleäre und



perinukleäre Lokalisation in verschiedenen Zelllinien (Nishitani et al., 2001). Die Funktion des Proteins ist unklar. Möglicherweise hat RanBP9 eine Rolle bei dem Ran-abhängigen nukleären Transport von Proteinen. Aufgrund der Interaktion mit der MET Rezeptor Protein Thyrosinkinase wird ebenfalls eine mögliche Rolle im Ras/ERK Signalweg diskutiert (Wang et al., 2002). RanBP9 interagiert ferner mit dem Glukokortikoid- und Androgenhormonrezeptor (Rao et al., 2002).

### **Zytoplasmatische Proteine**

**$\alpha$ -Actinin 2** gehört zu den Actininen, welche in die Superfamilie der Spectrine eingeordnet werden können. Alle Proteine dieser Familie binden Actin und enthalten eine spezifische Anzahl von Spectrin Wiederholungen.  $\alpha$ -Actinin besitzt 4 Spectrin Wiederholungen und ist ein Zytoskelettprotein (Dixson et al., 2003; Mills et al., 2001). Die cDNA kodiert ab Aminosäure 334 des Proteins.

**Eukaryotic translation initiation factor eIF3.** Das Protein spielt möglicherweise eine Rolle in der RNA Bindung und in der makromolekularen Zusammensetzung von Protein-RNA-Komplexen. Es hat eine molekulare Masse von 40 kDa (Asano et al., 2001).

**Alpha-Fetoprotein (AFP)** ist die Hauptkomponente im fetalen Serum von Säugern und gehört phylogenetisch zur Genfamilie der Serumalbumine (Deutsch, 1991). Das Protein wird in der Leber synthetisiert und dann in das Blutserum abgegeben. Nach der Geburt fällt der AFP Level im Blut drastisch ab. Eine höhere AFP Konzentration im adulten Blut kommt lediglich bei Leberkrebs und anderen leberschädigenden Einflüssen in adulten Säugern vor.

### **Proteine mit unbekannter Funktion**

**cDNA I** (Nr.: 5330404D19) Die isolierte Hefe cDNA ergab in einem BLAST-Vergleich mit einer Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) drei Ergebnisse. Es bestand die gleiche Homologie zu cDNA I, Golgi Komplex assoziiertem Protein 1 (Gocap1) und dem "Peripheral Benzodiazepine Receptor Associated Protein 7" (Pap7). Für das Protein Gocap1 liegt lediglich ein Datenbankeintrag vor. Funktionelle Daten sind für Gocap1 nicht bekannt. Ferner besteht Homologie zu dem Golgi resident Protein GCP60. Das humane GCP60 Protein hat eine Aufgabe im Proteintransport zwischen dem Endoplasmatischem Reticulum und dem Golgi Apparat (Sohda et al., 2001). Pap7 ist als Interaktionspartner des mitochondrialen Peripheren-Typ Benzodiazepine Rezeptors (PBR) und der zytosolischen PKA-RI $\alpha$

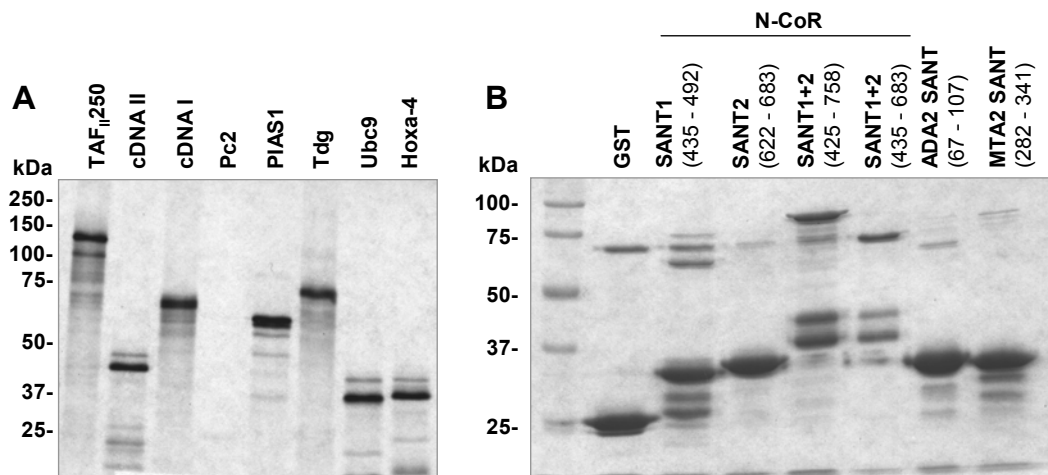
Einheit in einem Hefe-Zwei Hybrid Screen beschrieben (Hauet et al., 2002; Liu et al., 2003). Die 9 cDNAs waren identisch.

**BTB (POZ) domain containing 1 (BTBD1)** enthält eine POZ Domäne. Die POZ-Domäne kann sowohl homo- wie heteromerische POZ-POZ Interaktionen vermitteln und ist daher für Protein-Protein Interaktionen wichtig. Dieses Motiv findet sich häufig in Zinkfinger Proteinen und in einigen Actin-assoziierten Proteinen. Die POZ-Domänen-Proteine BCL-6, PLZF und ZF5 sind in Komplexen enthalten, die die Transkription von Zielgenen reprimieren (Collins et al., 2001). Ferner ist für diese Proteine ein Interaktion mit N-CoR beschrieben worden (Huynh und Bardwell, 1998). Für BTBD1 konnte eine Interaktion mit Topoisomerase I nachgewiesen werden. Die Funktion des Proteins ist noch nicht geklärt. Für BTBD2, ein homologes Protein von BTBD1 wurde eine zytoplasmatische Lokalisation beschrieben (Carim-Todd et al., 2001; Xu et al., 2002). Die cDNA codierte ab Aminosäure 142 bis zum C-Terminus des Proteins.

### 3.2.3 *In vitro* Proteininteraktionen mit den SANT-Domänen

In einem Pulldown Experiment sollten die Interaktionspartner des Hefescreens in einer *in vitro* Bindungsstudie untersucht werden. Hierfür mußten die Expressionsbank cDNAs in einen geeigneten Vektor kloniert werden. Alle cDNAs der Interaktionspartner waren mit der Gal-Aktivierungsdomäne des Vektors im gleichen Leseraster. Die Translation der cDNA im pACT2 Vektor nutzte das Startcodon der Gal-Aktivierungsdomäne; man konnte daher davon ausgehen, dass die gefundenen Interaktionsproteine in der Hefe korrekt exprimiert waren. Für die folgende Klonierung wurde diese Tatsache genutzt. Durch Restriktionsverdau des pACT2 Vektors konnte die Gal-AD und die entsprechende cDNA aus dem Vektor pACT2 geschnitten und in den Vektor pCDNA 3.1 kloniert werden. Dieser Vektor verfügte über einen T7 Promoter und ist für eine *in vitro* Transkriptions-Translationsreaktion (TNT) geeignet. Das Molekulargewicht der TNT-translatierten Proteine ist aufgrund der fusionierten GAL-Aktivierungsdomäne größer (ungefähr 26 kDa), als die eigentliche cDNA aus dem Screen (Abb. 3.7 A).

Die SANT-Domänen von N-CoR (1; 2; 1+2), MTA2 und ADA2 wurden mittels PCR aus cDNA amplifiziert und in den Vektor pGEX kloniert. Die Expression der GST-Fusionsproteine erfolgte in dem Bakterienstamm BL21codon + und die anschließende Reinigung über Glutathion-Agarosematrix (Abb. 3.7 B).

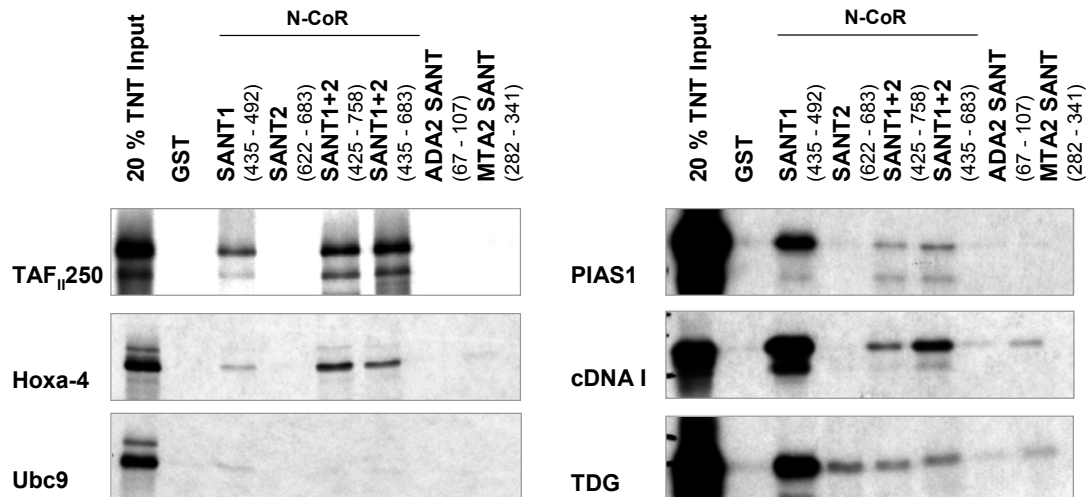


**Abb. 3.7: TNT Translation der cDNAs und bakterielle Expression der GST-SANT-Fusionsproteine**

(A) Die cDNAs der Interaktionspartner der N-CoR SANT1+2-Domäne wurden *in vitro* mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin TNT-translatiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde getrocknet und mittels Autoradiographie die Proteinbanden sichtbar gemacht. 9 Proteine wurden korrekt exprimiert, lediglich Pc2 konnte nicht exprimiert werden. (B) Die GST SANT Fusionsproteine wurden bakteriell in *E. coli* exprimiert und nach der Bakterienlyse und Ultrazentrifugation mit Glutathion-Agarosebeads aufgereinigt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem SDS-Gel und die exprimierten Proteine wurden mit Coomassie Blau sichtbar gemacht. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Proteinbanden abgeschätzt.

Die  $^{35}\text{S}$  markierten Proteine des Hefescreens wurden in einem *in vitro* GST Pulldown Experiment mit den GST-SANT-Fusionen von N-CoR, ADA2 und MTA2 inkubiert (Abb. 3.8). Als Negativkontrolle diente GST ohne Fusionsanteil. Die Proteine cDNA I, TAF<sub>II</sub>250, Hoxa-4, TDG, PIAS1 und Ubc9 interagierten spezifisch mit der SANT1-Domäne von N-CoR. Eine Interaktion der N-CoR SANT2-Domäne konnte lediglich mit Thymin DNA Glycosylase festgestellt werden. Lediglich eine sehr schwache Interaktion ergab sich zwischen der SANT1-Domäne von N-CoR und Hoxa-4, wohingegen die SANT1+2-Domäne stärker mit diesem Protein interagiert. Der Linkerbereich zwischen den SANT-Domänen in N-CoR ist möglicherweise für die Interaktion zwischen den Proteinen wichtig. Die SANT-Domänen von ADA2 und MTA2 interagierten lediglich schwach mit den Proteinen cDNA I und TDG.

Die Proteine BTBD1, CGBP, RanBP9 und Pc2 wurden nicht im GST Pulldown Experiment untersucht. Der Focus der Arbeit konzentrierte sich vielmehr auf die sechs Proteine TAF<sub>II</sub>250, Hoxa-4, TDG, Ubc9, PIAS1 und cDNA I, die mit der SANT-Domäne von N-CoR spezifisch interagierten.

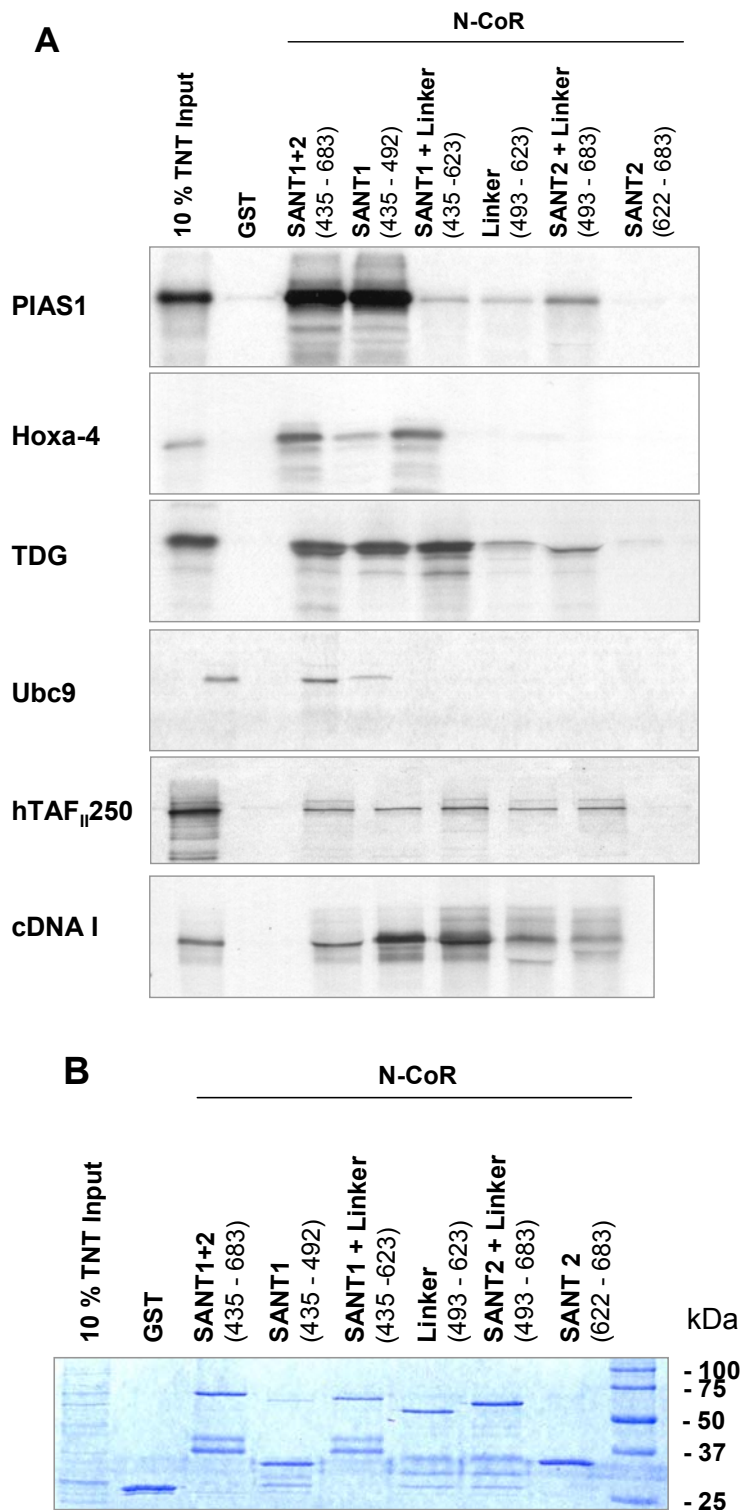


**Abb. 3.8: Pull-down-Experiment mit GST-SANT-Fusionsproteinen und Proteinen des Hefescreens**

SANT-Domänen von N-CoR, ADA2 und MTA2 wurden mit einer GST-Domäne fusioniert, in *E. coli* exprimiert und an Glutathion-Agarosebeads gebunden. 50  $\mu$ l der gereinigten Protein-Suspension und GST alleine wurde mit 2  $\mu$ l TNT translatierten Proteinen für 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 mal mit PPI Puffer gewaschen. Die Matrix wurde mit 2 x Lämmli Puffer aufgekocht und auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. 20 % des eingesetzten TNT Translatats wurde als Input-Kontrolle eingesetzt. Nach Trocknung des Gels wurde ein Röntgenfilm aufgelegt.

### 3.2.4 Eingrenzung des Interaktionsbereichs innerhalb der SANT1+2-Domäne

Die Interaktion zwischen den untersuchten Hefeklonen und der N-CoR SANT1+2-Domäne wurde weiter eingegrenzt. Für dieses GST-Pulldown Experiment wurden neue GST-Fusionen von N-CoR SANT1-Linker, SANT2-Linker und Linker alleine mittels PCR über Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGEX kloniert. Für die TNT-Reaktion wurden die pCDNA3.1 Vektoren der Klone benutzt. Die Ergebnisse dieses Experimentes deuteten darauf hin, dass die N-CoR SANT1-Domäne (As 429-492) die primäre Interaktionsdomäne für die im Screen isolierten Proteine darstellt. Lediglich Hoxa-4 benötigt den Linkerbereich (Aminosäure 493-623) zwischen den SANT-Domänen für eine starke spezifische *in vitro* Interaktion. Die Interaktion zwischen Hoxa-4 und SANT1+Linker ist deutlich stärker als nur mit der SANT1-Domäne. Der Linker alleine ist aber für eine Interaktion der beiden Proteine nicht ausreichend (Abb. 3.9). Die Interaktion zwischen TAF<sub>II</sub>250 und der cDNA I mit der N-CoR SANT1-Domäne, wird durch den carboxyterminalen Bereich des Linkers ebenfalls stabilisiert. Keines der Proteine interagiert mit der Linkerregion alleine. Das in diesem Bereich enthaltene coiled-coil Motiv scheint keine Rolle für die Protein-Protein Interaktion zu spielen. Eine sehr schwache Wechselwirkung konnte



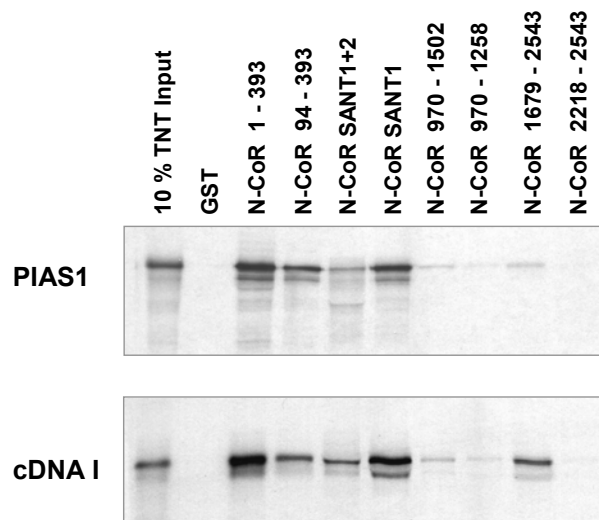
**Abb.3.9: Pull-down-Experiment zur Eingrenzung des Interaktionsbereiches der N-CoR SANT Region.**

(A) Pull-down-Experiment mit den unter Abb. 3.8 positiven Klonen des Hefescreens. N-CoR SANT-Domänen, SANT-Domäne+Linker und Linker alleine wurden als GST-Fusionen bakteriell exprimiert und an Glutathion-Agarosebeads gebunden. Das Pull-down-Experiment wurde wie beschrieben durchgeführt. (B) Coomassie Färbung des Pull-down-Experimentes mit hTAF<sub>II</sub>250 und GST-Fusionen.

zwischen TDG und der N-CoR SANT2-Domäne festgestellt werden. Alle anderen Proteine zeigten keine Interaktion zu dieser Domäne. Das Protein Ubc9 interagiert in diesem Pulldown Experiment mit N-CoR SANT1+2 und schwach mit der N-CoR SANT1-Domäne. Dieses Experiment zeigte erneut den Unterschied der beiden N-CoR SANT-Domänen auf. Die N-CoR SANT1-Domäne stellt im Vergleich zur SANT2-Domäne ein starkes Proteininteraktionsmotiv dar.

### 3.2.5 PIAS1 und die cDNA I interagieren mit zusätzlichen Regionen von N-CoR

Es stellte sich die Frage, ob zusätzliche Regionen von N-CoR eine Interaktion mit einem der gefundenen Klone ermöglichen. Hierfür wurden GST-Fusionen von N-CoR verwendet, die nahezu die gesamte Proteinsequenz abdeckten. N-CoR As 1-393 enthält die Repressionsdomäne I, N-CoR As 970-1502 die Repressionsdomäne III und N-CoR As 1679-2453 den carboxyterminalen Bereich mit der Interaktionsdomäne für die nukleären Hormonrezeptoren. Für die Proteine Hoxa-4, TDG, Ubc9 und TAF<sub>II</sub>250 wurde die schon beschriebene Interaktion mit der N-CoR SANT Region bestätigt. PIAS1 und die cDNA I hingegen besitzen zusätzliche Interaktionsbereiche in N-CoR (Abb. 3.10). Beide Proteine interagieren mit dem aminoterminalen Bereich des Korepressors (As 1-393) und die cDNA I besitzt ebenfalls eine Interaktionsdomäne im carboxyterminalen Bereich in N-CoR (As 1679-2218).

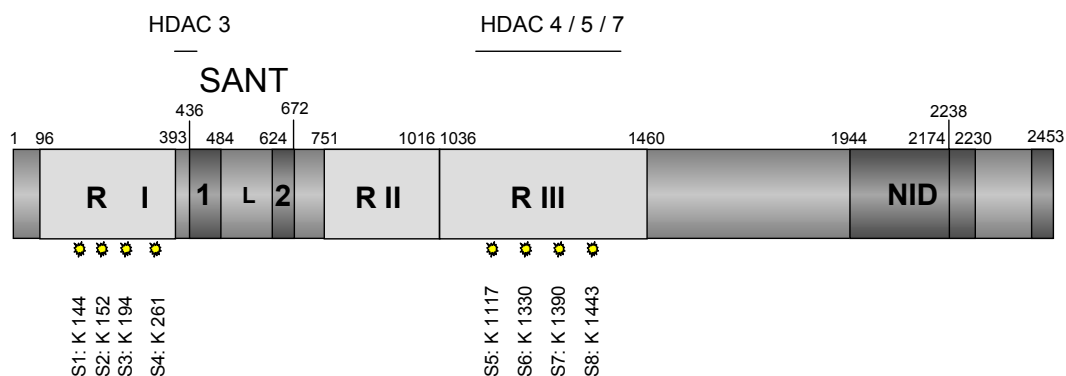


**Abb. 3.10: Pull-down-Experiment zur Kartierung der N-CoR-PIAS1 und N-CoR-cDNA I Interaktion**

In einem GST-Pulldown Experiment wurden N-CoR-GST-Fusionen, die alle wichtigen Domänen des Korepressors N-CoR abdeckten, mit TNT Translataten von PIAS1 und cDNA I auf ihre Bindung untersucht. 50  $\mu$ l der GST-Fusionssuspension wurde mit 2  $\mu$ l TNT Translatat für 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Die Proben wurden gewaschen und auf einem 10 %igen SDS PAGE aufgetrennt. 10 % des eingesetzten TNT Translatats wurde als Input-Kontrolle eingesetzt

### 3.3 N-CoR enthält SUMO-Konsensussequenzen

In der Sumoylierungsreaktion, also der Übertragung eines SUMO Proteins auf ein Substratprotein, sind verschiedene Faktoren involviert. Zu diesen Faktoren gehören die drei, in dem Hefe-Screen isolierten Proteine Ubc9, PIAS1 und Pc2 (siehe Abb. 1.6). Als bisher einziges SUMO-Konjugationsenzym (E2-Enzym) wurde Ubc9 beschrieben. PIAS1 wurde beispielsweise als spezifische SUMO-E3-Ligase für den Transkriptionsfaktor Sp3, den Tumorsuppressor p53 und den Androgenrezeptor beschrieben (Kahyo et al., 2001; Nishida und Yasuda, 2002; Sapetschnig et al., 2002). Kürzlich wurde ebenfalls SUMO-E3-Ligaseaktivität für das Polycomb Proteine Pc2 festgestellt (Kagey et al., 2003). Drei Interaktionspartner der N-CoR SANT1+2-Domänen, aus dem Hefe-Zwei-Hybrid Screen, sind daher funktionell im Zusammenhang mit SUMO oder der Sumoylierungsreaktion zu sehen. Aufgrund dieser Tatsachen liegt die Vermutung nahe, dass der Korepressor N-CoR möglicherweise selbst posttranslational durch SUMO modifiziert werden könnte. SUMO-Substratproteine enthalten eine vier Aminosäure umfassende Konsensussequenz (siehe Abschnitt 1.7). Die Aminosäuresequenz von N-CoR wurde auf SUMO Konsensussequenzen überprüft. In dem Korepressor N-CoR wurden insgesamt acht dieser Sequenzen gefunden. Bemerkenswerterweise sind alle Konsensussequenzen in Repressionsdomänen des Proteins enthalten. Die ersten vier Konsensussequenzen sind in der Repressionsdomäne I (RI) lokalisiert und vier weitere in Repressionsdomäne III (RIII) enthalten. Eine Glutaminsäure an Position 4 der Konsensussequenz kommt in 6 Sequenzen vor und nur zwei der Motive besitzen eine Asparaginsäure (Abb. 3.11 und Tab. 3.2).



**Abb. 3.11: Schematische Darstellung der acht potentiellen Sumoylierungsstellen in N-CoR**

Vier der Sumoylierungsstellen befinden sich in Repressionsdomäne I (RI) und vier weitere sind in Repressionsdomäne III (RIII) lokalisiert. Die Proteine TBL1, TBLR1 und mSin3A/B interagieren mit RI. Histondeacetylase 3 interagiert mit der SANT1-Domäne und einem aminoterminalen Bereich vor SANT1 (DAD). Über die Repressionsdomäne III interagieren die Klasse II HDAC 4, HDAC 5 und HDAC 7 mit N-CoR. NID=Nukleärrezeptor Interaktionsdomäne, R=Repressions-domäne L=Linkerregion, DAD=Deacetylase Activation domain.

SUMO-Stelle	Domäne in N-CoR	Sequenz	Position K	P / G +/- 5 As vom K
<b>S1</b>	RI	AKKD	144	1
<b>S2</b>	RI	VKHE	152	3
<b>S3</b>	RI	AKVE	194	0
<b>S4</b>	RI	PKVE	261	4
<b>S5</b>	RIII	IKQE	1117	1
<b>S6</b>	RIII	IKRE	1330	3
<b>S7</b>	RIII	IKFD	1390	2
<b>S8</b>	RIII	GKYE	1443	1

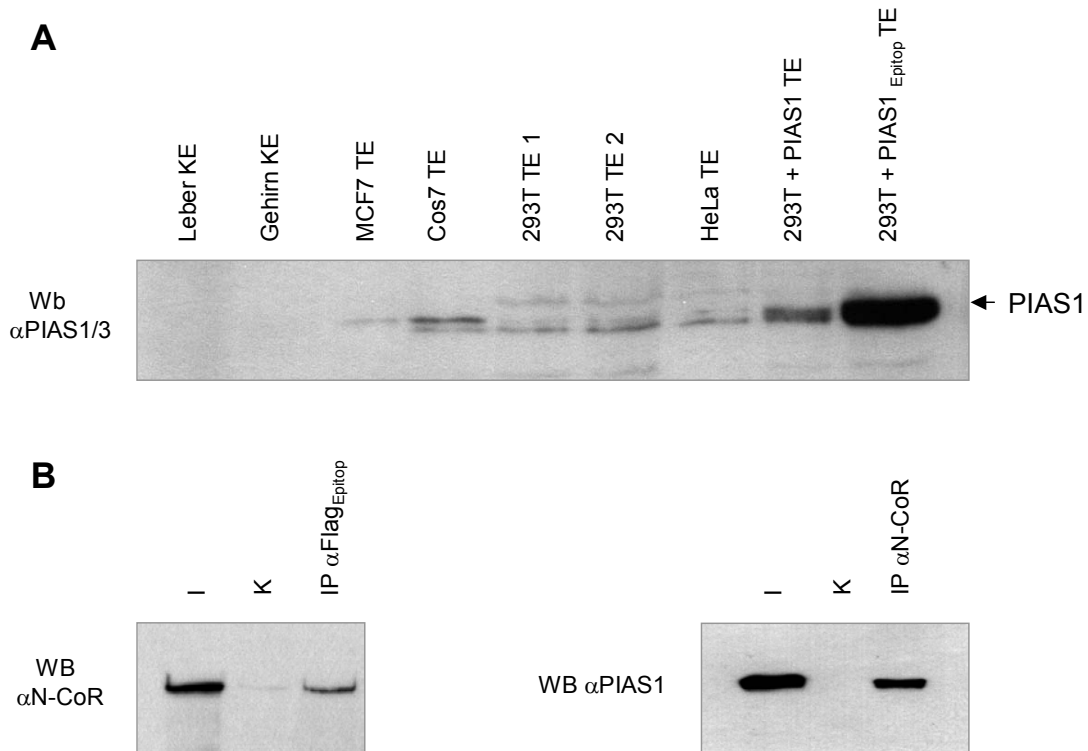
**Tab. 3.2: Tabellarische Zusammenstellung der acht SUMO Stellen in N-CoR (S1-S8).**

Es wurden verschiedene Proteininteraktionen mit den Repressionsdomänen I und III beschrieben. Die ersten vier Sumoylierungstellen liegen im Interaktionsbereich der Proteine TBL1, TBLR1, Sin3A/B und GPS2 (Guenther et al., 2000; Heinzl et al., 1997; Zhang et al., 2002). Die HDAC3 interagiert mit den Korepressoren hauptsächlich über die DAD in N-CoR/SMRT, besitzt aber ebenfalls C-terminal der RIII einen Interaktionsbereich (Guenther et al., 2001; Zhang et al., 2002). Für die Repressionsdomäne III wurden spezifische Interaktionen zu verschiedenen Klasse 2 Histondeacetylasen (HDAC 4, 5 und 7) beschrieben (Huang et al., 2000; Kao et al., 2000). Die Sumoylierung könnte sich möglicherweise auf die Interaktion dieser Proteine auswirken.

### 3.3.1 PIAS1 und N-CoR interagieren spezifisch *in vivo*

Durch eine Ko-Immunopräzipitation wurde die Interaktion zwischen N-CoR und PIAS1 *in vivo* verifiziert. Der verwendete  $\alpha$ PIAS Antikörper zeigte eine Kreuzreaktion zu PIAS1 und PIAS3. Das endogene PIAS1 lag in verschiedenen Zelllinien (MCF7; Cos7; 293, und HeLa) in sehr geringer Konzentration vor (Abb. 3.12 A). Lediglich Cos7 Zellen zeigten eine stärkere endogene PIAS1 Expression. Eine sehr hohe PIAS1 Konzentration konnte nur in 293T Zellen nachgewiesen werden, die mit cDNAs von PIAS1 transfiziert wurden. Die verwendeten PIAS1 cDNAs lagen in eukaryotischen Expressionsvektoren vor.





**Abb. 3.12: PIAS1 Western Blot und Ko-Immunopräzipitation des N-CoR-PIAS1 Komplexes**

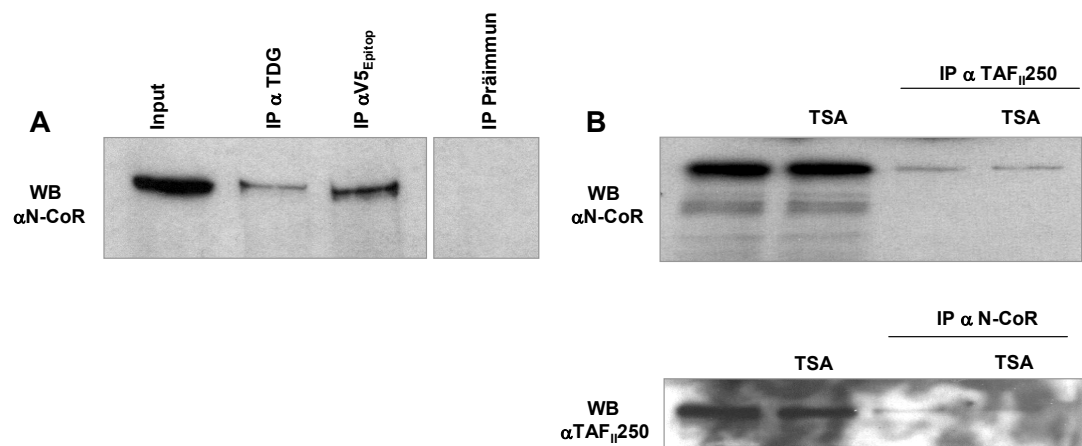
(A) Extrakte verschiedener Zelllinien (MCF7, Cos7, HeLa und zwei 293T Zelllinien) und Maus Gewebeextrakte (Gehirn, Leber) sowie 293T Extrakte mit PIAS1 Expression ( $PIAS1_{Flag-Epitop}^{wt}$  und  $PIAS1_{AS2-C'}$ ) wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte mit  $\alpha PIAS1/3$  ( $PIAS1 = 71,8$  kDa;  $PIAS3 = 67$  k-Da). (B) 293T Zellen wurden transient mit  $PIAS1_{Flag-Epitop}$  cDNA transfiziert und nach 48 h Proteinextrakte hergestellt. 200  $\mu$ l Proteinextrakt wurden mit 1  $\mu$ g Maus  $\alpha$ Flag Antikörper oder 1 $\mu$ g Kaninchen  $\alpha$ N-CoR Antikörper und Protein A/G präzipitiert und gebundene Proteine im Western Blot mit einem affinitätsgereinigtem Kaninchen  $\alpha$ N-CoR C' Antikörper oder einem Maus  $\alpha$ Flag-Antikörper detektiert. Als Expressionskontrolle wurden 5% des Inputs aufgetragen. Kontrolle (K) war die IP mit Präimmenserum aus Maus oder Kaninchen.

Die Ko-Immunopräzipitation (IP), des N-CoR-PIAS1 Komplexes erfolgte in 293T Gesamtzellextrakten, welche transient mit  $PIAS1_{Flag-Epitop}$  cDNA transfiziert waren. Die Extrakte wurden entweder mit einem  $\alpha$ N-CoR-Antikörper oder einem  $\alpha$ Flag-Antikörper immunopräzipitiert. Der Nachweis der N-CoR und PIAS1 Interaktion erfolgte durch Western Blot mit einem  $\alpha$ N-CoR Antikörper bei der  $\alpha$ Flag IP und einem  $\alpha$ Flag Antikörper bei der  $\alpha$ N-CoR IP. Als Kontrolle für die Spezifität der verwendeten Antikörper der IP, wurden gleiche Proteinmengen der Extrakte mit Präimmenserum präzipitiert. Die in der IP verwendeten Antikörper erkannten spezifisch die Proteine N-CoR oder  $PIAS1_{Flag-Epitop}$ , da im Western Blot keine Signale in der Kontrolle sichtbar wurden. Die Immunopräzipitation von endogenem N-CoR zeigte deutlich die Anwesenheit des PIAS1 Proteins im präzipitierten N-CoR-Komplex. Dieses Ergebnis konnte in umgekehrter Richtung mit einer  $\alpha$ PIAS1 IP und

anschließendem  $\alpha$ N-CoR Western Blot bestätigt werden. Der Korepressor N-CoR und die SUMO-E3-Ligase PIAS1 interagieren folglich spezifisch *in vivo* in 293T Zellen.

### 3.3.2 TDG interagiert mit N-CoR *in vivo*

Weitere Interaktionspartner aus dem Hefescreen, Thymin DNA Glycosylase (TDG) und der Transkriptionsfaktor TAF<sub>II</sub>250, wurden in einem Ko-Immunopräzipitations Experiment, auf Interaktion mit dem Korepressor N-CoR untersucht. Hierfür wurden 293T Zellen mit TDG<sub>V5-Epitop</sub> cDNA transient transfiziert. Die Proteinextrakte wurden anschließend mit  $\alpha$ TDG Antikörper oder  $\alpha$ V5-Epitop Antikörper inkubiert und gebundene Proteine über Protein A/G Sepharose gereinigt. Der Western Blot mit einem  $\alpha$ N-CoR Antikörper zeigte die Assoziation von N-CoR und TDG. Die Immunopräzipitation mit Präimmunsereum ergab hingegen kein Signal für N-CoR (3.13 A).



**Abb. 3.13: Ko-Immunopräzipitation(IP) und Western Blot mit TDG / N-CoR und TAF<sub>II</sub>250 / N-CoR**

(A) 293T Zellen wurden mit TDG<sub>V5-Epitop</sub> cDNA transient transfiziert. Die IP erfolgte in 200  $\mu$ l Extrakt mit 1  $\mu$ g  $\alpha$ TDG Antikörper, 1  $\mu$ g  $\alpha$ V5-Epitop Antikörper oder mit 0,5  $\mu$ l Ziege  $\alpha$ Präimmunsereum. Die gewaschenen IP Proben wurden auf ein 7%iges SDS-Gel aufgetragen. Der Western Blot erfolgte mit einem affinitätsgereinigtem Kaninchen  $\alpha$ N-CoR C' Antikörper. (B) 200  $\mu$ l Extrakt aus unbehandelten 293T Zellen oder aus Zellen die mit 100 nM TSA für 18h behandelt worden waren, wurden mit 1  $\mu$ g  $\alpha$ N-CoR oder  $\alpha$ TAF<sub>II</sub>250 Antikörper inkubiert, gewaschen und Proteine in einem SDS-Gel separiert. Nach Transfer wurde die Membran geschnitten, so dass die  $\alpha$ TAF<sub>II</sub>250 IP mit  $\alpha$ N-CoR und die  $\alpha$ N-CoR IP mit  $\alpha$ TAF<sub>II</sub>250 Antikörper detektiert werden konnte.

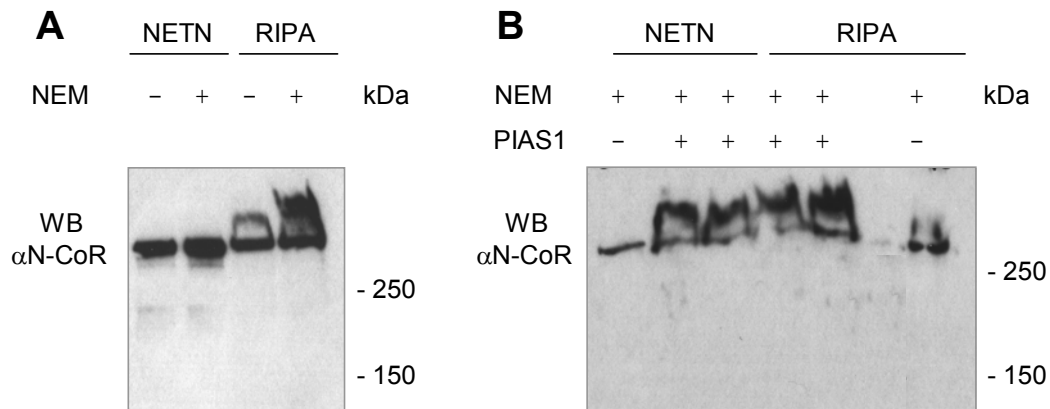
Die Interaktion zwischen endogenem N-CoR und TAF<sub>II</sub>250 konnte in einem Ko-Immunopräzipitations Experiment nicht bestätigt werden. Zellextrakt von unbehandelten oder TSA (100nM) behandelten 293T Zellen wurden mit  $\alpha$ N-CoR oder  $\alpha$ TAF<sub>II</sub>250 Antikörpern inkubiert. Die anschließende Immunopräzipitation zeigte weder im Fall der  $\alpha$ N-CoR IP noch der  $\alpha$ TAF<sub>II</sub>250 IP eine Interaktion der beiden Proteine (Abb. 3.13 B). Die Behandlung von 293T Zellen mit dem Histondeacetylaseinhibitor TSA führte ebenfalls nicht zu einer Assoziation der beiden

Proteine. Möglicherweise unterliegt die Interaktion der beiden Proteine in der Zelle einer bestimmten Regulation oder benötigt gewebespezifische Kofaktoren. Weiterführende Experimente sind erforderlich, um die mögliche *in vivo* Interaktion der Histonacetyltransferase TAF<sub>II</sub>250 mit dem N-CoR Korepressorkomplex abschließend zu klären. Das DNA-Reparaturenzym TDG und die HAT TAF<sub>II</sub>250 wurden in dieser Doktorarbeit nicht weiter untersucht.

### 3.3.3 N-CoR ist *in vivo* modifiziert

In einem Western Blot sind die unmodifizierte und die sumoylierte Form eines Proteins relativ schwer nachzuweisen. Die SUMO-Modifikation eines Proteins ist äußerst anfällig für C-terminale Hydrolasen und Isopeptidasen. Besonders während einer langen IP Inkubation, wird das SUMO Protein häufig von dem Akzeptorprotein abgespalten. Durch Verwendung eines Puffers mit hoher SDS-Konzentration, beispielsweise RIPA-Puffer, kann die Enzymaktivität von Isopeptidasen gehemmt werden. Zusätzlich inhibiert *N*-ethylmaleimide (NEM) die Aktivität dieser Enzyme. Überexpression der SUMO-E3-Ligase kann die sumoylierte Form des Proteins ebenfalls stabilisieren und anreichern (Melchior, 2000).

In einem Western Blot Experiment wurde überprüft, inwiefern unterschiedliche Puffer und die heterologe Expression der SUMO-E3-Ligase PIAS1 in 293T Zellen, einen Effekt auf die elektrophoretische Mobilität des Korepressors N-CoR haben. 293T Gesamtzellextrakte wurden mit Puffern niedriger oder hoher SDS-Konzentration hergestellt und enthielten teilweise *N*-ethylmaleimide. Die so präparierten Extrakte wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit einem affinitätsgereinigten  $\alpha$ N-CoR Antikörper detektiert. In dem niedrig konzentrierten SDS-haltigem Lysis-Puffer (NETN) konnte lediglich eine Form des Korepressors N-CoR mit einem Molekulargewicht von 270 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.14 A). Zusatz von NEM zu diesem Puffer zeigte ebenfalls nur eine N-CoR Form. Die Verwendung von RIPA Puffer ergab, neben der erwarteten Bande mit einem Molekulargewicht von 270 kDa ebenfalls eine deutlich höher laufende Form des Proteins. Diese modifizierte N-CoR Proteinform wurde durch Verwendung eines NEM-haltigen RIPA Puffers in der Konzentration verstärkt (Abb. 3.14 A).



**Abb. 3.14: Western Blot zur Detektion der N-CoR-SUMO Modifikation**

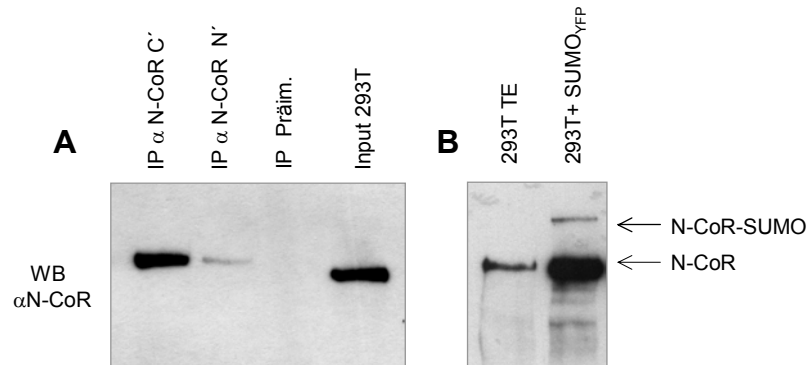
(A) Zwei Puffer (NETN und RIPA) wurden für die Herstellung von Zellextrakten aus 293T Zellen verwendet. Diesen Puffern wurde teilweise der Isopeptidaseinhibitor *N*-ethylmaleimide (10 mM NEM) zugegeben. 10  $\mu$ l dieser Extrakte wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend im Western Blot auf N-CoR detektiert. (B) Extrakte mit und ohne heterologe Expression von PIAS1 wurden verglichen und ebenfalls auf N-CoR im Western Blot detektiert.

293T Zellen wurden transient mit PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> cDNA transfiziert und Gesamtzellextrakte mit Puffern niedriger oder hoher SDS-Konzentration hergestellt. Den Extrakten wurde NEM zugegeben (Abb. 13 B). Die heterologe Expression der SUMO-E3 Ligase PIAS1 stabilisierte oder verstärkte die im Western Blot sichtbare N-CoR Modifikation. Unter diesen Bedingungen war selbst in Extrakten aus NETN Puffer, die höher laufende Form von N-CoR nachzuweisen. Die modifizierte Form von N-CoR lief diffus in einem höheren Molekulargewichtsbereich und erschien nicht als klar umrissene Bande. Möglicherweise ist dies auf mehrfache Sumoylierung des Korepressors N-CoR in den Repressionsdomänen I und III zurückzuführen. Dieser Western Blot stellt einen indirekten Nachweis der N-CoR Sumoylierung dar. In diesem Experiment kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass andere posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierung das Laufverhalten des Proteins beeinflussen.

### 3.3.4 Detektion der N-CoR Sumoylierung

Die Immunopräzipitation mit verschiedenen  $\alpha$ N-CoR Antikörpern in 1:5 verdünnten RIPA Extrakten zeigte im  $\alpha$ N-CoR Western Blot zwar eine Präzipitation des Korepressors, aber modifizierte Formen von N-CoR waren nicht detektierbar (Abb. 3.15 A). Die IP der modifizierten Formen des Korepressor N-CoR war nicht möglich. 293T Zellen wurden mit SUMO<sub>YFP-Epitop</sub> transient transfiziert (Abb. 3.15 B). heterologe Expression von SUMO<sub>YFP-Epitop</sub> in 293T Zellen ergab im Western Blot mit einem  $\alpha$ N-CoR Antikörper eine schwache Proteinbande, die über der regulären N-CoR Bande lief (Abb. 3.15 B). Allerdings lag nur ein geringer Teil der N-CoR

Proteinpopulation aus den Extrakten in dieser modifizierten Form vor. Dies könnte möglicherweise ebenfalls erklären, warum die modifizierte N-CoR Form in der IP so instabil und schwer detektierbar ist.



**Abb. 3.15: Nachweis der N-CoR SUMO-Modifikation**

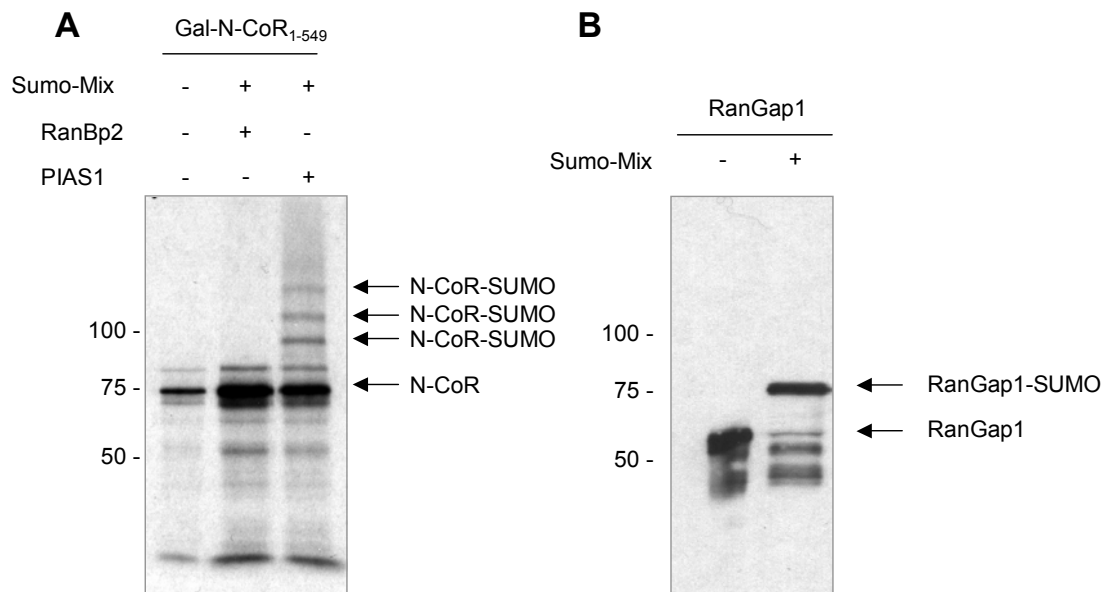
(A) 293T Zellextrakte wurden mit Meerschweinchen $\alpha$ N-CoR Antikörpern die den N- und C-Terminus des Korepressors erkannten, immunopräzipitiert. Als Negativkontrolle wurde Meerschweinchen Präimmenserum verwendet. (B) 293T Zellen wurden transient mit SUMO<sub>YFP-Epitop</sub> transfiziert. Der Western Blot (A und B) wurde mit einem affinitätsgereinigtem Kaninchen  $\alpha$ N-CoR C' Antikörper durchgeführt.

### 3.3.5 N-CoR *in vitro* SUMO-Modifikationstest

Aufgrund der geringeren Stabilität der SUMO-Modifikation *in vivo* wurde eine Reaktion mit gereinigten Komponenten *in vitro* durchgeführt. Die Abwesenheit von Isopeptidasen erleichtert die Detektion von Sumoylierungsprodukten. Für eine *in vitro* Sumoylierungsreaktion sind die E1-Enzyme AOS1/Uba2, das SUMO-E2-Konjugationsenzym Ubc9, die spezifische SUMO-E3 Ligase und das SUMO Protein erforderlich. Die Reaktion ist ferner ATP-abhängig (Abb. 1.6). Die E1 Enzyme Aos1/Uba2 und das SUMO-E2 Enzym Ubc9 wurden bakteriell exprimiert und gereinigt (Arbeitsgruppe Melchior). PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> wurde in 293T Zellen heterolog exprimiert und mit einem  $\alpha$ Flag Antikörper immunopräzipitiert. Das Gal-DBD N-CoR<sub>1-549</sub> Konstrukt wurde in einer TNT Transkriptions-Translations-Reaktion mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert. Dieses N-CoR Fragment enthält die vier potentiellen N-terminalen Sumoylierungstellen und die SANT1-Domäne. Als Positivkontrolle der *in vitro* Sumoylierungsmodifikation diente rekombinantes RanGap1 in dem Versuch (Arbeitsgruppe Melchior). Dieses Protein ist das Substrat der SUMO-E3-Ligase RanBP2 und ist in der Lage sich selbst unter idealen Bedingungen zu fast 100 Prozent zu sumoylieren.

Die TNT Translation des Gal-DBD N-CoR<sub>1-549</sub> Konstruktes ergab eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ungefähr 70 kDa. Mit der SUMO-E3-Ligase PIAS1 konnte man eine dreifache SUMO-Modifikation von Gal-DBD N-CoR<sub>1-549</sub> nach der *in*

*in vitro* SUMO-Modifikation feststellen. Die Produkte hatten Molekulargewichte von 90, 110 und 140 kDa (Abb. 3.16 A). Dagegen entstanden keine höher laufenden Formen des Korepressors N-CoR mit der SUMO-E3-Ligase RanBP2 (Abb. 3.16 A). Das PIAS1 Protein wirkt demnach als spezifische SUMO-E3-Ligase für den Korepressor N-CoR. Der Western Blot mit einem  $\alpha$ RanGap1 Antikörper der RanGap1 *in vitro* SUMO-Modifikation, zeigte die Funktionalität der verwendeten SUMO-Enzyme. Die SUMO-RanGap1 Proteinform unterschied sich von rekombinantem RanGap1 durch einen Molekulargewichtsunterschied von 15-20 kDa (75 kDa anstatt 50 kDa) im SDS-Gel (Abb. 3.16 B).



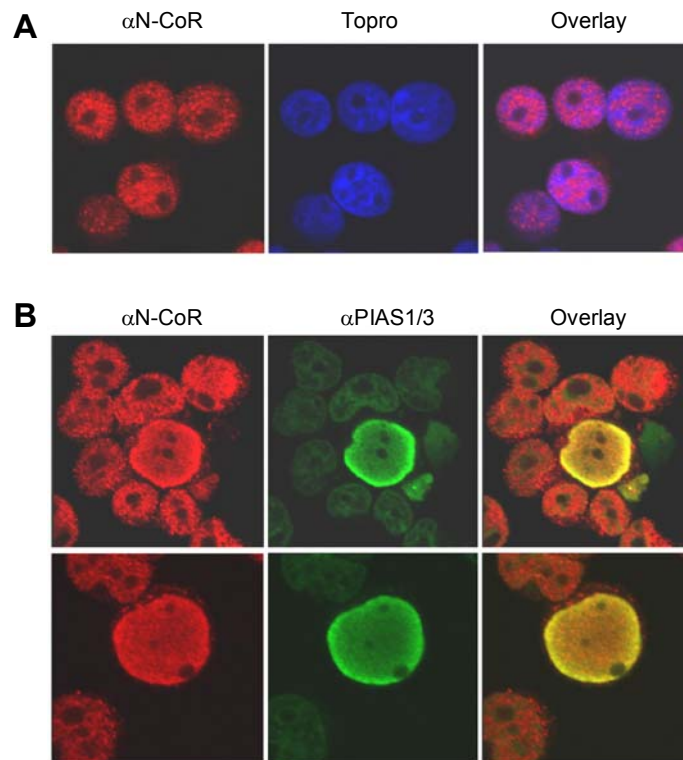
**Abb. 3.16: In vitro SUMO-Modifikation von N-CoR und RanGap1**

(A) Gal-DBD N-CoR<sub>As1-549</sub> wurde mit <sup>35</sup>S-Methionin in einer TNT Reaktion exprimiert. 3  $\mu$ l des Translatats, 1000 ng SUMO 1, 150 ng Aos1/Uba2, 10 ng Ubc9, 20  $\mu$ l IP  $\alpha$ Flag aus 50  $\mu$ l Zellextrakt mit PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> Expression, wurden für die Reaktion eingesetzt. Der Ansatz enthielt ferner 1 mM ATP, 0,05% Tween 20 und 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ L Ovalbumin. (B) Für die RanGap1 Sumoylierung wurden 100 ng RanGap1, 40 ng SUMO1, 20 ng Aos1/Uba2 und 10 ng Ubc9 1 mM ATP, 0,05% Tween 20 und 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ L Ovalbumin eingesetzt. Die Reaktionen wurden für 30 Minuten bei 30°C inkubiert und mit SDS Ladepuffer bei 95 °C 10 min gestoppt. Ein Viertel des Ansatzes wurde auf ein 8%iges SDS-Gel geladen. Anschließend wurde RanGap1 im Western Blot detektiert. 25 ng RanGap1 dienten als Ladekontrolle für unmodifiziertes RanGap1.

### 3.3.6 N-CoR und PIAS1 kolokalisieren *in vivo*

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung sollte die Lokalisation von endogenem N-CoR in Zellen mit und ohne heterolog exprimiertes PIAS1 untersucht werden. 293T Zellen wurden mit PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> cDNA transient transfiziert, nicht transfizierte Zellen dienten als Vergleich. Für die Immunfluoreszenzfärbung von endogenem N-CoR wurde der affinitätsgereinigte  $\alpha$ N-CoR Antikörper, der den Carboxyterminus des Proteins erkennt, benutzt. Das PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> Protein wurde mit einem  $\alpha$ PIAS1/3

Antikörper gefärbt. Die Präparate wurden bei der entsprechenden Wellenlänge angeregt (488 nm  $\alpha$ PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub>, 546 nm N-CoR). Endogenes N-CoR war in 293T Zellen größtenteils im Nukleus lokalisiert, lediglich eine geringe Menge des Proteins befand sich im Zytoplasma. N-CoR konnte nicht in den Nukleoli nachgewiesen werden. Interessanterweise lag endogenes N-CoR in bestimmten Aggregaten im Zellkern vor (Abb. 3.17 A). In Zellen die mit der SUMO-E3-Ligase PIAS1 transient



**Abb. 3.17: Kolokalisation von endogenem N-CoR und PIAS1**

293T Zellen wurden mit PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> cDNA transient transfiziert, untransfizierte 293T Zellen dienten als Vergleich. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend auf Objektträgern mit Silanlösung fixiert. Die Proteine wurden mit Formaldehyd fixiert und die Membranen mit 1% Triton X 100 permeabilisiert. Mit 3% BSA in PBS wurden die Zellen geblockt. Antikörperlösungen und Waschlösungen wurden in PBS/BSA angesetzt. Die Färbung erfolgte mit einem affinitätsgereinigtem Kaninchen  $\alpha$ N-CoR C' Antikörper und einem Ziege  $\alpha$ PIAS1/3 Antikörper. Die Antikörper wurden für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die sekundären Antikörper waren gegen  $\alpha$ Kaninchen (Absorbierte bei 488 nm) und  $\alpha$ Ziege (Absorbierte bei 546 nm) gerichtet und wurden für eine Stunde auf den Zellen inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurde 3 mal je 10 Minuten gewaschen. Vectashild mit DAPI wurde zuletzt auf die Zellen gegeben und diese dann mit einem Deckglas verschlossen.

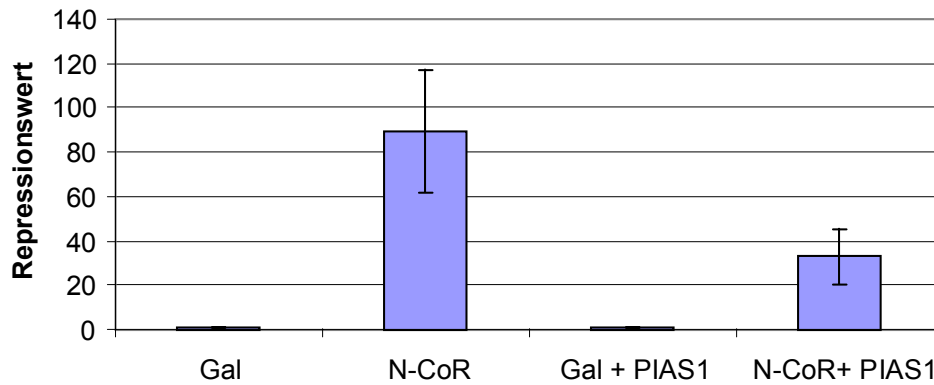
transfiziert waren, änderte sich die Verteilung des Korepressors. N-CoR lokalisierte verstärkt in der Nähe der Kernmembran. Die typische aggregatartige Kernverteilung wich einer eher diffusen gleichförmigen Verteilung. Im Gegensatz zu N-CoR war PIAS1 ausschließlich im Kern, mit Ausnahme der Nukleoli lokalisiert. Die Konzentration der SUMO-E3-Ligase im Nukleus war an der Kernmembran verstärkt.

In N-CoR und PIAS1 gefärbten Zellen sah man in der Überlagerung der Bilder (Overlay) eine deutliche Kolokalisation beider Proteine (Abb. 3.17 B). Besonders im Bereich der Kernmembran zeigte sich eine starke Kolokalisation von N-CoR und PIAS1. Die Ergebnisse der Immunofluoreszenzfärbung bestätigten die *in vivo* Interaktion von N-CoR und PIAS1.

### 3.3.7 PIAS1 vermindert die Repression von N-CoR

Eine effektive Transkriptionsrepression des Thyroidhormonrezeptors und des Retinoidhormonrezeptors (T<sub>3</sub>R und RAR), in Abwesenheit ihrer entsprechenden Liganden benötigt die Bindung eines Repressorkomplexes in dem N-CoR oder SMRT assoziiert sind (Hermanson et al., 2002). Die Repressionsaktivität des Korepressors N-CoR kann in transienten Transfektionen über die Expression eines Reportergens ermittelt werden. 293T Zellen wurden mit einem 2×UAS TK Luziferase Reporter und Expressionsplasmiden transient transfiziert. Bei dem Thymidinkinasepromoter (TK) handelte es sich um einen konstitutiv aktiven Promoter, der in den Zellen eine starke Expression der Luziferase ermöglicht. Dem Promotor sind 5' zwei Gal-DNA-Erkennungselemente vorgelagert. N-CoR wurde als Gal4-DBD Fusionsprotein exprimiert und konnte so direkt oberhalb des Promoters binden. Durch Bindung von N-CoR an die UAS-Stellen sollte der spezifische Korepressorkomplex an den Promotor rekrutiert werden und die Repression des Reportergens konnte über den Level der Luziferaseexpression gemessen werden. Die Repression von N-CoR wurde mit und ohne Koexpression der SUMO-E3-Ligase PIAS1 in 293T Zellen untersucht. In dem Reportertest wurde die Reporter DNA (1,5 µg) im siebenfachen Überschuß zur DNA des Repressors (0,2 µg) eingesetzt. Bei diesem Verhältnis Reporter zu Repressor, erreicht man eine partielle Repressionsaktivität des Korepressors N-CoR. Die Kotransfektion von PIAS1 im Repressionstest könnte daher sowohl eine Verstärkung als auch eine Verminderung der Repression bewirken. Die Luziferasewerte der einzelnen Transfektionen wurden mit den erzielten β-Galactosidase Werten abgeglichen und normalisiert. Als Basis diente der Luziferasewert der Transfektion mit der Gal-DBD. Durch Division dieses Wertes mit dem des Luziferasewertes der N-CoR Transfektion wurde der Repressionswert von N-CoR in diesem System errechnet. N-CoR reprimierte die Transkription der Luziferase durchschnittlich 90-fach. Die Kotransfektion von Gal4-DBD und PIAS1 stellte die Basis für die Repression von N-CoR mit PIAS1 dar. Unter diesen Bedingung war eine Verminderung der Repression von N-CoR durch Kotransfektion von PIAS1 feststellbar. N-CoR reprimierte die Expression der Luziferase mit Expression der SUMO-E3-Ligase PIAS1 nur noch ungefähr 30-fach. Die Expression von PIAS1 vermindert die Repression von N-CoR also folglich um einen Faktor 3.





**Abb. 3.18: Repressionstest mit N-CoR und PIAS1**

293T Zellen wurden in 12 Lochplatten in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen je Loch ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit 2,5  $\mu\text{g}$  DNA mit der Kalzium-Phosphat Methode transfiziert. Das Präzipitat wurde ca. 6-10 Stunden auf den Zellen belassen, danach erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden für weitere 48 h bei 37 °C inkubiert und dann in 150  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer aufgenommen. Die verwendeten Konzentrationen der Plasmide: Reporter (1,5  $\mu\text{g}$  2xUAS TK Luziferase) und die Expressionsplasmide Gal-DBD-N-CoR (0,2  $\mu\text{g}$ ), Gal-DBD (0,2  $\mu\text{g}$ ) und PIAS1 (0,65  $\mu\text{g}$ ). Mit PSP Vektor wurde je nach Notwendigkeit die DNA Konzentration angeglichen. Die Normalisierung der Transfektion erfolgte durch Kotransfektion des Vektors SV40  $\beta$ -Galactosidase (0,1  $\mu\text{g}$ ). Luziferasewerte der Gal-DBD Transfektionen dienten als Basis für die Errechnung der N-CoR Repression. Die Luziferasewerte der einzelnen Proben wurden mit den erzielten  $\beta$ -Galactosidase Werten abgeglichen und normalisiert.

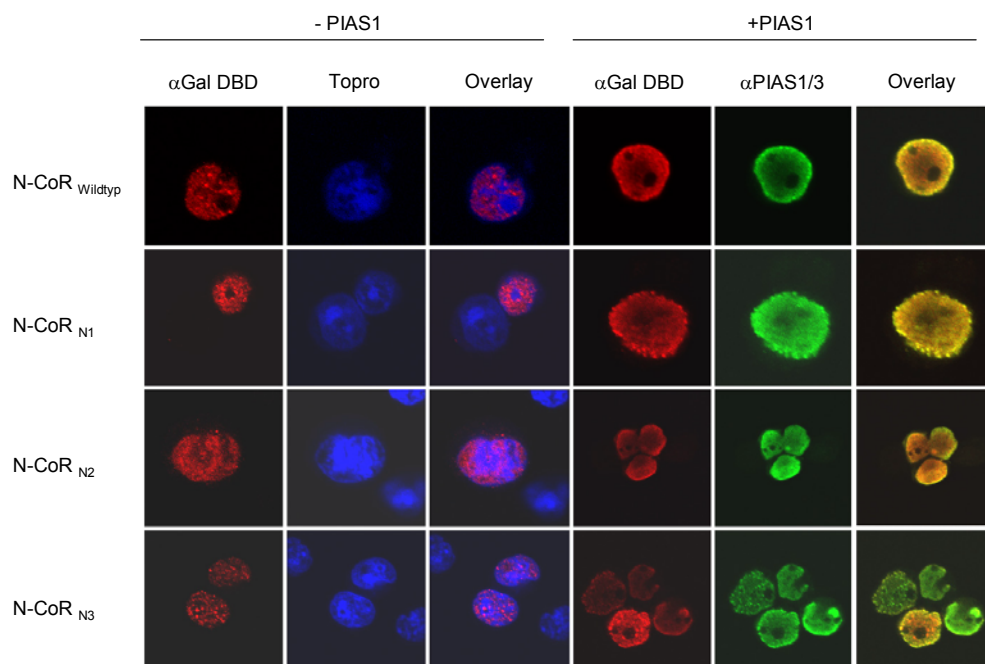
### 3.3.8 Alaninsubstitutionen in der N-CoR SANT1-Domäne

In Pulldown-Experimenten konnte gezeigt werden, dass PIAS1 über die SANT1-Domäne mit N-CoR interagiert. In Immunfluoreszenzstudien ergab sich weiterhin ein Einfluss auf die Lokalisation des Korepressors N-CoR bei Koexpression von PIAS1. Mit Alaninsubstitutionen in der SANT1-Domäne wurde der Einfluß der SUMO-E3-Ligase PIAS1 auf N-CoR studiert werden. Ein Vergleich der SANT-Domänen von CoREST, MTA2, N-CoR, SMRT und ADA2 zeigte hochkonservierte Bereiche in der Domäne. Die Mutanten N-CoR<sub>N1-N3</sub> wurden durch Alaninsubstitution bestimmter Aminosäuren in stark konservierten Bereichen generiert (Abb. 3.19). Die Struktur der Domäne sollte nicht zerstört, jedoch die Polarität beeinflusst werden. N-CoR<sub>N1</sub> hatte Substitutionen in Helix 1, N-CoR<sub>N2</sub> in Helix 3 der Domäne und die Mutante N-CoR<sub>N3</sub> enthielt im carboxyterminalen Bereich der Domäne Substitutionen. Die Mutanten wurden durch gerichtete PCR-Mutagenese erzeugt. Ein Oligo, mit der entsprechenden Mutation wurde in einer PCR-Reaktion mit den Vektoren pGEX N-CoR SANT1 oder pCMX Gal-DBD N-CoR<sub>Wildtyp</sub> eingesetzt. Die PCR Reaktion amplifizierte Vektoren mit der entsprechenden Mutation. Die bakterielle DNA wurde nach dem PCR Lauf durch DpnI Verdau eliminiert und die neu synthetisierte Vektor DNA im Probenansatz anschließend in DH10B Bakterien transformiert. Nach Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde diese durch Sequenzierung überprüft.



Alaninsubstitutionen in der N-CoR SANT1-Domäne beeinflussten die Interaktion der SUMO-E3-Ligase mit dem Korepressor N-CoR nicht signifikant.

Mit der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Lokalisation der Gal-DBD N-CoR<sub>N1-N3</sub> Mutanten im Vergleich zu Gal-DBD N-CoR<sub>Wildtyp</sub> untersucht. 293T Zellen wurden mit PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> und den Mutanten N-CoR<sub>N1-N3</sub> oder N-CoR<sub>Wildtyp</sub> transient transfiziert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem monoklonalen  $\alpha$ Gal-DBD Antikörper durchgeführt. Das PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> Protein wurde mit einem  $\alpha$ PIAS1/3 Antikörper gefärbt. Gal-N-CoR<sub>Wildtyp</sub> lokalisierte genau wie endogenes N-CoR in bestimmten Aggregaten im Zellkern. Die Verteilung änderte sich mit der Kotransfektion der SUMO-E3-Ligase PIAS1. Der Korepressor N-CoR war wiederum verstärkt in der Nähe der Kernmembran lokalisiert (vergleiche mit Abb. 3.17). Dies traf in gleicher Weise für die drei N-CoR Mutanten mit den Substitutionen in der SANT1-Domäne zu; sie zeigten bei Koexpression von PIAS1 die gleiche Lokalisationsänderung. Die typische Verteilung des Korepressors N-CoR im Zellkern verschwand und N-CoR lokalisierte gleichförmiger im Kern (Abb. 3.21).

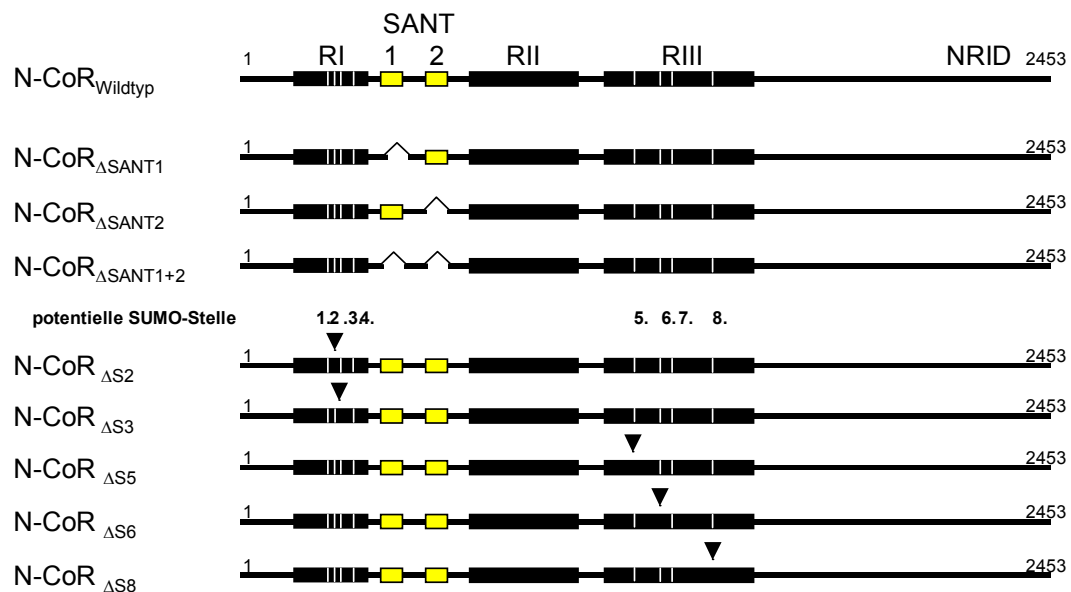


**Abb. 3.21: Immunfluoreszenzfärbung von Gal-N-CoR<sub>N1-N3</sub> Mutanten und Gal-N-CoR<sub>Wildtyp</sub>**

293T Zellen wurden alleine mit Gal-DBD N-CoR<sub>Wildtyp</sub>, Gal-NcoR<sub>N1</sub>, Gal-NcoR<sub>N2</sub> und Gal-NcoR<sub>N3</sub> transient transfiziert, oder mit PIAS1<sub>Flagepitop</sub> kotransfiziert. Die Zellen wurden wie unter Abb. 3.17 beschrieben behandelt. Die Färbung wurde mit einem monoklonalen Maus  $\alpha$ Gal-DBD Antikörper und einem Ziege  $\alpha$ PIAS1/3 Antikörper durchgeführt. Die sekundären Antikörper waren gegen Maus  $\alpha$ 488 (Rot) und Ziege  $\alpha$ 546 (Grün) gerichtet.

### 3.3.9 Deletionen der N-CoR SANT1, SANT2 und SANT1+2-Domänen

Die Alaninsubstitutionen in der N-CoR SANT1-Domäne hatten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keinen Effekt auf die N-CoR-PIAS1 Interaktion. Mit der gerichteten PCR Mutagenese wurden daher weitere N-CoR Mutanten in dem Vektor pCMX Gal4-DBD-N-CoR<sub>Wildtyp</sub> erzeugt. Diese enthielten Deletionen jeweils einer kompletten N-CoR SANT-Domäne oder beider SANT-Domänen (Abb. 3.22). Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung und Enzymverdau überprüft.



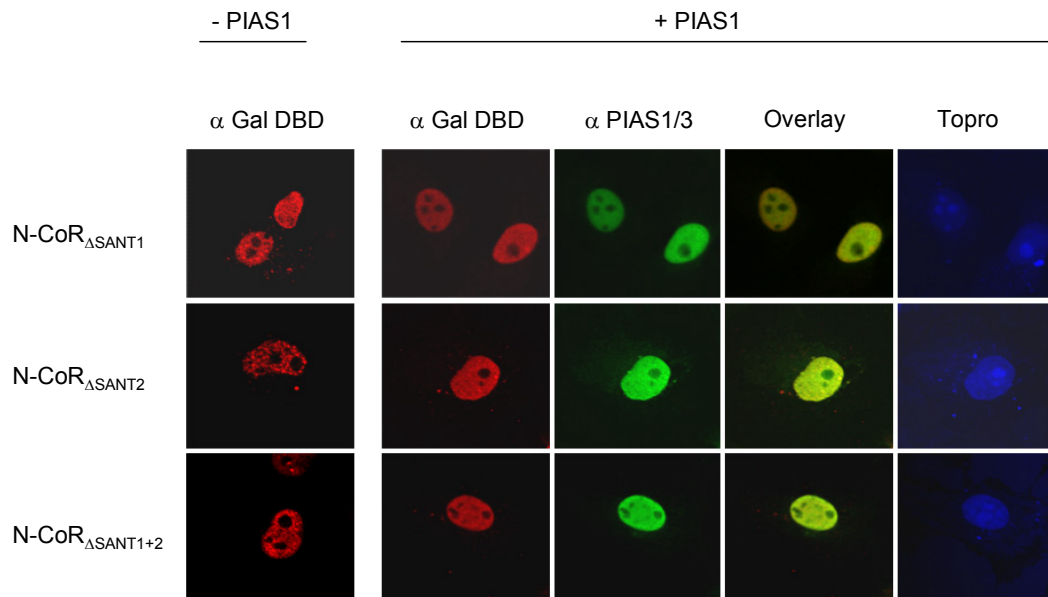
**Abb. 3.22: Klonierung verschiedener N-CoR<sub>ΔSANT</sub>- und N-CoR<sub>ΔSUMO</sub> Mutanten**

Mit Hilfe der gerichteten PCR Mutagenese (Quick Change PCR Mutagenese) wurden die SANT-Domänen von N-CoR deletiert und verschiedene Alanin oder Arginin Substitutionen durchgeführt. Für die SANT-Deletionen und die SUMO-Stellen Substitutionen wurde der Vektor pCMX Gal4-DBD-N-CoR<sub>Wildtyp</sub> verwendet.

Cos7 Zellen wurden in 12 Loch-Platten auf Deckgläsern kultiviert und mit DNA der N-CoR<sub>ΔSANT</sub> Mutanten transient transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit cDNA der E3-Ligase-PIAS1 kotransfiziert. Die Zellen wurden direkt auf den Deckgläsern mit Formaldehyd fixiert. Die Färbung der Gal-N-CoR<sub>ΔSANT</sub> Mutanten erfolgte mit dem monoklonalen  $\alpha$ Gal-DBD Antikörper und PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> wurde mit einem  $\alpha$ PIAS1/3 Antikörper nachgewiesen.

Die Mutanten N-CoR<sub>ΔSANT1</sub>, N-CoR<sub>ΔSANT2</sub> und N-CoR<sub>ΔSANT1+2</sub> lokalisierten größtenteils im Kern von Cos7 Zellen. Auffallend bei der Verteilung der N-CoR<sub>ΔSANT</sub> Mutanten war die starke Lokalisation in Aggregaten im Zellkern. Kotransfektion der N-CoR<sub>ΔSANT</sub> Mutanten mit PIAS1 ließ die für N-CoR typische punktartige Verteilung

des Proteins im Kern verschwinden. In Zellen, in denen sowohl PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> als auch die N-CoR<sub>ΔSANT</sub> Mutanten exprimiert waren, konnte man eine gleichmäßigere Lokalisation des Korepressors im Kern feststellen. Die bei heterologer Expression von PIAS1 in 293T Zellen beobachtete Lokalisation von endogenem N-CoR in der Nähe der Kernmembran, konnte mit den N-CoR<sub>ΔSANT</sub> Mutanten nicht beobachtet werden (Abb. 3.23).



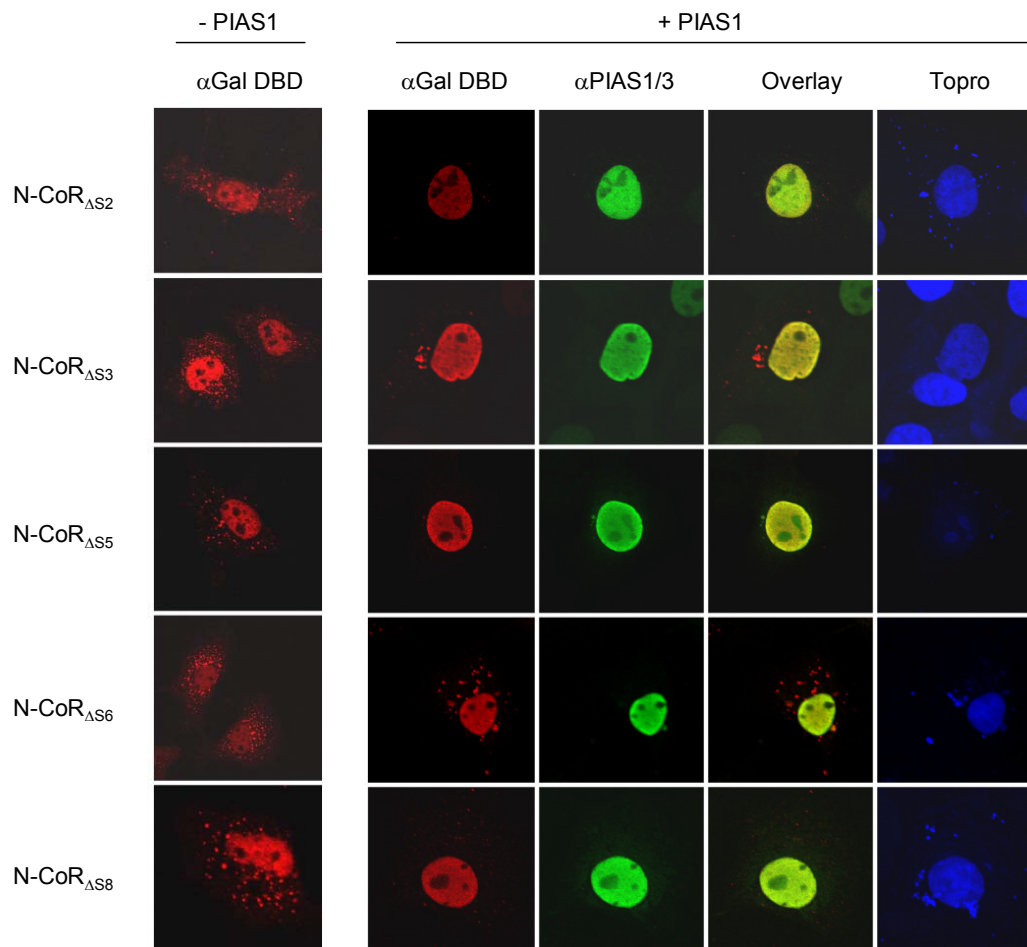
**Abb.3.23: Immunfluoreszenzfärbung von Gal-N-CoR<sub>ΔSANT</sub> Mutanten**

Cos7 Zellen wurden in 12 Loch-Platten auf Deckgläsern kultiviert und mit DNA der N-CoR<sub>ΔSANT1</sub>, N-CoR<sub>ΔSANT2</sub> und N-CoR<sub>ΔSANT1+2</sub> Mutanten transient transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit cDNA der E3-Ligase-PIAS1 kotransfiziert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem monoklonalen Maus αGal-DBD Antikörper und einem Ziege αPIAS1/3 Antikörper durchgeführt. Die sekundären Antikörper waren αMaus (488 nm Rot) und αZiege (546nm Grün).

### 3.3.10 Immunfluoreszenzfärbung der Gal-N-CoR<sub>ΔSumo</sub> Mutanten

In der SUMO Konsensussequenz (ΨKXE/D) ist das Lysin als einzige Aminosäure festgeschrieben. Über diese Aminosäure erfolgt die Thioesterbindung mit dem SUMO Protein. Mit der gerichteten PCR Mutagenese sollte das Lysin in verschiedenen N-CoR SUMO-Konsensussequenzen (S) durch ein Alanin substituiert werden. Die SUMO-Konsensussequenzen S1 und S7 wurden für die Mutagenese nicht gewählt, da an vierter Position eine Asparaginsäure enthalten ist, und diese nicht die primäre Erkennungssequenz für die Sumoylierung darstellt. Die SUMO-Stellen S2, S3, S5, S6 und S8 wurden für die Alanin Substitution ausgewählt (Abb. 3.22). Für die Mutagenese wurde der Vektor pCMX Gal-DBD-N-CoR<sub>wildtyp</sub> verwendet.

Cos7 Zellen wurden durch Kalzium-Phosphat Transfektion mit DNA der N-CoR $_{\Delta SUMO}$  Mutanten transient transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit cDNA der E3-Ligase-PIAS1 kotransfiziert.



**Abb. 3.24: Immunfluoreszenzfärbung von Gal-N-CoR $_{\Delta SUMO}$  Mutanten**

Cos7 Zellen wurden in 12 Loch-Platten auf Deckgläsern kultiviert und mit DNA der Gal-N-CoR $_{\Delta SUMO}$  Mutanten transient transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit cDNA der E3-Ligase-PIAS1 transfiziert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem monoklonalen Maus  $\alpha$ Gal-DBD Antikörper und einem Ziege  $\alpha$ PIAS1/3 Antikörper durchgeführt. Die sekundären Antikörper waren gegen  $\alpha$ Maus488 (Rot) und  $\alpha$ Ziege546 (Grün) gerichtet.

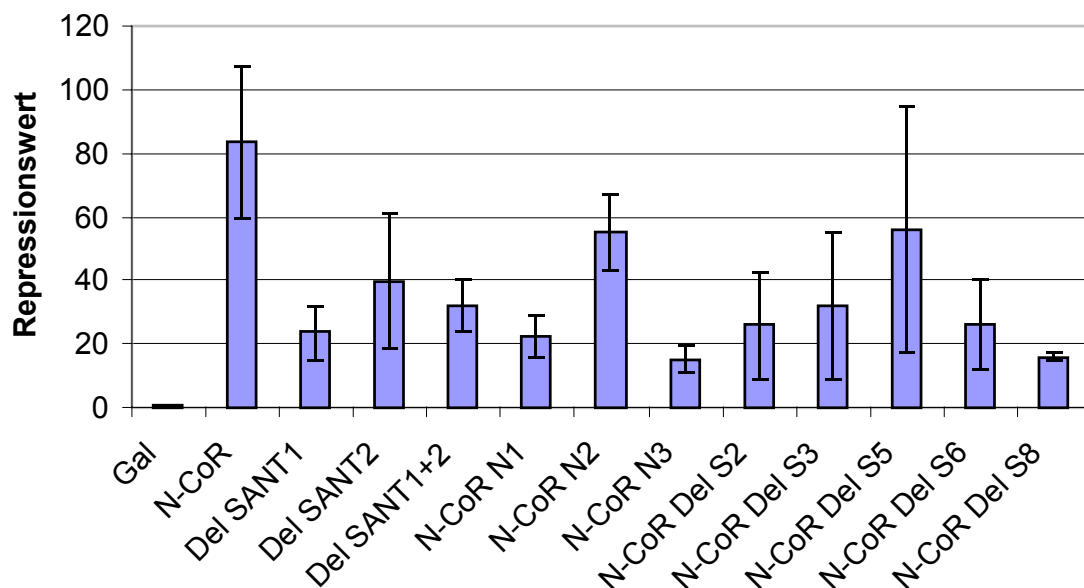
Die N-CoR $_{\Delta SUMO}$  Mutanten waren größtenteils, mit Ausnahme der N-CoR $_{\Delta S6}$  Mutante, nukleär in Cos7 Zellen lokalisiert (Abb. 3.24). Die Mutanten zeigten aber auch eine zytoplasmatische Lokalisation. Besonders bei dem Konstrukt N-CoR $_{\Delta S6}$  überwog eine stärkere Lokalisation im Zytoplasma. Die Kotransfektion der N-CoR $_{\Delta SUMO}$  Mutanten mit PIAS1, ergab für die Mutanten N-CoR $_{\Delta S3}$ , N-CoR $_{\Delta S5}$  und N-CoR $_{\Delta S6}$  eine ähnliche nukleäre Lokalisation, wie für endogenes N-CoR bei Expression von PIAS1 in 293T Zellen. Der Korepressor lokalisierte verstärkt im Bereich der Kernmembran. Die aggregatförmige Verteilung im Zellkern wich bei allen N-CoR $_{\Delta SUMO}$  Mutanten durch Koexpression von PIAS1 einer gleichförmigeren



Verteilung. Die Koexpression von PIAS1 mit den N-CoR<sub>ΔSUMO</sub> Mutanten zeigte ferner, dass die N-CoR Mutanten stärker im Kern lokalisierten, als ohne die Expression von PIAS1. Die Mutante N-CoR<sub>ΔS6</sub> war auch mit Expression von PIAS1 stärker im Zytoplasma lokalisiert, als bei den anderen N-CoR<sub>ΔSUMO</sub> Mutanten (Abb. 3.24). Eine Kolokalisation der SUMO-E3-Ligase PIAS1 wurde mit allen N-CoR<sub>ΔSUMO</sub> Mutanten beobachtet.

### 3.3.11 Repressionstest verschiedener N-CoR Mutanten

Die Repression der N-CoR<sub>ΔSANT</sub>- und N-CoR<sub>ΔSUMO</sub> Mutanten wurde in einem Luziferasereportertest untersucht. Ferner wurden die Mutanten, die verschiedene Alaninsubstitutionen in der SANT1-Domäne enthalten (N-CoR<sub>N1-N3</sub>) in dem Test eingesetzt. Gal-DBD-N-CoR<sub>Wildtyp</sub> diente in dem Reportertest als Basiswert der Repression. 293T Zellen wurden mit DNA des Luziferasereporters (2×UAS TK) und verschiedenen Expressionsplasmiden transient transfiziert. Wie beschrieben, reprimiert N-CoR die Transkription der Luziferase durchschnittlich 90-fach (Abb. 3.18). Als Basis diente der Luziferasewert der Transfektion nur mit Gal-DBD.



**Abb. 3.25: Reportertest der N-CoR<sub>ΔSANT</sub> und N-CoR<sub>ΔSUMO</sub> Mutanten**

293T Zellen wurden wie unter Abb. 3.18 beschrieben, ausgesät und transfiziert. Reporter (1,5 µg 2×UAS TK Luziferase) und die Expressionsplasmide Gal-DBD-N-CoR Konstrukte (0,2 µg), Gal-DBD (0,2 µg) wurden für die Transfektion verwendet. Die Normalisierung der Transfektion erfolgte durch Kotransfektion eines Vektors für β-Galactosidase (0,1 µg). Luziferasewerte der Gal-DBD Transfektionen dienten als Basis für die Berechnung der N-CoR Repression. Die Luziferasewerte der einzelnen Proben wurden mit den erzielten β-Galactosidase Werten abgeglichen und normalisiert.

N-CoR<sub>ΔSANT1</sub> reprimiert ungefähr 25-fach und N-CoR<sub>ΔSANT2</sub> ungefähr 40-fach (Abb. 3.25). Die Doppeldeletion der N-CoR SANT1+2-Domäne zeigt eine 30-fache

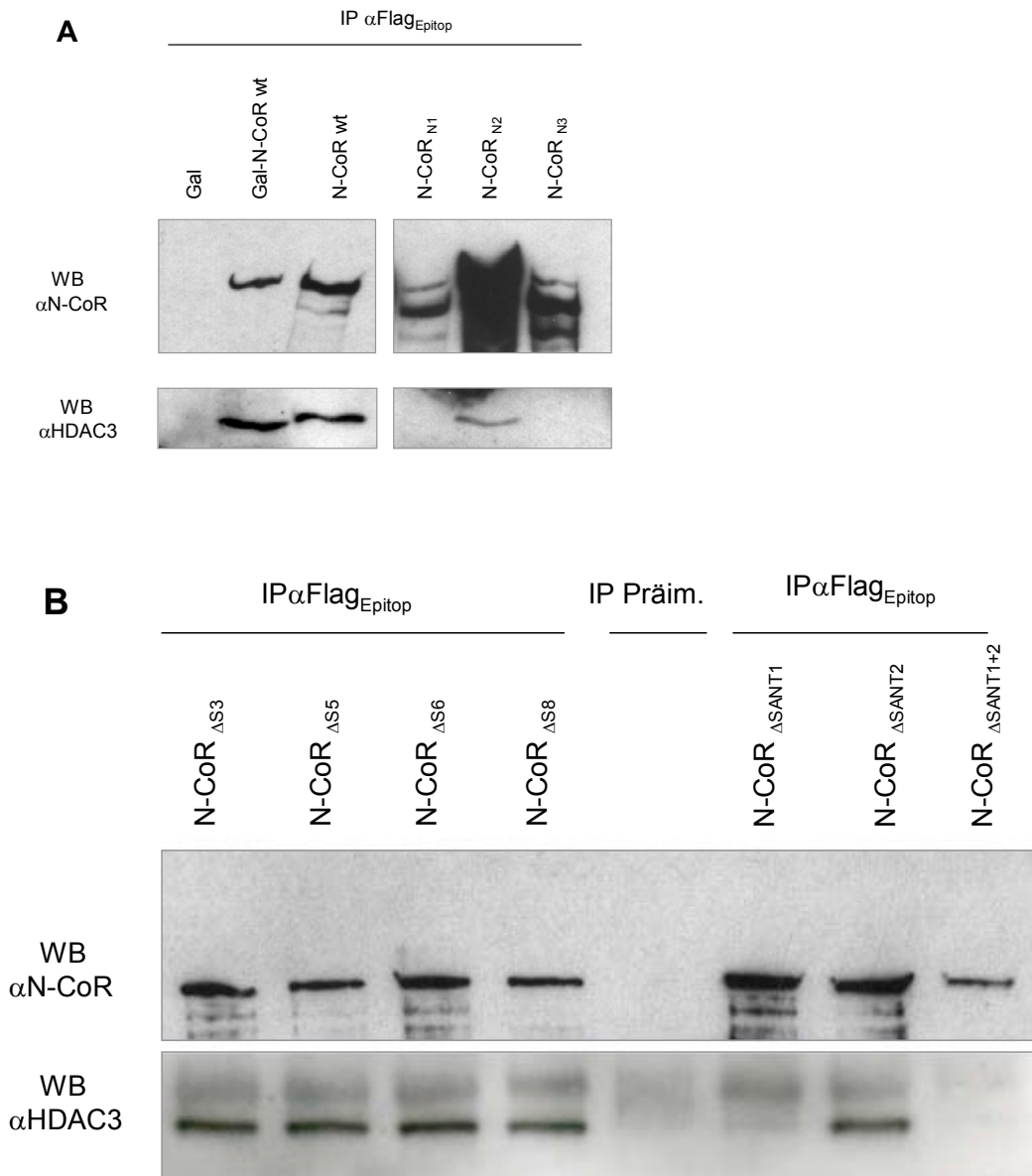
Repression des Luziferasewertes. Die Deletion der SANT1- oder der SANT2-Domäne beeinflusste die Repression des Korepressors N-CoR. Die N-CoR<sub>N1</sub> Mutante reprimierte die Transkription des Reportergenes im Vergleich zu Gal-DBD-N-CoR<sub>Wildtyp</sub> 25-fach, N-CoR<sub>N2</sub> reprimierte ungefähr 60-fach und das N-CoR<sub>N3</sub> Konstrukt nur 20-fach (Abb. 3.25). Der Austausch einiger Aminosäuren in der SANT1-Domäne führte im Fall von N-CoR<sub>N1</sub> und N-CoR<sub>N2</sub> zu einer starken Verminderung der Repression. Die Verminderung der Repression im Fall von N-CoR<sub>N1</sub> und N-CoR<sub>N3</sub> oder den N-CoR<sub>ΔSANT</sub>-Konstrukten könnte auf den Verlust einer Histondeacetylasebindung zurückzuführen sein. Aus diesem Experiment ergab sich außerdem, dass beide SANT-Domänen eine Funktion in der Repression des Proteins besitzen. Die N-CoR SANT1-Domäne scheint aber für die Repressionsaktivität des Korepressors wichtiger zu sein, als die SANT2-Domäne. Der Austausch des Lysins in der SUMO-Konsensussequenz hatte ebenfalls einen Einfluss auf die durch N-CoR vermittelte Repression (Abb. 3.25). Die N-CoR<sub>ΔSUMO</sub> Mutanten S2, S6 und S8 konnten den Reporter im Vergleich zur Repression von N-CoR Wildtyp nur noch ungefähr zu einem Drittel oder weniger reprimieren. N-CoR<sub>ΔSUMO</sub> Mutanten S3 und S5 zeigten ebenfalls eine reduzierte Repression. Mit beiden Konstrukten ergab sich jedoch eine starke Streuung der Meßwerte.

### 3.3.12 HDAC3 interagiert nicht mit N-CoR<sub>ΔSANT1</sub>

Die Histondeacetylase 3 ist als diejenige Komponente des N-CoR Korepressorkomplexes in der Literatur beschrieben worden, die von allen HDACs die stärkste Bindung an N-CoR besitzt (Guenther et al., 2000; Li et al., 2000; Underhill et al., 2000; Wen et al., 2000). 293T Zellen wurden mit Gal-DBD N-CoR<sub>WildtypFlag-Epitop</sub>, N-CoR<sub>Wildtyp Flag-Epitop</sub>, Gal-DBD, Gal-DBD N-CoR<sub>N1-N3Flag-Epitop</sub>, N-CoR<sub>ΔSANT</sub>- und N-CoR<sub>ΔSUMO</sub> Mutanten transient transfiziert. Die Zellen wurden in NETN Puffer lysiert und Extrakte mit einem αFlag Antikörper immunopräzipitiert. Anschließend wurden die Proben in einem Western Blot auf HDAC3 detektiert. Die Ko-Immunopräzipitation wurde durch Western Blot mit einem αN-CoR Antikörper überprüft. Die N-CoR Wildtypkonstrukte waren mit der Histondeacetylase 3 assoziiert. Die Mutanten N-CoR<sub>N1</sub>, N-CoR<sub>N2</sub> und N-CoR<sub>N3</sub> interagierten unterschiedlich mit der HDAC3. Lediglich N-CoR<sub>N2</sub> war mit der Histondeacetylase assoziiert. Die Immunopräzipitation der N-CoR<sub>N1</sub> und N-CoR<sub>N3</sub> Mutanten war deutlich schwächer als die für N-CoR<sub>N2</sub>. Der für die IP verwendete Antikörper erkannte das Flag-Epitop am C-Terminus der Proteine, dieser Bereich war für alle Mutanten identisch. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass durch die Alaninsubstitution in der SANT1-Domäne die Proteinarchitektur im N-Terminus der beiden Mutanten in der Weise verändert war, dass diese für proteolytische Spaltungen



anfällig waren. Im Vergleich zu N-CoR<sub>Wildtyp</sub> und dem N-CoR<sub>N3</sub> Konstrukt besaßen die Proteine N-CoR<sub>N1</sub> und N-CoR<sub>N2</sub> eine höhere elektrophoretische Mobilität (Abb. 27A).



**Abb. 3.26: Ko-Immunopräzipitation von HDAC3 und N-CoR <sub>$\Delta$ SANT- und N-CoR <sub>$\Delta$ SUMO-Mutanten</sub></sub>**

(A und B) 293T Zellen in 10 cm Schalen wurden mit 20  $\mu$ g Plasmid transient transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Lyse der Zellen in NETN Puffer. 200  $\mu$ l Extrakt wurde mit 1  $\mu$ g monoklonalem  $\alpha$ Flag Antikörper inkubiert und mit Protein A/G präzipitiert. Der WB wurde mit einem affinitätsgereinigtem Kaninchen  $\alpha$ N-CoR C' Antikörper und einem Ziege  $\alpha$ HDAC3 Antikörper durchgeführt. Hierfür wurde die Membran bei 150 kDa horizontal geschnitten. Das Molekulargewicht beträgt für N-CoR 270 kDa und für HDAC3 50 kDa.

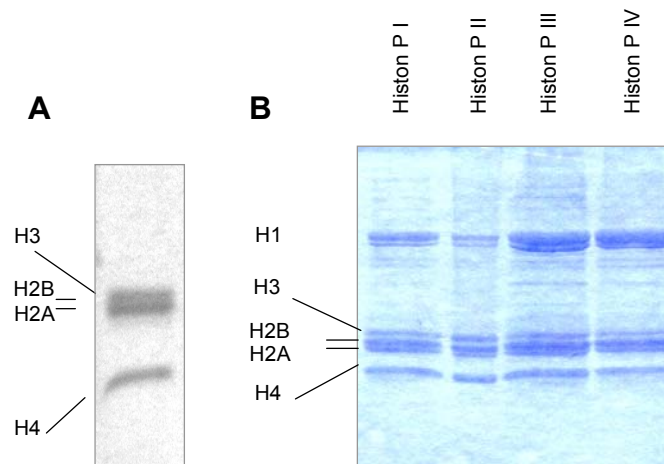
Die Mutante N-CoR <sub>$\Delta$ SANT2</sub> interagiert mit der Histondeacetylase 3. Hingegen war HDAC3 im Komplex der Mutanten N-CoR <sub>$\Delta$ SANT1</sub> und N-CoR <sub>$\Delta$ SANT1+2</sub> nicht mehr

assoziiert. Die untersuchten N-CoR<sub>ΔSUMO</sub> Mutanten lagen alle im Komplex mit der Histondeacetylase 3 vor.

### 3.4 Die SANT1-Domäne von N-CoR vermittelt die Histonbindung

Rekombinant exprimierte Histondeacetylasen besitzen meist keine enzymatische Aktivität. Eine spezifische Proteinaktivierung oder die Assoziation bestimmter Faktoren, scheinen für eine volle enzymatische Aktivität notwendig zu sein. Günther und Mitautoren (2001) konnten zeigen, dass ein definierter Bereich der Korepressoren SMRT/N-CoR, den sie als Histondeacetylase-Aktivierungsdomäne (DAD; As 395-489) bezeichneten, für die Aktivierung rekombinanter Histondeacetylase 3 notwendig ist. Die DAD der Korepressoren setzt sich aus einem Teil der SANT1-Domäne und einer unmittelbar aminoterminal angrenzenden Region zusammen. Die SANT1 Domäne ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Interaktion und Aktivierung der HDAC3 (siehe Abb. 3.25 und Abb. 3.26 B). Im Fall von CoREST und HDAC1 wurde ähnliches berichtet (Humphrey et al., 2001; You et al., 2001). In chromatinmodifizierenden Komplexen (SWI-SNF Komplex, SAGA Komplex, RSC-Komplex) wurde Proteinen, die eine SANT-Domäne enthalten (Swi3, Ada2, Rsc8/Swh3p), eine ähnliche Bedeutung zugeordnet (Boyer et al., 2002; Sterner et al., 2002). Boyer und Mitautoren fanden heraus, dass die SANT-Domäne von Ada2 die katalytische Aktivität der Histonacetyltransferase Gcn5 stimuliert und sogar Histonbindung vermittelt (Boyer et al., 2002). Für den Korepressor N-CoR wurde keine Interaktion zu Histonen beschrieben. Die Vermutung lag jedoch nahe, dass die SANT-Domänen des Korepressors ebenfalls Histonbindung vermitteln könnten. Aus dieser Interaktion könnte ferner eine Substratspezifität für im Korepressorkomplex assoziierte Histondeacetylasen resultieren. In diesem Abschnitt wird untersucht, ob eine Interaktion der N-CoR SANT-Domänen mit Histonen erfolgt und inwiefern die HDAC-Aktivität von diesen Domänen im Korepressorkomplex abhängt.

Für Histonbindungsstudien der SANT-Domäne war es notwendig, möglichst reine Histonfraktionen zu verwenden, in denen die Histone H2A, H2B, H3 und H4 enthalten waren. Daher wurden aus Jurkat oder 293T Zellen mittels saurer Acetonfällung Histone isoliert. Radioaktiv hyperacetylierte Histone konnten für Histonbindungsstudien oder als Substrat für Histondeacetylasetests verwendet werden. Die gewonnenen Proteinfractionen bestanden zu einem hohen Prozentsatz aus isolierten Histonen (Abb. 27 B).

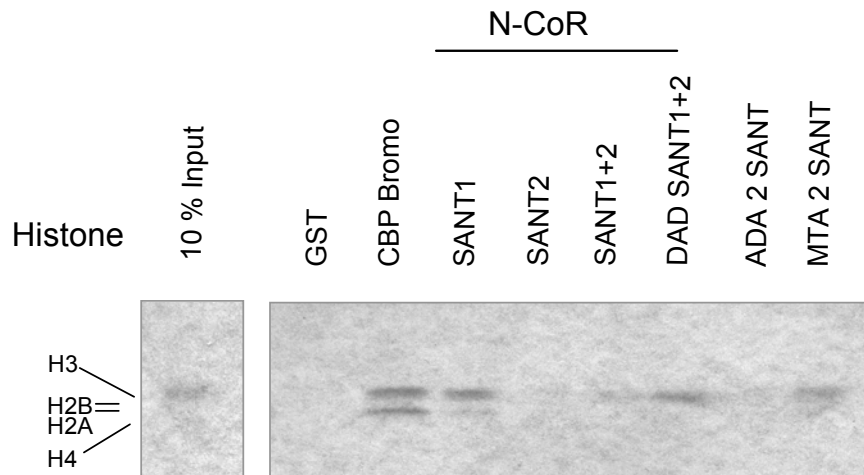


**Abb. 3.27: Histoneisolierung mittels saurer Acetatfällung**

$2 \times 10^7$  Zellen (293T, Jurkat) wurden für die Histonepräparation verwendet. Die Zellen wuchsen entweder nur in Medium oder wurden mit dem Histondeacetylase Inhibitor TSA (Trichostatin A) zur Isolierung hyperacetylierter Histone (**B**; PII und PIII) oder mit Anisomycin zur Isolierung hyperphosphorylierter Histone (**B**; PIV) behandelt. Die Vorinkubation der Zellen mit TSA und  $^3\text{H}$  markiertem Natriumacetat resultierte in der Isolierung von hyperacetylierten Tritiumacetat markierten Histonen. (**A**) Die Isolierung erfolgte mittels saurer Acetonfällung.  $5 \mu\text{l}$  HistoneLösung wurde auf ein SDS Gel aufgetragen und entweder autoradiographisch oder in einer Coomassie Färbung nachgewiesen.

### 3.4.1 Die N-CoR SANT1-Domäne interagiert mit Histon H3/H4

Die Interaktion zwischen der N-CoR SANT-Domäne und Histonen wurde in einem GST Pulldown Experiment untersucht. Die CBP Bromodomäne und die SANT-Domänen von N-CoR, ADA2 und MTA2 wurden mit  $^3\text{H}$  markierten hyperacetylierten Histonen inkubiert. Die CBP Bromodomäne, diente als Positivkontrolle und interagiert spezifisch mit hyperacetyliertem Histon H3 und H4. Die N-CoR SANT1-Domäne zeigte in der Autoradiographie ebenfalls eine spezifische Interaktion mit Histonen, hauptsächlich mit Histon H3 und in geringeren Umfang mit H4. Die Interaktion von N-CoR DAD SANT1+2 war deutlich stärker als die der reinen N-CoR SANT1+2 Domäne. Es bestand ferner ein Unterschied zwischen den beiden N-CoR SANT-Domänen. Die SANT2-Domäne des Korepressors interagiert nicht mit Histonen. Keine Interaktion war mit der SANT-Domäne von ADA2 zu Histon H3 zu sehen. Die SANT-Domäne von MTA2 hingegen interagiert mit Histon H3. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SANT-Domänen der Korepressoren, N-CoR und MTA2 mit hyperacetylierten Histonen H3 und zu einem geringeren Teil mit H4 interagierten. Die SANT-Domäne des ADA2 Proteins, welches im HAT-Komplex enthalten ist, zeigte keine Interaktion zu hyperacetylierten Histonen (Fig. 3.28).



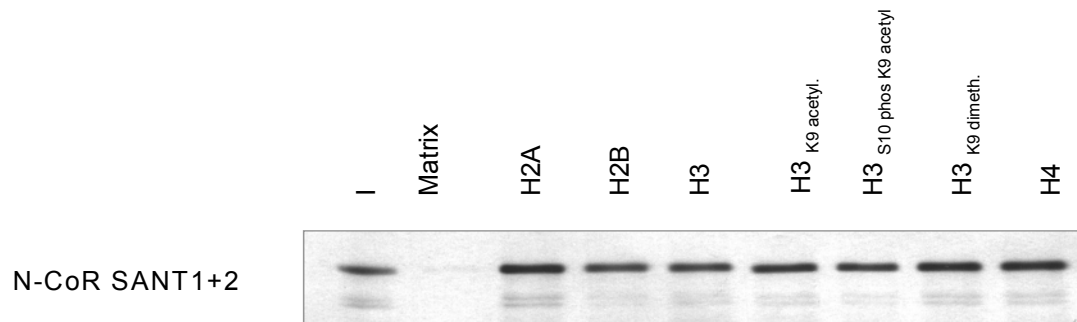
**Abb.3.28: Pull-down-Experiment mit GST-Fusionsproteinen und  $^3\text{H}$  markierten Histonen**

3  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$  markierte Histonlösung wurden mit verschiedenen GST-Fusionsproteinen (CBP Bromodomäne oder SANT-Domänen) oder GST dreißig Minuten unter Schütteln bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Proben wurden mit PPI Puffer gewaschen, anschließend auf einem 15%igem Gel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel dreißig Minuten in Amplify-Lösung inkubiert und anschließend auf Whatmanpapier getrocknet. Ein Röntgenfilm wurde für eine Woche auf das Gel aufgelegt.

### 3.4.2 Die N-CoR SANT1+2-Domäne interagiert mit Histonpeptiden

In einem weiteren Pull-down Experiment wurde überprüft, ob eine spezifische Interaktion der N-CoR SANT-Domäne zu Histon N-Termini besteht und inwiefern diese Interaktion durch bestimmte Modifikationen beeinflusst wird. Die N-CoR SANT1+2-Domäne wurde in einer *in vitro* Transkriptions-Translations-Reaktion (TNT) mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin exprimiert. Die verwendeten Peptide der Histon N-Termini (H3, H4, H2A, H2B) waren durchschnittlich 20 Aminosäuren groß und an ihrem C-Terminus biotinyliert. Im Fall von Histon H3 wurden für das Experiment ebenfalls Histonpeptide mit den Modifikationen Acetylierung (K9), Acetylierung (K9) und Phosphorylierung (S10) oder Dimethylierung (K9) eingesetzt. In dem Pull-down-Experiment wurde 1 pmol des N-CoR SANT1+2 Translatats mit 0.1 nmol biotinylierten Peptides inkubiert. Dies entsprach einem 100-fachem Überschuss an N-terminalen Histonpeptid zur N-CoR SANT1+2 Domäne. In der autoradiographischen Darstellung des Experiments zeigte sich eine starke Interaktion der N-CoR SANT1+2-Domäne mit allen verwendeten Peptiden. Lediglich die Probe in der das TNT Translatat mit der Streptavidin-Agarose inkubiert wurde, zeigte keine Bande. Für das Experiment stand leider kein biotinyliertes Peptid, mit ähnlicher Ladung, wie die der verwendeten Histonpeptide, zur Verfügung. Da die Histonpeptide eine starke positive Ladung besitzen sind generell starke unspezifische Interaktionen

zu Proteinen zu erwarten. Unter den gewählten Bedingungen (Inkubationszeit, Temperatur Stringenz des Waschens) zeigte sich für die SANT-Domäne von N-CoR eine Interaktion zu den N-Termini aller vier getesteten Histontypen (H3, H4, H2A, H2B) und im Fall von H3 unabhängig von einer Acetylierung oder anderen Modifikation.



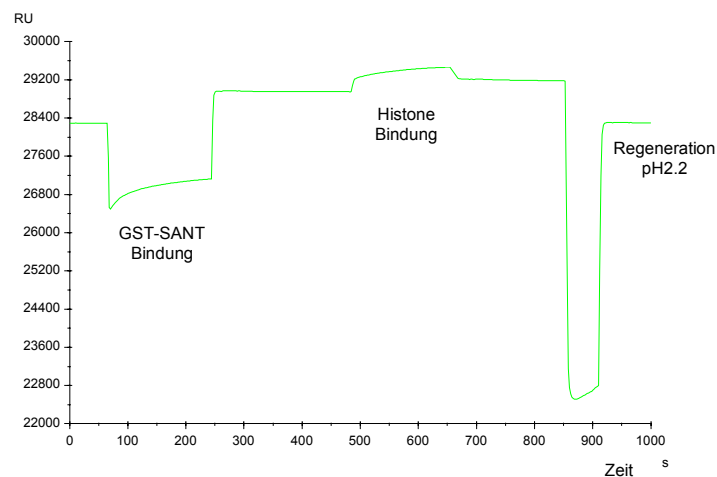
**Abb. 3.29: Pull-down-Experiment mit Histoneptiden und der N-CoR SANT-Domäne**

200 ng der Peptide (=0,1 nmol) wurden mit 2  $\mu$ l TNT Translatat N-CoR SANT1+2 (ungefähr 1 pmol) eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurde für 30 Minuten Streptavidin-Agarosematrix (in BSA 1 mg/ml) auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden danach 5 mal mit PPI Puffer gewaschen und auf ein 10%ig Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel getrocknet. Ein Röntgenfilm wurde über Nacht aufgelegt und anschließend entwickelt.

### 3.4.3 Bestätigung der Interaktion der SANT1-Domäne mit Histonen mittels Biacore-Messung

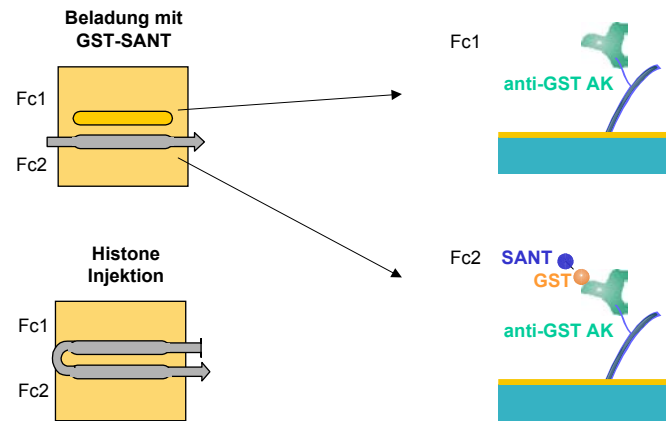
Mit der Biacore-Technologie sollte die Interaktion der N-CoR SANT1-Domäne mit Histonen überprüft werden. In diesem Experiment wird ein Bindungspartner an einen Sensorchip gebunden. Dies kann beispielsweise über einen Antikörper, der den eigentlichen Bindungspartner erkennt, geschehen. Im Anschluss fließt dann in einer Flusszelle Lösung des anderen Partners über den Sensorchip. Eine Optik mißt über die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR), wieviel Masse zu jedem Zeitpunkt an den Chip gebunden ist. Interagieren die Proteine, erhöht sich die Masse an der Oberfläche des Sensorchips (Assoziation). Die Masse fällt wieder während der Dissoziation. Mit der SPR werden die Veränderungen der Masse an der Oberfläche des Sensorchips durch die Messung des Brechungsindex während der Assoziation und Dissoziation gemessen. Die so gewonnenen Daten werden in einem Sensogramm, in der Einheit RU dargestellt (Relative response; 1 pg Protein/mm<sup>2</sup>). Die GST-N-CoR SANT1-Domäne sollte als Bindungspartner, über einen  $\alpha$ GST Antikörper an den Sensorchip gebunden werden. Die GST-N-CoR SANT1-Domäne wurde zunächst bakteriell exprimiert und anschließend auf einer Glutathion-Agarosematrix gereinigt. Mit reduziertem Glutathion wurde das Fusionsprotein anschließend von der Matrix eluiert.

Als zweiter Bindungspartner wurden die drei Histonfraktionen unbehandelter, hyperacetylierter und hyperphosphorylierter Histone aus 293T Zellen verwendet (siehe Abb. 3.27). Da es sich bei den Histonen um einen Mix aus H2A, H2B, H3, H4 und anderen Faktoren handelte, konnten keine Kinetiken zu den einzelnen Histonproteinen erstellt werden. Für das Experiment wurde der Sensorchip CM5 ausgewählt. Dieser Chip zeichnete sich durch eine extrem stabile carboxymethylierte Dextranmatrix aus. Die Matrix wurde zunächst mit EDC/NHS aktiviert und so für die kovalente Bindung des  $\alpha$ GST Antikörpers vorbereitet. Die Antikörperbindung an die Flusszellen Fc1 und Fc2 ergab 5000 RU Einheiten. Ein Problem der Messung bestand darin, dass der verwendete CM5 Chip tendenziell negativ geladen war und die Histone eine positive Ladung besaßen. Um eine unspezifische Bindung der Histone an die Matrix des Chips zu reduzieren, wurde dem Lauf- und Probenpuffer jeweils 500 mM NaCl zugesetzt. Der Verlauf der Messung ist in Abb. 3.30 dargestellt.



**Abb.3.30: Histonbindung im Biacore-Experiment**

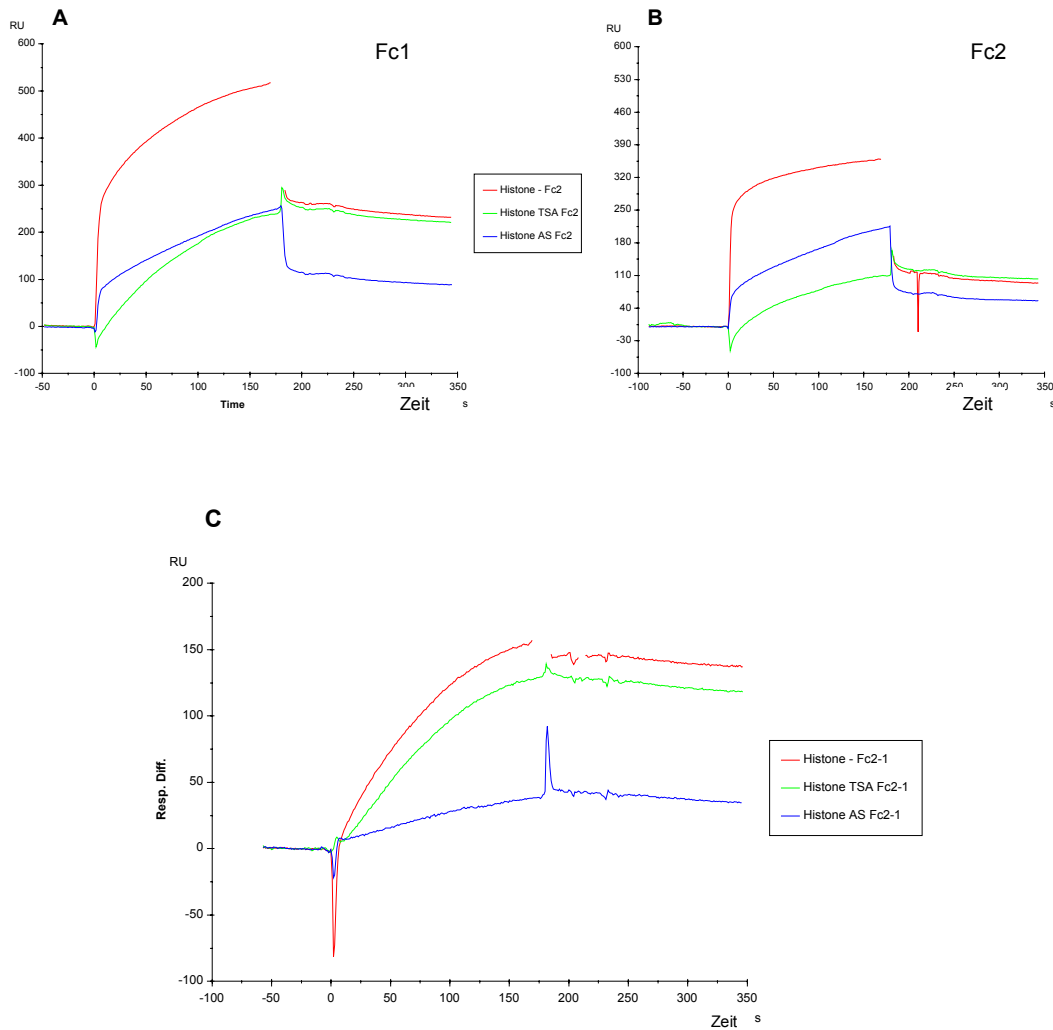
Aktivierung der Dextranmatrix des CM5 Chips mit EDC/NHS und Immobilisierung des  $\alpha$ GST Antikörpers. Der  $\alpha$ GST Antikörpers wurde in Kopplungspuffer mit pH 5 aufgenommen. Nach Waschen des Chips mit PBS wurde die Flusszelle mit Ethanolamin beladen, um nicht besetzte freie Gruppen zu deaktivieren. Nach erneutem Waschen, ergab sich für die Flusszelle Fc1 und Fc2 eine Antikörperbindung von 5000 RU Einheiten. Für diesen Versuch wurde der GST-Kopplungskit von Biacore verwendet. Die beiden Bindungspartner (GST-Fusionsprotein und Histone) konnten mit Regenerationslösung pH 2,2 von der Chipoberfläche gewaschen werden.



**Abb. 3.31: Schema der Flusszellen**

Die beiden Flusszellen auf dem CM5 Chip können unterschiedlich angesteuert werden. Fc1 und Fc2 waren mit  $\alpha$ GST Antikörper beladen, lediglich durch Flusszelle Fc2 erfolgte der Fluss von GST-N-CoR SANT1. Zum Waschen wurde zuerst der Laufpuffer durch Fc1 und dann durch Fc2 geleitet. Die Histonlösung floss ebenfalls in dieser Richtung über den Chip. Proben- und Laufpuffer enthielten 500 mM NaCl.

Die Kopplung des  $\alpha$ GST Antikörpers erfolgte an Fc1 und Fc2 (Abb. 3.31). Das Fusionsprotein GST-N-CoR SANT1 wurde jedoch lediglich über Flusszelle Fc2 geleitet (Abb. 3.31). Flusszelle 1 diente als Negativkontrolle, die nur mit dem Antikörper beladen war. Nach Bindung der GST-N-CoR SANT-Domäne an Flusszelle Fc2 wurde die Histonlösung über die Flusszelle Fc1 und dann über die Flusszelle Fc2 geleitet (Abb. 3.31). Im Sensogramm ist die Masseänderung an der Oberfläche des Sensorchips, resultierend aus der Bindung der Histone an die SANT-Domäne zu erkennen. Das Experiment wurde mit drei verschiedenen Histonfraktionen (Histone, hyperacetylierte Histone, hyperphosphorylierte Histone) durchgeführt, und die Assoziation und Dissoziation an die Flusszellen Fc1 und Fc2 sind Abb. 3.32 dargestellt. In allen drei Messungen kam es zu einer Masseänderung an der Oberfläche der Flusszellen Fc1 und Fc2. Durch Subtraktion der Signale an Fc1 (Negativkontrolle) von Fc2 (GST-SANT1-Domäne) erhält man die RU Einheiten (Relative response) der spezifischen Bindung der Histonfraktion an die GST-N-CoR SANT1-Domäne (Abb. 3.32 C). Die Histone aus unbehandelten 293T Zellen ergaben eine Masseänderung von 150 RU. Die hyperacetylierten Histone zeigten eine Veränderung von 120 RU. Hyperphosphorylierte Histone banden die N-CoR SANT1-Domäne lediglich mit 25 RU. Die Interaktion der N-CoR SANT1-Domäne mit Histonen wurde durch dieses Experiment bestätigt. Die N-CoR SANT1-Domäne interagiert mit Histonen aus 293T Zellen und geringfügig schwächer mit hyperacetylierten Histonen. Die Interaktion mit hyperphosphorylierten Histonen war deutlich schwächer.



**Abb 3.32: Biacore-Messung mit N-CoR SANT1-Domäne und Histonen**

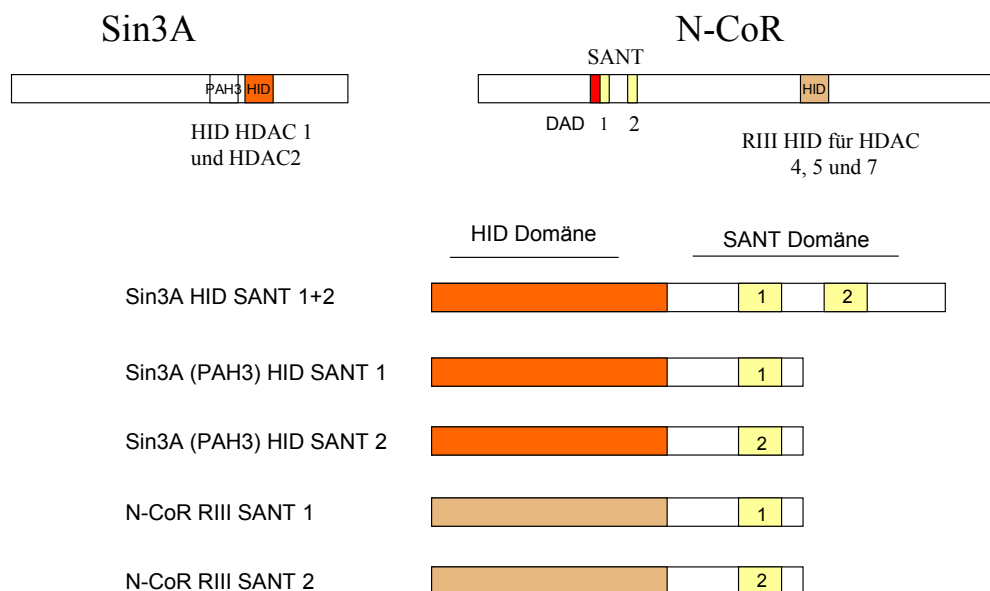
(A) Signale an Fc1 (GST-SANT) und (B) Fc2 (Negativkontrolle) der Histonbindung unbehandelten (Rot), hyperacetylierten (grün) und hyperphosphorylierten (blau) Histonen. Der Nullwert der Läufe wurden ab Histonbeladung gemessen. Die Bindung der Histone an GST-SANT1 oder Kontrolle ( $\alpha$ GST) ist in RU (Response Units) dargestellt. (C) Subtraktion der Signale Fc2-1. In rot dargestellt sind Histone aus unbehandelten 293T Zellen, grün hyperacetylierte Histone und blau hyperphosphorylierte Histone.

### 3.4.4 Kombination von Histoninteraktionsdomänen mit N-CoR SANT Domänen

Verschiedene Chimärenproteine wurden kloniert, die über eine Histondeacetylaseinteraktionsdomäne (HID) und eine SANT-Domäne(n) verfügten (Abb. 3.33). Der Repressor mSin3A interagiert mit HDAC1 und HDAC2 über eine Histondeacetylaseinteraktionsdomäne, welche C-terminal der PAH3 (paired amphiphatic helix 3) des Proteins lokalisiert ist (Abb. 3.33). Für die Korepressoren SMRT und N-CoR wurde neben der HDAC3 Interaktion, die Interaktion mit den HDACs 4, 5 und 7 über die Repressionsdomäne III beschrieben (Abb. 3.33).



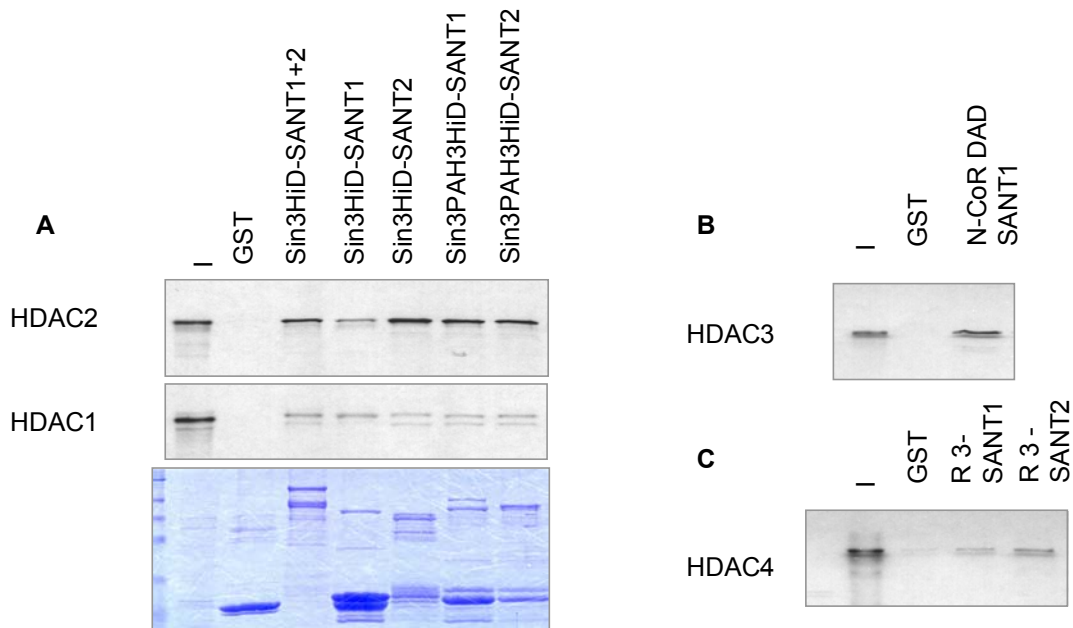
Die Histondeacetylaseinteraktionsdomänen aus mSin3 und N-CoR wurden N-terminal zu der SANT1, SANT2 oder den SANT1+2-Domänen des Korepressors N-CoR kloniert (Abb. 3.33). Diese als GST-Fusionen klonierten Proteine sollten über die SANT1-Domäne Histonbindung vermitteln und über eine N-terminal gelegene HID spezifisch das Enzym in die Nähe des Histonsubstrates bringen. Die Konstrukte wurden in separaten PCR-Reaktion amplifiziert (SANT1, SANT2, SANT1+2, DADSANT1, Repressionsdomäne III von N-CoR (HID) und PAH3+HID oder lediglich die minimale HID aus Sin3A). Nach dem Restriktionsverdau wurden die Fragmente miteinander ligiert und in den Vektor pGEX kloniert. Dieser Vektor erlaubte die Expression der Konstrukte als GST-Fusionsproteine. In einem Pulldown-Experiment mit den verschiedenen GST-Fusionen und den spezifischen HDACs wurde überprüft, ob eine spezifische Interaktion zwischen dem SANT-Chimärenprotein und der HDAC erfolgte (Abb. 3.34).



**Abb. 3.33: Klonierung von SANT-Chimärenproteinen.**

Mittels PCR wurden die Fragmente SANT1, SANT2, SANT1+2 und Repressionsdomäne III aus einer N-CoR cDNA amplifiziert. PAH3 und PAH3 HID wurden aus einer mSin3A cDNA mittels PCR amplifiziert. Die Primer besaßen Restriktionsschnittstellen und die SANT-Fragmente wurden so mit den HID von mSin3 und N-CoR ligiert. Anschließend wurde mittels PCR aus dem Ligationsansatz das Chimärenfragment amplifiziert, danach erneut geschnitten und in einen pGEX Vektor kloniert. Durch bakterielle Expression konnte das GST-Chimärenfusionsprotein angereichert und über eine Glutathion-Agarosematrix aufgereinigt werden.

Zu diesem Zweck wurden die HDACs 1, 2 und 4 *in vitro* in einer Transkriptions-Translationsreaktion mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin exprimiert. Die N-CoR DAD-SANT1-Domäne wurde ebenfalls als GST-Fusionsprotein gereinigt und sollte als natürliche HDAC3 Interaktionsdomäne als Positivkontrolle dienen (Abb. 3.34).



**Abb. 3.34: Pull-down-Experiment der SANT-Chimärenproteine und verschiedener HDACs**

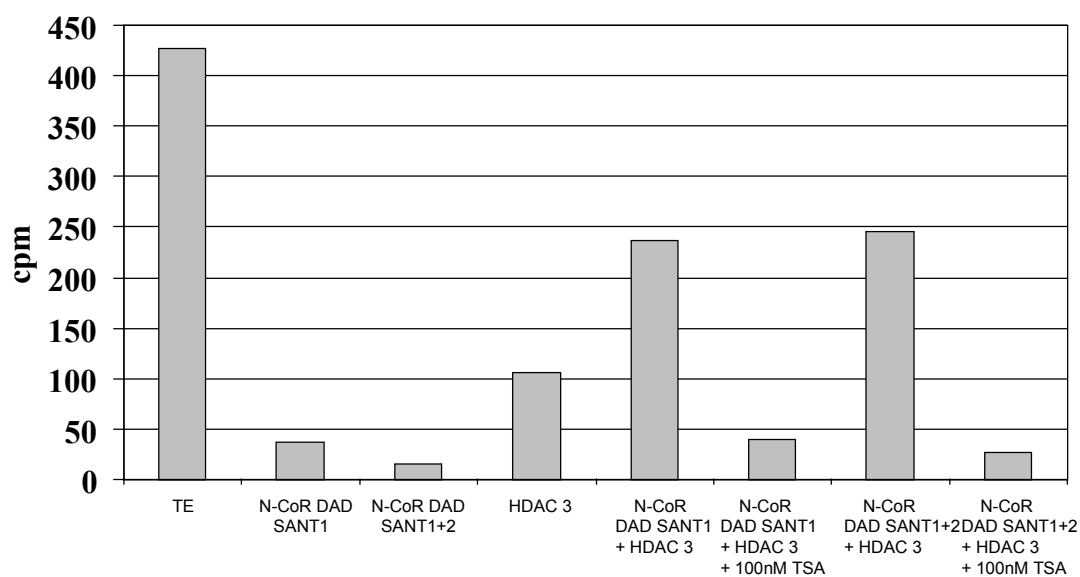
Pull-down-Experiment mit GST-Chimärenproteinen und TNT translatierten HDAC2, HDAC1, HDAC4 und HDAC3 (A-C). 3  $\mu$ l TNT Translatat wurden mit GST alleine oder mit den entsprechenden GST-Fusionen für eine Stunde bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit PPI Puffer gewaschen, mit Lämmli Puffer aufgeköcht und auf ein Gel aufgetragen. Nach Fixierung und Amplify Inkubation wurden die Gele getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt.

Die Interaktion zwischen der N-CoR DAD SANTI1-Domäne und HDAC3 konnte bestätigt werden (Abb. 3.34 B). Die Histondeacetylasen 1 und 2 interagierten sowohl mit der Sin3A PAH3 HID als auch mit der minimale Sin3A HID. Die Interaktion von HDAC2 mit Sin3A HID war deutlich stärker als die Interaktion von HDAC1 mit den Chimärenproteinen (Abb. 3.34 A). Die Klasse II Histondeacetylase HDAC4 interagiert ebenfalls mit der beschriebenen N-CoR HID (Abb. 3.34 C). Die Inkubation der TNT translatierten HDACs mit der GST-Agarosematrix zeigte keine unspezifischen Interaktionen. Die Klonierung einer Histondeacetylase-interaktionsdomäne N-terminal vor eine N-CoR SANT-Domäne beeinflusste die Interaktion der HDACs zu ihren spezifischen HIDs nicht. Die Konstrukte eigneten sich daher für die Verwendung in HDAC-Tests.

### 3.4.5 HDAC3 Aktivierung durch N-CoR DAD SANTI1

Rekombinant exprimierte HDAC3 wurde mit der N-CoR DAD SANTI1-Domäne oder N-CoR DAD SANTI1+2-Domäne in einem Histondeacetylasetest untersucht. Die rekombinanten Histondeacetylasen 2 und 4 sollten ebenso mit den jeweils spezifischen Chimärenproteinen in einem Histondeacetylasetest auf Enzymaktivität getestet werden. Hierfür wurden die entsprechenden Chimären-Fusionsproteine nach

Aufreinigung über eine Glutathion-Agarosematrix mit freiem Glutathion von der GST-Agarosematrix eluiert. Als Substrat der Reaktion dienten die unter Abschnitt 3.5.1 isolierten  $^3\text{H}$  markierten hyperacetylierten Histone. Die  $^3\text{H}$  markierten Histone wurden mit den GST-Chimärenproteinen in entsprechendem Puffer inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit der Probenansatz gefällt und der Überstand, mit freien  $^3\text{H}$  Acetat in einem Szintilisationszähler gemessen. Als Kontrolle des Tests wurden die Histone, die GST-Fusionen und die TNT Translatate alleine inkubiert und gemessen. Die Zugabe des Histondeacetylase Inhibitors TSA sollte die Spezifität der HDAC Aktivierung zeigen.



**Abb. 3.35: Histondeacetylasetest mit N-CoR DAD SANT1 und HDAC3**

10  $\mu\text{l}$  TNT translatierte HDAC3 wurden mit 60  $\mu\text{l}$  bakteriell expremiertem GST-Fusionsprotein (SANT1 oder SANT1+2-Domäne) im Histondeacetylasetest getestet. Einem Kontrollansatz wurde 100 nM TSA zugesetzt um die Aktivierung der HDAC zu inhibieren. Als Kontrolle wurden jeweils nur die GST-Fusionen oder die TNT translatierte HDAC3 getestet. Die Aktivität endogener HDACs wurde durch Verwendung von 50  $\mu\text{l}$  Totalextrakt (TE) aus 293 T Zellen untersucht.

Im Histondeacetylasetest konnte die Aktivierung rekombinanter HDAC3 mit der N-CoR DAD SANT1-Domäne bestätigt werden (Abb. 3.35). Die N-CoR DAD SANT1-Domäne oder N-CoR DAD SANT1+2-Domäne ergaben in dem Test keine signifikante Eigenwerte. Die Eigenaktivität der rekombinanten HDAC3 alleine betrug ebenfalls nur 100 cpm. Inkubation der N-CoR DAD SANT1-Domäne mit der HDAC3 zeigte die enzymatische Aktivierung der HDAC. Durch Zugabe von 100 nM TSA konnte diese enzymatische Aktivität inhibiert werden. Die Histondeacetylase 3 konnte demnach spezifisch in einem Histondeacetylasetest aktiviert werden (Abb. 3.35). Für die Histondeacetylase HDAC2 und HDAC4 konnte in verschiedenen Test keine Aktivierung mit den klonierten Chimärenproteinen festgestellt werden (Daten nicht

gezeigt). Die Aktivierung der HDAC2 und 4 konnte mit den Histoninteraktionsdomänen aus mSin3 und N-CoR und einer N-CoR SANT-Domäne ebenfalls nicht rekonstituiert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass eine native Aktivierungssequenz für diese HDACs oder eine spezifische räumliche Anordnung der Domänen, wie im Fall der N-CoR DAD für HDAC3, benötigt wird.

## 4 Diskussion

Die Korepressoren N-CoR und SMRT existieren in großen Proteinkomplexen, in denen Histondeacetylasen (HDACs) enthalten sind. Deacetylierung bzw. Acetylierung ist eine dynamische Modifikation des Chromatins und beeinflusst durch die Rekrutierung von Kofaktoren die Transkription von Genen. N-CoR Knockout-Studien ergaben, dass N-CoR einerseits Aufgaben in der embryonalen Entwicklung übernimmt und andererseits neben der kurzzeitigen Repression von nukleären Hormonrezeptoren (Hörlein et al., 1995) auch eine langfristige Repression durch REST/NRSF stattfindet (Jepsen et al., 2000). Der Korepressor N-CoR enthält zwei SANT-Domänen. Diese Domäne wurde in 135 humanen Proteinen gefunden (<http://smart.embl-heidelberg.de>). SANT-Domänen enthaltende Faktoren gehören zu unterschiedlichen Kategorien von Proteinen, wie beispielsweise Transkriptions-faktoren oder Koregulatoren. Die Proteine lokalisieren überwiegend im Nukleus und sind in Chromatinmodifizierung oder Transkription involviert. Die Zusammensetzung des N-CoR Komplexes und damit seine Spezifität und Aktivität wird einerseits durch die Assoziation von Proteinen und/oder durch posttranslationale Modifikationen einzelner Faktoren gesteuert. Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Identifikation von Interaktionspartnern der N-CoR SANT-Domänen und deren anschließende Charakterisierung im Korepressorkomplex. Die SANT-Domänen von N-CoR wurden ebenfalls im Zusammenhang der Histoncodehypothese betrachtet. Die enzymatische Aktivität rekombinanter HDACs wurde unter dem Gesichtspunkt der Histonbindung der SANT-Domäne experimentell untersucht.

### 4.1 Die N-CoR SANT-Domänen vermitteln Proteininteraktionen

In einer Far-Western-Blot Hybridisierung mit der N-CoR SANT1+2 Sonde (As 425-758) konnten mehrere potentielle Interaktionspartner, mit einem Molekulargewicht zwischen 17 und 300 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Die Immunopräzipitation der Korepressoren N-CoR oder SMRT aus verschiedenen Extrakten ergab in einer weiteren Hybridisierung 20 dominante Proteinbanden mit dieser Sonde (Abb. 3.3). Die Resultate der Far-Western Hybridisierungen deuten erstmals darauf hin, dass lediglich die SANT-Domänen oder die Linkerregion zwischen SANT1 und SANT2 in N-CoR einen Interaktionsbereich für Protein-Protein Wechselwirkungen darstellen. Dies widerspricht der Hypothese einer möglichen DNA-Bindungsfunktion der SANT-Domäne, die aufgrund der hohen Homologie zur Myb-ähnlichen-Domäne diskutiert wurde (Aasland et al., 1996). Für den Großteil der Proteine, die eine SANT-Domäne enthalten, wurde keinerlei DNA-Bindung beschrieben. Diese Erkenntnis und die positiven Ergebnisse der Far-Western-Blot Hybridisierungen, legten die Durchführung eines Screens mit der N-CoR SANT1+2-Domäne (As 429-683) zur Identifikation von Proteininteraktionspartnern nahe.

Zwei Screening-Methoden wurden für die Identifikation von Interaktionspartnern gewählt. Einerseits wurde ein Far-Western Hybridisierungsscreen durchgeführt. Diese Methode liefert direkte Interaktionen zwischen einer markierten Sonde und in Bakterien exprimierten Proteinen, welche mit Hilfe von Phagen (cDNA-Expressionsbank) eingebracht werden. Dieses *in vitro* Experiment wird über mehrere Screeningrunden wiederholt und die positive cDNA wird durch die Isolierung der Phagen in dieser Weise amplifiziert. Zweitens wurde ein klassischer Hefe-Zwei-Hybrid Screen angewendet. Dieser liefert mittels stabiler Expression des Bait-Konstruktes (Köder) und einer Expressionsbank (Beute/Prey) in einem auxotrophen Hefestamm Interaktionspartner in einem *in vivo* Kontext. In der Hefe können die Proteine der Expressionsbank durch posttranslationale Modifikationen verändert werden. Allerdings können auch Hefeproteine mit Bait und Prey interagieren oder ein Prey-Protein die Reportergene aktivieren und so falsch positive Interaktionspartner liefern (Bartel et al., 1993).

Der Far-Western Hybridisierungsscreen lieferte in mehreren durchgeführten Versuchen keine Klone, die sich in weiteren Screeningrunden amplifizieren ließen. Da die Phagen-Expressionsbank eine hohe Diversität besaß und die einzelnen Versuche sehr gute Effizienzen ergaben, lag eine mögliche Erklärung darin, dass bestimmte posttranslationale Modifikationen der eukaryotischen Proteine in den Bakterien nicht erfolgten und deshalb *in vitro* keine Interaktion stattfand. In den Far-Western-Blot Hybridisierungen mit Säugerzellextrakten ist von solchen Modifikationen auszugehen. Dies erklärt, warum man unter diesen Bedingungen verschiedene Interaktionsbanden erhalten hat (Abb. 3.2 und 3.3). Aufgrund der geringen Konzentration der Proteine und der Immobilisierung auf einer Nitrozellulosemembran wurden diese Banden nicht für eine weitere Analyse herangezogen.

Der Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurde mit einer murinen embryonalen Expressionsbank durchgeführt. Insgesamt wurden  $1,1 \times 10^7$  Klone untersucht; dies entspricht etwa einer dreifachen Abdeckung der Expressionsbank ( $3,5 \times 10^6$  unabhängigen cDNAs). Nach weiteren Plattierungsrunden unter höherer Stringenz wuchsen noch 37 Hefeklone (Abb. 3.6). 17 verschiedene cDNAs, die für 14 Proteine kodierten konnten im Screen isoliert werden. PIAS1, Ubc9 und Thymin DNA Glycosylase wurden jeweils mit zwei verschiedenen unabhängigen cDNAs gefunden (Tab. 3.1). Insgesamt 9 mal wurde der Klon cDNA I gefunden. Als zweithäufigster Klon ist  $\alpha$ -Actinin 2 (5 mal) zu nennen, gefolgt von PIAS1, BTBD1 und Thymin DNA Glycosylase (jeweils 4 mal). RanBP9 und Ubc9 wurden insgesamt jeweils in zwei Hefeklonen als Interaktionspartner isoliert. Alle anderen Klone wurden nur einmal im Screen identifiziert (Tab. 3.1).

Die Retransformation ergab für die Klone cDNA I,  $\alpha$ -Actinin 2, eIF3 und die cDNA II kein positives Ergebnis. Diese Klone waren in dem Hefe-Zwei-Hybrid Screen möglicherweise falsch positive Interaktionspartner. Wobei Hefen mit der cDNA I und der N-CoR SANT1+2-Domäne  $\beta$ -Galactosidase exprimierten, dies aber nicht mit cDNA I und der

Gal-DBD Domäne alleine taten. Aus diesem Grund wurde der am häufigsten gefundene Hefeklon für weitere Experimente einbezogen. Die Proteine eIF3,  $\alpha$ -Actinin 2 und die cDNA II wurden nicht weiter verfolgt. Alle anderen Interaktionspartner wuchsen nur in den Hefen mit dem transformierten Baitkonstrukten (N-CoR SANT1+2) und zeigten im Blau-Weiß-Test spezifische  $\beta$ -Galactosidase Aktivität. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zehn der im Screen gefundenen Proteine in der Hefe spezifisch mit der N-CoR SANT1+2-Domäne interagierten.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Bindung der Hefe-Interaktionspartner an die N-CoR SANT1+2-Domäne auch *in vitro* in einem GST-Pulldown-Experiment bestätigt werden konnte (Abb. 3.8). Für die Proteine cDNA I, PIAS1, Ubc9, TDG und TAF<sub>II</sub>250 konnte eine spezifische Interaktion mit der SANT1-Domäne (As 435-492) nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Hoxa-4 hingegen benötigt für die Interaktion neben der SANT1-Domäne noch einen N-terminalen Bereich des Linkers (As 493-623). Der Linker mit dem coiled-coil Motiv war für keines der Proteine als Interaktionsdomäne ausreichend. Die SANT2-Domäne in N-CoR zeigte lediglich mit TDG eine schwache Interaktion. Aus den Ergebnissen der Pulldown-Experimente lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der SANT1- und der SANT2-Domäne in N-CoR ablesen (Abb. 3.8 und Abb. 3.9).

Die im Hefe-Screen gefundenen Interaktionspartner sind spezifisch für den Korepressor N-CoR, da die SANT-Domänen von MTA2 und ADA2 im Pulldown-Experiment nicht mit diesen interagierten (Abb. 3.8). Lediglich die Proteine der cDNA I und TDG zeigten eine schwache Interaktion mit den SANT-Domänen von MTA2 und ADA2. Für PIAS1 und die cDNA I konnten zusätzliche Regionen in N-CoR als Interaktionsbereiche gefunden werden (Abb. 3.10). PIAS1 und die cDNA I interagierten zusätzlich mit dem N-Terminus (As 1-393) des Korepressors. Die SUMO-E3-Ligase PIAS1 interagiert daher möglicherweise ebenso mit der Repressionsdomäne I, in der mehrere SUMO-Konsensussequenzen enthalten sind. Die cDNA I interagierte zusätzlich mit dem Aminosäurebereich 1679-2543, in dem unter anderem die Interaktionsdomäne der nukleären Hormonrezeptoren lokalisiert ist (Abb. 3.10). Die Klone BTBD1, RanBP9, Pc2 und CGBP wurden entweder nicht in einen für die Transkriptions-Translationsreaktion geeigneten Vektor kloniert oder ließen sich nicht TNT translatieren.

## 4.2 N-CoR ist SUMO modifiziert

Drei der im Hefe-Screen gefundenen Proteine (PIAS1, Ubc9 und Pc2) deuteten darauf hin, dass N-CoR posttranslational sumoyliert sein könnte. Die Proteine Ubc9 und PIAS1 spielen eine Rolle in der Übertragung von SUMO auf Substrat-Proteine (Melchior, 2000; Muller et al., 2001). Als bisher einziges SUMO-Konjugationsenzym (E2-Enzym) wurde Ubc9 für die Sumoylierungsreaktion beschrieben. PIAS1 wurde beispielsweise als spezifische SUMO-E3-

Ligase für den Transkriptionsfaktor Sp3, den Tumorsuppressor p53 und den Androgenrezeptor beschrieben (Kahyo et al., 2001; Nishida und Yasuda, 2002; Sapetschnig et al., 2002). Die SUMO-E3-Ligase vermittelt und verstärkt die Übertragung von SUMO auf ein Zielprotein. In einer neueren Studie wurde ebenfalls das Polycomb Protein Pc2 als SUMO-E3-Ligase für den Repressor CtBP beschrieben (Kagey et al., 2003). SUMO-Substratproteine enthalten eine bestimmte Konsensussequenz ( $\Psi$ KXE). Der Korepressor N-CoR enthält insgesamt acht dieser Sequenzen. Vier Konsensussequenzen sind in der Repressionsdomäne I (RI) lokalisiert und vier weitere in Repressionsdomäne III (RIII) enthalten (Abb. 3.11; Tab. 3.2).

Durch eine Ko-Immunopräzipitation konnte die Interaktion zwischen N-CoR und der SUMO-E3-Ligase PIAS1 *in vivo* verifiziert werden. Endogenes PIAS1 lag in verschiedenen Zelllinien (MCF7; Cos7; 293 und HeLa) nur in sehr geringer Konzentration vor. Außerdem stand kein spezifischer  $\alpha$ PIAS1 Antikörper zur Verfügung und daher wurden 293T Zellen mit cDNA von PIAS1, die ein Flag-Epitop besaß, transfiziert. Die Ko-Immunopräzipitationen aus diesen Zellysaten ergaben eine Assoziation von N-CoR und PIAS1 (Abb. 3.12 B). Die Interaktion konnte mittels Ko-Immunopräzipitation von N-CoR sowie von PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> im Western Blot gezeigt werden.

Ein Problem der Identifikation von SUMO-Zielproteinen ist die Tatsache, dass diese Proteine durch Isopeptidasen während der Zellyse in nicht-denaturierenden Puffern rapide dekonjugiert werden. Zudem existieren keine brauchbaren  $\alpha$ SUMO Antikörper. Ferner scheint es, dass lediglich eine kleine Subpopulation eines Proteins *in vivo* SUMO-modifiziert ist. Dies erklärt beispielsweise auch, warum bei so intensiv studierten Proteinen wie p53 und I $\kappa$ B $\alpha$  diese posttranslationale Modifikation lange übersehen wurde (Rodriguez et al., 1999). Durch Verwendung eines denaturierenden Puffers (RIPA) und des Isopeptidase Inhibitors *N*-ethylmaleimide (NEM) bei der Zellyse, konnten in einem Western Blot zwei Proteinformen des Korepressors N-CoR nachgewiesen werden. Die N-CoR Form mit dem höheren Molekulargewicht konnte durch heterologe Expression der SUMO-E3-Ligase PIAS1 verstärkt werden (Abb. 3.14). Die Expression von SUMO-YFP in 293T Zellen ließ ebenfalls eine N-CoR Form mit einem höheren Molekulargewicht im Western Blot erscheinen (Abb. 3.15). Der Korepressors N-CoR hat ein Molekulargewicht von 270 kDa. In einem SDS-Gel laufen SUMO-N-CoR Formen mit einem noch größeren Molekulargewicht. Leider konnte selbst in einem 7%igem SDS-Gel in diesem Bereich nicht zwischen einzelner oder mehrfacher Sumoylierung von N-CoR unterschieden werden. Um dieser Frage nachzugehen wurde der N-Terminus des Proteins, der vier SUMO Konsensusstellen in der Repressionsdomäne I enthält (As 1-549) in einem *in vitro* SUMO-Test eingesetzt (Abb. 3.16). Gal-DBD-N-CoR 1-549 hat ein Molekulargewicht von ungefähr 70 kDa. Mit PIAS1 als SUMO-E3-Ligase erschienen in der Autoradiographie drei modifizierte SUMO-N-CoR



Formen (90, 110 und 140 kDa). Die SUMO-E3-Ligase RanBP2 hingegen modifizierte Gal-DBD-N-CoR 1-549 nicht, das Protein lief nur mit einem Molekulargewicht von 70 kDa. Der Test zeigte, dass PIAS1 eine spezifische SUMO-E3-Ligase für N-CoR ist. Als Positivkontrolle wurde RanGap1 in dem SUMO-Test eingesetzt. Das Protein wurde *in vitro* fast zu 100 Prozent modifiziert (Abb. 3.16).

### 4.3 Änderung der N-CoR Lokalisation durch heterologe Expression der SUMO-E3-Ligase PIAS1

Endogenes N-CoR lokalisiert in 293T Zellen größtenteils im Nukleus, ist aber nicht in den Nukleoli enthalten. Lediglich ein kleiner Prozentsatz der Proteinpopulation befindet sich im Zytoplasma. Die Verteilung des Korepressors im Zellkern erscheint punktiert und lokalisiert in bestimmten Aggregaten. Die heterologe Expression der SUMO-E3-Ligase PIAS1 bringt N-CoR in die Nähe der Kernmembran. Die typische punktierte Verteilung weicht einer eher diffusen, gleichförmigen Verteilung (Abb. 3.17).

In 293T Zellen, in denen die SUMO-E3-Ligase heterolog exprimiert wurde, kolokalisierten N-CoR und PIAS1 deutlich. Besonders an der Kernmembran war eine starke Kolokalisation beider Proteine zu erkennen (Abb. 3.17). Konfokalmikroskopie von Zellen, in denen verschiedene N-CoR Mutanten heterolog exprimiert waren (N-CoR<sub>N1-N3</sub> und N-CoR<sub>ΔSANT1</sub>, N-CoR<sub>ΔSANT2</sub> und N-CoR<sub>ΔSANT1+2</sub>) zeigten ebenfalls eine Kolokalisation mit PIAS1 (Abb. 3.19, 3.21, 3.22 und 3.23). Ohne PIAS1 Expression lokalisierten die Gal-N-CoR Mutanten ähnlich wie endogenes N-CoR. Der Korepressor N-CoR lokalisierte verstärkt in der Nähe der Kernmembran. Dies traf ebenso für die Mutanten N-CoR<sub>N1-N3</sub> zu, sie zeigten bei heterologer Expression von PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> die gleiche Lokalisationsänderung (Abb. 3.21). Die typische punktierte Verteilung von N-CoR im Zellkern verschwand und das Protein war gleichförmiger im Kern verteilt. Die bei endogenem N-CoR oder bei den Alanin Substitutionen in der SANT1-Domäne beobachtete Lokalisierung des Korepressors in der Nähe der Kernmembran, traf nicht für N-CoR<sub>ΔSANT</sub> Mutanten zu (Abb. 3.21 und 3.23).

In der SUMO Konsensussequenz (ΨKXE/D) ist das Lysin als einzige Aminosäure festgelegt. Über diese Aminosäure erfolgt die Thioesterbindung mit dem SUMO Protein. Die SUMO-Stellen S2, S3, S5, S6 und S8 wurden für die Alanin Substitution ausgewählt (Tab. 3.2 und Abb. 3.22). N-CoR-SUMO-Mutanten wurden in Cos 7 Zellen transient transfiziert. Die Mutanten N-CoR<sub>ΔS2</sub>, <sub>ΔS3</sub>, <sub>ΔS5</sub> und N-CoR<sub>ΔS8</sub> waren hierbei größtenteils nukleär lokalisiert. Alle Mutanten zeigten aber auch eine zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 3.24). Besonders das Konstrukt N-CoR<sub>ΔS6</sub> lokalisierte größtenteils im Zytoplasma. Kotransfektion von N-CoR<sub>ΔS</sub>-Mutanten und PIAS1<sub>Flag-Epitop</sub> in diesen Zellen, ergab für N-CoR<sub>ΔS3</sub>, N-CoR<sub>ΔS5</sub> und N-CoR<sub>ΔS6</sub> eine ähnliche Verteilung wie bei endogenem N-CoR (Abb. 3.17 und 3.24). Der Korepressor

lokalisierte bei heterologer Expression von PIAS1 stark im Bereich der Kernmembran (Abb. 3.24). Die punktartige Verteilung von N-CoR im Kern ging bei allen N-CoR<sub>ΔS</sub> Mutanten durch heterologe Expression von PIAS1 verloren. N-CoR<sub>ΔS6</sub> zeigte auch mit Kotransfektion von PIAS1 eine stärkere zytoplasmatische Lokalisation, als die anderen N-CoR<sub>ΔS</sub>-Mutanten. Die SUMO-E3-Ligase PIAS1 kolokalisierte mit allen N-CoR<sub>ΔS</sub>-Mutanten (Abb. 3.24).

Die nukleären PML-Körperchen (nuclear bodies =NB) wurden im Zusammenhang der SUMO-Modifikation intensiv untersucht, da Proteine und im Besonderen die Hauptproteine dieser Aggregate PML und SP100 sumoyliert werden (Muller et al., 1998; Sternsdorf et al., 1997). Die SUMO-Modifikation ist kritisch für die Bildung der PML-Körperchen. Müller und Koautoren (1998) konnten zeigen, dass SUMO-PML hauptsächlich in den nicht löslichen NBs enthalten ist. Ferner besitzen PML<sup>-/-</sup> Zellen eine diffuse Verteilung anderer NB-Proteine (SP100, Daxx, ISG20, BLM, CBP) oder diese lokalisieren nicht normal (Ishov et al., 1999; Zhong et al., 2000). PML Mutanten, die nicht mehr sumoyliert werden können, zeigten einen gleichen Effekt wie in den PML<sup>-/-</sup> Zellen (Duprez et al., 1999; Kamitani et al., 1998). Die Zugabe von Wildtyp PML in PML<sup>-/-</sup> Zellen führte zu einer Rekonstitution der PML-Körperchen (Ishov et al., 1999; Zhong et al., 2000). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe dass SUMO-modifiziertes PML für eine korrekte Bildung der nukleären PML-Körperchen benötigt wird. Interessanterweise gibt es vier weitere Beispiele für die Relevanz der SUMO-Modifikation und nukleären Aggregatbildung. HIPK2, ein Kofaktor von Homeodomänen Transkriptionsfaktoren, lokalisiert nach der SUMO-Modifikation in nukleären Aggregaten (Kim et al., 1999). Der ets-verwandte Repressor der Transkription TEL bildet ähnliche nukleäre Körperchen, wenn dieser sumoyliert wird (Chakrabarti et al., 2000). Das p53-verwandte p73 $\alpha$  Protein relokalisiert von der löslichen zu der unlöslichen nukleären Fraktion nach SUMO-Modifikation (Minty et al., 2000). Als weiteres Beispiel können die Polycomb Aggregate im Kern angeführt werden, die mittlerweile ebenso wie die PML Körperchen als Sumoylierungszentren diskutiert werden (Kagey et al., 2003). In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass der Korepressor N-CoR ebenfalls in nukleären Aggregaten lokalisiert und dass die heterologe Expression von PIAS1 in einer Verminderung dieser Aggregate resultiert. Die PIAS1 vermittelte Sumoylierung von N-CoR könnte daher die Auflösung der Aggregate im Nukleus bewirken (Abb. 3.17, 3.21, 3.23 und 3.24). Die Kotransfektion nicht funktioneller Proteine des SUMO-Konjugationswegs (Ubc9, PIAS1, Pc2) mit N-CoR würde zeigen, ob die Lokalisationsänderung des Korepressors durch SUMO-Modifikation beeinflusst wird. Möglicherweise ist aber auch ein Faktor des SUMO-Konjugationswegs limitierend und durch heterologe Expression der SUMO-E3-Ligase PIAS1 könnten "squelching Effekte" auftreten. Dies würde bedeuten, dass der Korepressor N-CoR zwar mit heterolog exprimiertem PIAS1 interagiert, aber N-CoR nicht vollständig sumoyliert würde und dies in einer abnormalen Verteilung des Proteins in der Zelle resultiert. Die Kotransfektion mehrerer

Faktoren des SUMO-Konjugationswegs würde zeigen, ob verstärkte Sumoylierung des Korepressors zu einer Aggregatbildung führt oder diese verhindert.

#### 4.4 Funktionelle Bedeutung der N-CoR Sumoylierung

Die Repression von N-CoR wurde mit der SUMO-E3-Ligase PIAS1 in einem transienten Luziferasereportersystem untersucht (Abb. 3.18). N-CoR reprimiert in diesem System die Expression der Luziferase ungefähr 90-fach. Als Basis diente der Luziferasewert der Transfektion nur mit Gal-DBD. Durch die Kotransfektion von PIAS1 und N-CoR war eine Verminderung der Repression festzustellen. N-CoR reprimierte mit kotransfiziertem PIAS1 das System nur noch ungefähr 30-fach. Die Repression durch N-CoR war demnach um einen Faktor 2-3 vermindert. Die heterologe Expression einer dominant negativen PIAS1-Form, welche keine SUMO-E3-Ligaseaktivität mehr besitzt, könnte in diesem Reportersystem zeigen, ob die Verminderung der N-CoR Repression durch PIAS1 vermittelte Sumoylierung bedingt wird. Ebenfalls können bei der Transfektion lediglich einer Komponente des SUMO-Konjugationsweges wiederum "squenching Effekte" auftreten. Die Kotransfektion aller Faktoren des SUMO-Konjugationsweges würde eventuell zu einer Verstärkung der Repression des Korepressors N-CoR führen.

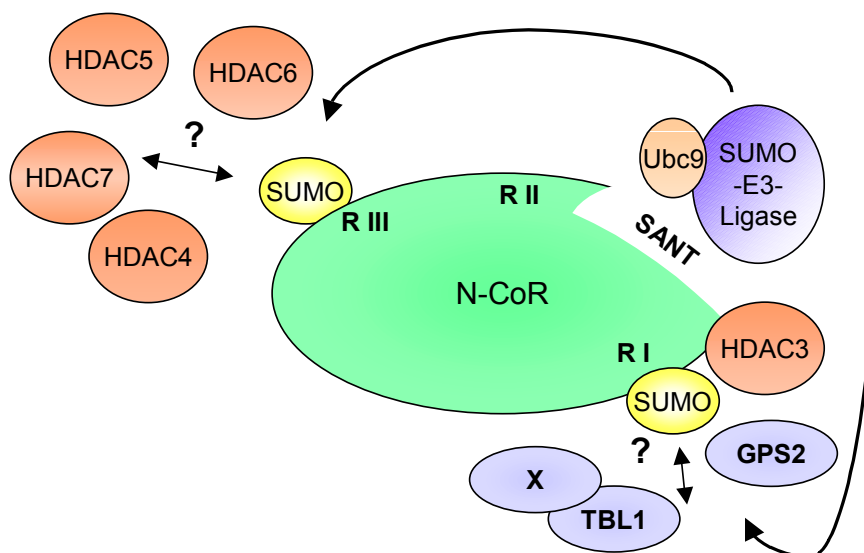
Verschiedene Publikationen konzentrieren sich auf die Regulierung der Transkriptionsaktivität von Aktivatoren durch Sumoylierung. Mutationen in der Sumoylierungsstelle von Aktivatoren verstärken deren transkriptionelle Aktivität (Abdel-Hafiz et al., 2002; Bies et al., 2002; Eloranta und Hurst, 2002; Muller et al., 2000; Nishida und Yasuda, 2002; Poukka et al., 2000; Ross et al., 2002; Sapetschnig et al., 2002). Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass SUMO als negativer Regulator der Transaktivationsdomäne fungiert. Aber auch Ubc9, mit dem SUMO interagiert, könnte verantwortlich für die Verminderung der Aktivität sein (Sampson et al., 2001). Vergleiche negativer regulatorischer Domänen führte zur Identifikation potentieller SUMO-Stellen in diesen Domänen. Die Proteine CBP/p300 und Elk-1 enthalten Motive, die die Transkription reprimieren, wenn diese an die DNA-Bindungsdomäne von Gal4 fusioniert werden. Mutationen des Lysins oder der Glutaminsäure in den SUMO-Konsensussequenzen bewirken den Verlust der Repression dieser Domänen (Snowden et al., 2000; Yang et al., 2002). Aber auch wenn das Gal4-VP16 Protein mit SUMO-Konsensussequenzen der Proteine C/EBP $\epsilon$ , c-Jun (Kim et al., 2002) oder der des Glukokortikoidrezeptors (Iniguez-Lluhi und Pearce, 2000) fusioniert wird, vermindert sich die Aktivität auf unter 10% des ursprünglichen Wertes. Darüber hinaus verstärkt die Fusion zusätzlicher SUMO-Stellen die Inhibition von Gal4-VP16. Sogar die Fusion der unmittelbaren SUMO-Stelle verschiedener Proteine (p300, PML) an Gal4, ist in der Lage die Transkription stark zu reprimieren (Girdwood et al., 2003). Die Inhibition ist zudem proportional zu der Anzahl der SUMO-Stellen in der Sequenz und bei diesen inhibitorischen Domänen handelt es sich um starke und sogar übertragbare Motive.

Diese Daten deuten darauf hin, dass SUMO-Modifikation dieser Domänen die Funktion nicht nur reguliert sondern für die inhibitorische Funktion mitverantwortlich ist (Iniguez-Lluhi und Pearce, 2000; Kim et al., 2002; Yang et al., 2002). Die Tatsache, dass in einem Reportertest eine Gal-SUMO Fusion einen negativen Effekt auf die Transkription hat, zeigt auf, dass SUMO selbst einen negativen Effekt auf die Transkription ausübt (Ross et al., 2002).

Bei den meisten untersuchten Proteinen handelte es sich um Aktivatoren der Transkription, die lediglich synergistische Kontrollmotive besitzen, die die Transkription reprimieren können. Die Funktion der SUMO-Modifikation einer Repressionsdomäne eines starken Repressors, wie für den Korepressor N-CoR, ist noch nicht gezeigt worden. Es könnte sein, dass die Sumoylierung einen direkten Einfluss auf die Repression des Proteins ausübt und für die Funktion der Repressionsdomäne essentiell ist. Im Fall der heterologen Expression von PIAS1 in 293T Zellen muß man beachten, dass neben der posttranslationalen Modifikation des Korepressors auch noch andere Faktoren durch Sumoylierung verändert werden können. Manche HDACs unterliegen ebenfalls einer SUMO-Modifikation (HDAC3, 4 und 6) und diese Proteine haben eine elementare Funktion im N-CoR Repressionskomplex (David et al., 2002; Girdwood et al., 2003; Kirsh et al., 2002). Im Fall der SUMO-modifizierten CRD1 Domäne von p300 konnte gezeigt werden, dass diese *in vitro* mit HDAC6 interagiert. Beispielsweise konnte die durch p300 vermittelte Repression durch Zugabe einer SUMO-spezifischen Protease oder durch die heterologe Expression einer katalytisch inaktiven SUMO-E2-Konjugase (Ubc9) aufgehoben werden (Girdwood et al., 2003). Außerdem wird die durch p300 vermittelte Repression durch Histondeacetylaseinhibitoren oder durch siRNA-bedingtes Herabsetzen der HDAC6 Expression aufgehoben (Girdwood et al., 2003). Es wäre möglich, dass die Interaktion der Klasse II Histondeacetylasen mit dem Korepressor N-CoR über die Modifikation der Repressionsdomäne III mit dem SUMO Protein erfolgt. Dies könnte auch eine Erklärung für den schwierigen Nachweis von Klasse II Histondeacetylasen im N-CoR Komplex sein.

Mit N-CoR Mutanten, die eine Alanin-Substitution des Lysins in verschiedenen potentiellen SUMO-Konsensussequenzen besaßen, wurde der Einfluss auf die Repression des Korepressors untersucht. Die N-CoR $_{\Delta S2, \Delta S6}$  und  $_{\Delta S8}$  Mutanten reprimierten den Luziferase-Reporter im Vergleich zu N-CoR Wildtyp ungefähr noch zu einem Drittel (Abb. 3.25). N-CoR $_{\Delta S3}$  und  $_{\Delta S5}$  zeigten ebenfalls eine Verminderung der Repression, die allerdings nicht so stark ausfiel, wie die der anderen Mutanten. Die Histondeacetylase 3 ist als die wichtigste Histondeacetylase für die Repression von N-CoR in der Literatur beschrieben worden (Guenther et al., 2000; Li et al., 2000; Wen et al., 2000). Die Immunopräzipitation der N-CoR  $\Delta$ SUMO-Konsensussequenz Mutanten und der anschließende Western Blot auf HDAC3 zeigten, dass alle Mutanten im Komplex mit der Histondeacetylase 3 vorlagen. Für N-CoR $_{\Delta S2}$  konnte jedoch keine Aussage getroffen werden, da die Immunopräzipitation kein

Signal für N-CoR ergab (Abb. 3.26). Im Vergleich hierzu zeigten die SANT-Domänen-Deletionen des Korepressors ein unterschiedliches Ergebnis. Die SANT1-Domäne von SMRT/N-CoR mit einer aminoterminal angrenzenden Region wurde von Guenther und Koautoren als Histondeacetylase-Aktivierungsdomäne (DAD, As 395-489) beschrieben und ist auch für die Interaktion der beiden Proteinen essentiell (Guenther et al., 2001). HDAC3 lag daher nicht im Komplex mit N-CoR<sub>ΔSANT1</sub> oder N-CoR<sub>ΔSANT1+2</sub> vor, hingegen war es noch mit N-CoR<sub>ΔSANT2</sub> assoziiert (Abb. 3.26). Diese Daten spiegeln sich auch in einem Luziferasereportertest wieder (Abb. 3.25). Die Deletion der SANT1-Domäne reprimiert die Expression der Luziferase 25fach und die Doppeldeletion SANT1 und SANT2 zeigte eine 30-fache Repression. Das N-CoR<sub>ΔSANT2</sub> Konstrukt reprimierte stärker, ungefähr 40-fach, allerdings war auch hier ein Unterschied in der Repression zu N-CoR<sub>wildtyp</sub> festzustellen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der N-CoR SANT2-Domäne eine Rolle in der Repression zukommt, obwohl sie nicht für die Bindung und Aktivierung von HDAC3 relevant ist und auch keine spezifischen Interaktionspartner im Hefescreen ergab. Die Deletion der SANT2-Domäne könnte andererseits auch die Proteininstabilität oder die Konformation des Korepressors so stark verändert haben, dass dies die Repression des Proteins verminderte. Weitere Untersuchungen müssen die Divergenz der beiden SANT Domänen des Korepressors und die Funktion der SANT2-Domäne klären.



**Abb. 4.1: Mögliche Regulation von N-CoR Interaktionspartnern durch Sumoylierung:**

In den Repressionsdomänen I und III des Korepressors N-CoR sind jeweils vier SUMO-Konsensussequenzen enthalten. Die Interaktion von Klasse II HDACs wurde für die Repressionsdomäne III (RIII) beschrieben. TBL1 und GPS2 interagieren mit Repressionsdomäne I. Möglicherweise wird die Interaktion der Klasse II HDACs oder anderer Proteine durch SUMO-Modifikation des Korepressors reguliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Korepressor N-CoR mit verschiedenen Proteinen des SUMO-Übertragungsweges *in vitro* und *in vivo* interagiert. Die SUMO-E3-Ligase PIAS1 ist spezifisch für die SUMO-Modifikation des N-CoR N-Terminus. Die heterologe Expression von PIAS1 bewirkte sowohl bei endogenem als auch bei exprimiertem N-CoR in 293T Zellen eine Veränderung der Lokalisation im Nukleus. Die für den Korepressor typische Aggregatbildung im Kern löste sich auf und es kam zu einer diffuseren Verteilung und einer Häufung des Proteins in der Nähe der Kernmembran. Die heterologe Expression von PIAS1 verminderte die Repression von N-CoR auf einen Luziferasereporter. Andererseits war die Repression des Proteins durch Alanin-Substitution in potentiellen SUMO-Stellen vermindert. Die N-CoR SUMO-Modifikation wurde indirekt *in vivo* demonstriert. Kollokalisierungsstudien zeigten ferner, dass es durch N-CoR- $\Delta$ SUMO-Konsensussequenz Mutanten zu einer unterschiedlichen Lokalisation zwischen Zytoplasma und Nukleus kommen konnte. Dies traf auch auf die N-CoR  $\Delta$ SANT-Mutanten zu, die im Vergleich zu N-CoR Wildtyp ebenfalls eine unterschiedliche Lokalisation bei heterologer Expression von PIAS1 zeigten.

Ausstehend ist die Charakterisierung der spezifischen SUMO-Stellen des Korepressors N-CoR mit Hilfe von *in vitro* Sumoylierungstests. Ein direkter *in vivo* Nachweis der N-CoR SUMO-Modifikation durch Western Blot könnte nach Optimierung der Pufferbedingungen in einer Immunopräzipitation mit  $\alpha$ N-CoR Antikörper und anschließender Detektion mit  $\alpha$ SUMO Antikörper erfolgen. Heterologe Expression SUMO-spezifischer Proteasen oder einer katalytisch inaktiven SUMO-E2-Konjugase (Ubc9) würde die SUMO-Modifikation des Korepressors verhindern. Solche Experimente würden Aussagen über die funktionelle Bedeutung der SUMO-Modifikation des Korepressors ermöglichen. Proteine der SUMO-Übertragungs-Kaskade (SUMO-E2 oder E3-Enzyme) könnten mit siRNA in ihrer Expression reduziert werden und würden Aussagen über die Änderung der Lokalisation des Korepressors N-CoR in bezug auf seine SUMO-Modifikation liefern. Die Färbung bestimmter Proteine in PML und Pc2 Aggregaten oder des Zentromers würde eine weitere Klassifizierung der N-CoR Aggregate erlauben.

#### **4.5 Potentielle Interaktionspartner der N-CoR SANT-Domäne**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die N-CoR SANT-Domäne eine stark mit anderen Proteinen interagierende Domäne darstellt. In dem Hefescreen wurden verschiedene Proteine gefunden, die im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht näher charakterisiert werden konnten. Hierzu gehörten die Proteine RanBP9, Pc2, TDG, TAF<sub>II</sub>250, CGBP, BTBD1, Hoxa-4 und cDNA I. Für die Hefeinteraktionspartner BTBD1, CGBP und die cDNA I liegen wenige Literaturdaten vor. Andere Proteine erlauben aufgrund publizierter Daten eine hypothetische Deutung möglicher Funktionen im Zusammenhang mit dem Korepressor

N-CoR. Vielversprechend für weitere Untersuchungen ist das Protein Pc2, da es mit dem SUMO-Konjugationsweges im Zusammenhang steht (Kagey et al., 2003). Pc2 könnte, neben PIAS1, als weitere SUMO-E3-Ligase von N-CoR wirken. RanBP9 lokalisiert im Nukleus und in der zytoplasmatischen Region um das Zentromer (Nishitani et al., 2001). Das Protein gehört zur Familie der Ran-bindenden Proteine. Das GTPase-aktivierende Protein RanGAP1, bindet ebenfalls Ran und ist in den nukleo-zytoplasmatischen Transport involviert (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996). RanGAP1 bildet ferner einen stabilen Komplex mit dem nukleären Kernporenprotein RanBP2, welches als SUMO-E3-Ligase für RanGAP1 fungiert. Die Funktion von RanBP9 ist nicht geklärt. Möglicherweise handelt es sich ebenfalls um eine SUMO-E3-Ligase oder ist an einem nukleo-zytoplasmatischen Transport von Proteinen beteiligt. TDG (Thymin DNA Glycosylase) initiiert die Reparatur von G/T und G/U Fehlpaarungen, welche häufig in CpG Inseln vorkommen, durch die Entfernung der Thymin und Uracil Basen (Hardeland et al., 2001). Tini und Koautoren stellten fest, dass die Koaktivatoren CBP und p300 mit TDG assoziiert sind, sowohl bei dem Herausschneiden der Basen während der Reparatur als auch während der Histonacetylierung (Tini et al., 2002). Die Anwesenheit einer Histonacetyltransferase im TDG Reparaturkomplex läßt vermuten, dass eventuell auch HDACs mit TDG assoziiert sein könnten. N-CoR könnte durch die Interaktion mit TDG diese Enzyme an die reparierten DNA-Stellen bringen. TAF<sub>II</sub>250 enthält unter anderem eine HAT- und zwei Kinase-Domänen (Wassarman und Sauer, 2001). Die mögliche Interaktion zwischen N-CoR und TAF<sub>II</sub>250 könnte dazu führen, dass der Korepressor acetyliert oder phosphoryliert wird. Mizzen und Koautoren zeigten, dass die größte Untereinheit von TFIID über Histonacetyltransferaseaktivität *in vitro* verfügt, und spekulierten dass neben Histonen auch noch weitere Proteine als Substrat dienen könnten (Mizzen et al., 1996). Beispielsweise wurde für den Koaktivator p300 gezeigt, dass dieser den Repressor BCL6 acetyliert. Dadurch wird die Assoziation von BCL6 mit HDACs verhindert, welches letztlich zu dem Verlust des Proteins als potenter Repressor führt (Bereshchenko et al., 2002). TAF<sub>II</sub>250 besitzt außerdem Ubiquitin-E1 und E2 Aktivität (UBAC-Aktivität) (Pham und Sauer, 2000). N-CoR könnte ein Ubiquitinierungssubstrat darstellen, denn die SUMO-Modifikation wurde als Gegenspieler der Ubiquitinierung diskutiert (Verger et al., 2003). Hoxa-4 gehört zu den Homeobox Proteinen, die eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung spielen. Die N-CoR knockout Mausstudien haben demonstriert, dass der Korepressor N-CoR essentiell für die Embryogenese ist (Jepsen et al., 2000).

#### **4.6 Die N-CoR SANT Domäne vermittelt Histonbindung**

Rekombinante HDAC3 ist enzymatisch inaktiv, das Protein kann aber durch die Interaktion mit der Histondeacetylase-Aktivierungsdomäne (DAD, As 395-489) von SMRT oder N-CoR enzymatische Aktivität erlangen (Guenther et al., 2001). Die SANT1-Domäne ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Aktivierung der Klasse I HDAC. Für die SANT2-Domäne von

N-CoR/SMRT konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden. Auf dem Gebiet der Histonacetyltransferasen wurde ähnliches für Gcn5 beschrieben. Die Aktivität dieses Enzyms ist in Anwesenheit von ADA2, einem SANT-Domänen Protein, deutlich erhöht. (Boyer et al., 2002). Eine mögliche Hypothese für die Aktivierung der im Komplex enthaltenen Histondeacetylasen durch den Korepressor N-CoR könnte eine Bindung der SANT-Domäne an Histone sein. Einerseits würden HDACs in die Nähe ihres spezifischen Substrates gebracht und andererseits würde der Repressionskomplex durch diese Interaktion stabilisiert. Darüber hinaus ist die Interaktion zwischen HDAC3 und der SANT-Domäne notwendig für die volle enzymatische Aktivität des Enzyms.

Aus Jurkat oder 293T Zellen wurden Histone isoliert (Abb. 3.27). Die isolierten Histonfraktionen enthielten in einer hohen Reinheit die Histone H2A, H2B, H3 und H4. Für den Histondeacetylasetest wurden endogene Histone mit <sup>3</sup>H-Acetat markiert und ebenfalls gereinigt (Abb. 3.27). Pulldown Experimente ergaben, dass die N-CoR SANT1-Domäne spezifisch mit hyperacetylierten Histonen, hauptsächlich mit H3 und zu einem geringeren Teil mit H4 interagiert (Abb. 3.28). Die SANT2-Domäne des Korepressors hingegen interagiert nicht mit Histonen. Eine schwache Interaktion wurde zwischen der SANT-Domäne des ADA2 Proteins und Histon H3 festgestellt. Dieses Protein liegt im chromatinmodifizierenden Komplex mit Gcn5 vor. Die Histonbindung der SANT-Domäne des ADA2 Proteins unterstützt und verstärkt die Acetylierung durch das HAT-Enzym (Boyer et al., 2002). In der Autoradiographie waren lediglich die Histone zu sehen, die durch das <sup>3</sup>H-Acetat markiert und somit hyperacetyliert waren. Für das ADA2 Protein kommen als Substratbindungspartner hypoacetylierte Histone in Frage; daher war keine starke Interaktion der Domäne mit hyperacetylierten Histonen zu sehen. Die SANT-Domäne von MTA2 zeigte eine Interaktion mit dem Histon H3 (Abb. 3.28). MTA2 liegt im Komplex mit NURD und den Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 vor und könnte so, genau wie N-CoR/SMRT die Substratspezifität für die Enzyme bedingen. Die Interaktion zwischen den hyperacetylierten Histonen H3 und H4 und der CBP Bromodomäne, diente als Positivkontrolle des Experiments. Die Bromodomäne war die erste Domäne, der man eine spezifische Interaktion mit kovalent modifizierten Histonen (acetylierte Lysine) zuweisen konnte (Dhalluin et al., 1999; Owen et al., 2000; Winston und Allis, 1999). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die SANT1-Domäne von N-CoR ebenfalls eine Histonbindungsdomäne ist, ähnlich der Bromo- oder Chromodomäne. Das Experiment erlaubte allerdings keine Aussage über die Spezifität für kovalente Modifikationen. Bei den verwendeten Histonen handelte es sich zwar um hyperacetylierte Proteine, allerdings konnte die Bindung der SANT-Domäne auch an eine andere Aminosäure als ein acetyliertes Lysin an H3 und H4 erfolgt sein.



Zur Klärung der Bindungsspezifität der SANT-Domäne, wurden verschieden modifizierte N-terminale Histonpeptide in einem Pulldown-Experiment mit der N-CoR SANT1+2-Domäne verwendet. In der autoradiographischen Darstellung des Experiments zeigte sich eine starke Interaktion der N-CoR SANT1+2-Domäne mit den verwendeten H2A, H2B, H3 oder H4 Peptiden (Abb. 3.29). Im Fall des Histonpeptides H3 wurden ebenfalls Acetylierung (K9), Acetylierung (K9) und Phosphorylierung (S10) oder Dimethylierung (K9) als Modifikationen eingesetzt und auch hier erfolgte eine starke Interaktion mit der Domäne in gleicher Weise. Obwohl die Negativkontrolle in dem Experiment keinerlei Bindung mit der SANT1+2-Domäne von N-CoR zeigte, muss beachtet werden, dass es sich bei den Peptiden um stark positiv geladene Moleküle handelte, die generell eine hohe Affinität zu anderen Proteinen besitzen. Die experimentellen Bedingungen müssen für eine sichere Aussage über eine generelle Histonbindung der SANT1+2-Domäne zu allen getesteten Histonpeptiden noch verfeinert werden.

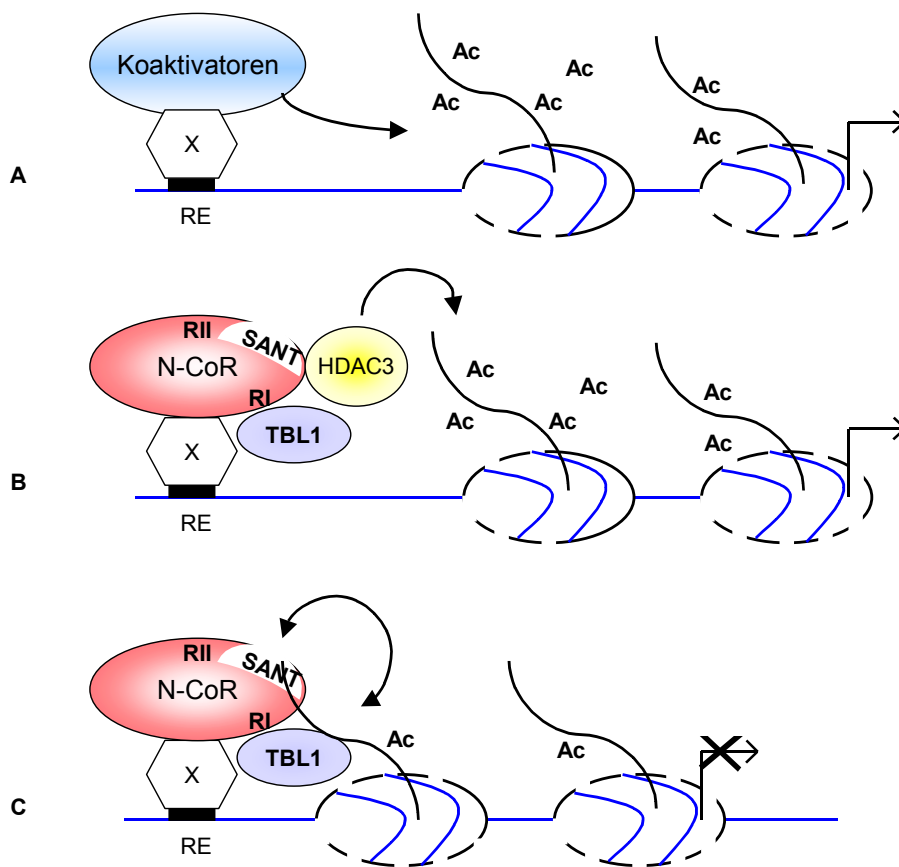
Mit der Biacore-Technologie konnte das Ergebnis der Interaktion zwischen Histonen und der N-CoR SANT1-Domäne bestätigt werden. Drei Histonfraktionen wurden miteinander verglichen: Isolierte Histone aus unbehandelten Zellen, hyperacetylierte und hyperphosphorylierte Histone. In allen drei Läufen kam es bei beiden Flusszellen zu einer Masseveränderung an der Oberfläche des Chips. Durch Subtraktion von Flusszelle Fc1 (negativ Kontrolle) von Fc2 (GST-SANT1) ergab sich die Histonbindung an die GST-SANT Domäne (Abb. 3.33). Die Histone aus unbehandelten 293T Zellen zeigten die stärkste Masseveränderung (150 RU), gefolgt von der hyperacetylierten Histonfraktion (120 RU). Die hyperphosphorylierten Histone zeigten lediglich eine Interaktion von 25 RU mit der GST-SANT1-Domäne. Das Biacore-Experiment bestätigt die Histonbindung der SANT-Domäne. Die Interaktion zu hyperacetylierten und hyperphosphorylierten Histonen ist schwächer als zu unbehandelten Histonfraktionen. Eine Kinetik konnte jedoch unter diesen Versuchsbedingungen nicht erstellt werden. Es konnte in verschiedenen Experimenten deutlich gezeigt werden, dass die SANT1-Domäne des Korepressors N-CoR die Histonbindung vermittelt und dass die SANT-Domäne aufgrund ihrer Häufigkeit in Proteinen sicherlich eine bedeutende Funktion im Kontext der Genregulation hat.

In Luziferasereportertests wurde der Einfluss der Histonbindung auf die Repression von N-CoR untersucht. Wie berichtet, hatten N-CoR  $\Delta$ SANT Mutanten einen Einfluß auf die Repression des Korepressors. N-CoR-SANT1-Mutanten, die Alanin-Substitutionen in der SANT1-Domäne besaßen, wurden ebenfalls mit N-CoR Wildtyp in der Repression verglichen (Abb 3.19 und 3.26). Das N-CoR<sub>N1</sub> (25-fach) und das N-CoR<sub>N3</sub> Konstrukt (20-fach) reprimierten den Luziferasepromoter im Vergleich zu N-CoR<sub>Wildtyp</sub> (90-fach) deutlich schwächer. Das Konstrukt N-CoR<sub>N2</sub> reprimierte ungefähr 60-fach und zeigte daher keine signifikante Verminderung in der Repression zu N-CoR Wildtyp. Eine Immunpräzipitation

der verschiedenen Mutanten im Vergleich zu Wildtyp Gal-N-CoR<sub>Flag-Epitop</sub> oder N-CoR<sub>Flag-Epitop</sub> zeigte die Assoziation oder das Fehlen der HDAC3 im N-CoR Komplex. Lediglich die N-CoR<sub>N2</sub> Mutante interagiert mit der Histonedeaetylase 3. Die Konstrukte N-CoR<sub>N1</sub> und N-CoR<sub>N3</sub> waren nicht mit HDAC3 assoziiert. Allerdings waren diese Konstrukte möglicherweise anfällig für eine erhöhte Proteindegradation, da sie im Western Blot mit einem geringeren Molekulargewicht (20-40 kDa) als das N-CoR<sub>N2</sub> Konstrukt liefen. Die Proteinbanden beider Konstrukte waren dennoch deutlich über 250 kDa und somit könnte es sich auch um das Fehlen einer posttranslationalen Modifikation handeln. Die eingeschränkte Repression von N-CoR<sub>N1</sub> und N-CoR<sub>N2</sub>, aber auch der N-CoR<sub>ΔSANT1</sub> und N-CoR<sub>ΔSANT1+2</sub> Mutanten, ist auf das Fehlen der Histonedeaetylase 3 zurückzuführen (Abb 3.25 und 3.26).

In der Hefe existieren zwar keine orthologen Proteine von SMRT und N-CoR; ein Vergleich mit Heferepressoren ist dennoch interessant. Die Korepressoren N-CoR/SMRT interagieren beispielsweise mit dem WD40 Wiederholungs-Protein TBL1, welches dem Tup1 und Groucho Protein funktionell ähnelt (Gromoller und Lehming, 2000; Guenther et al., 2000). Der Hefe Korepressor Komplex Tup1-Ssn6 reprimiert beispielsweise Gene, die die Hefepaarung und den Glucose-Metabolismus kontrollieren und die auf anaeroben Stress oder DNA-Schädigung ansprechen (Edmondson et al., 1998; Flores-Saib und Courey, 2000). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass dieser Komplex mit mindestens drei verschiedenen Histonedeaetylase interagiert (Watson et al., 2000; Wolffe und Hayes, 1999). Zudem bindet die Repressionsdomäne von Tup1 bevorzugt hypoacetylierte Histone H3 und H4 *in vitro* (Edmondson et al., 1996) und *in vivo* konnte Tup1 ebenfalls an Genbereichen mit hypoacetylierten Histonen gefunden werden (Bone und Roth, 2001). Davie und Koautoren konnten anhand von ChIP-Analysen zeigen, dass der Repressor Tup1, die Interaktion mit Histonen für eine stabile Interaktion an reprimierten Promotoren benötigt (Davie et al., 2002). Das Tup1-Ssn6 Repressionsmodell geht von einer Interaktion zwischen dem Komplex und den Histonen H3 und H4 aus. Nach der Deacetylierung der Histone durch spezifische im Komplex assoziierte Histonedeaetylase erfolgt die Bindung von Tup1 an hypoacetyliertes H3 und H4 Histone. Dies führt zu einer Chromatinmodulation und möglicherweise wird Histoneacetyltransferase der Zugriff zu den Histonen in dieser Weise verwehrt.

Ähnlich den molekularen Wechselwirkungen des Tup1-Ssn6 Komplexes in der Hefe, könnte über TBL1 die Bindung des N-CoR-Komplexes an Histone erfolgen (Abb. 4.2). Yoon und Koautoren konnten zeigen, dass TBL1/TBLR1 *in vivo* mit den Histone H2B und H4 interagiert und dass die Repression der Proteine mit der Histoneinteraktion korreliert (Yoon et al., 2003). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützen dieses Modell, denn die SANT-Domäne in N-CoR wäre einerseits für die Aktivierung der



**Abb. 4.2 Modell der N-CoR-HDAC3 vermittelten Repression.**

Ein Gen wird über einen DNA-bindenden Faktor (X), der an einer DNA-Erkennungsstelle (response element, RE) bindet, reguliert. Über die Assoziation von Koaktivatoren oder Korepressoren erfolgt die Regulation der Transkription des Gens. **(A)** In Anwesenheit des Koaktivator-Komplexes sind die Histone N-Termini acetyliert und die Transkription des Zielgenes erfolgt. **(B)** In Abwesenheit spezifischer Liganden erfolgt die Dissoziation des Koaktivator-Komplexes und der N-CoR-HDAC3 Korepressionskomplex bindet den DNA-bindenden Faktor (X). Die Anwesenheit der HDAC3 und anderer HDACs führt zur Deacetylierung der Histone. **(C)** Die Interaktion von TBL1 mit Histone H4 und H2B und der SANT1-Domäne des Korepressors mit Histone N-Termini könnte den Repressionskomplex stabilisieren oder eine Acetylierung der Histone verhindern.

Histondeacetylase 3 essentiell und andererseits könnte sie selbst über die Bindung von Histonen die Repression verstärken, indem sie den Komplex in räumlicher Nähe zu den Histonen hält (Abb. 4.2). Diese Parallele zwischen N-CoR-TBL1 und dem Tup1-Ssn6 Komplex, deutet auf eine konservierte Interaktion zwischen regulatorischen Proteinen, Histonen und histonmodifizierenden Proteinen, als einen fundamentalen und konservierten Mechanismus der Genexpression hin. Yu und Koautoren (Yu et al., 2003) konnten mittlerweile zeigen, dass die SMRT SANT2-Domäne eine Histoninteraktionsdomäne (HID) darstellt. Die Repression des SMRT-HDAC3 Komplexes erhöht sich durch diese Bindung, aufgrund einer gesteigerten Affinität der HDAC zu ihrem Histonsubstrat. Die Histoninteraktionsdomäne interagiert bevorzugt mit unacetylierten Histone N-Termini und inhibierte Histonacetyltransferaseaktivität. In dieser Arbeit konnte in unterschiedlichen

Experimenten gezeigt werden, dass die SANT1-Domäne von N-CoR für die Histonbindung verantwortlich ist. Die homologen Korepressoren N-CoR und SMRT unterscheiden sich daher deutlich in ihren Histonbindungsdomänen, welches ein Hinweis auf eine unterschiedliche Spezifität in bezug zur Repression der Proteine darstellen könnte. Dieser Frage könnte man mit Chromatin-Immunopräzipitationen an unterschiedlichen Promotoren überprüfen. Über die Anwesenheit von HDACs im Repressionskomplex nach der Deacetylierung der Histone könnten ebenfalls ChIP-Experimente Aufschluss geben. Mit dieser Methode könnte ein Promotor zu unterschiedlichen Zeiten (Repression/Aktivierung) auf die Anwesenheit verschiedener Faktoren und Acetylierungsformen des Histones untersucht werden.

#### **4.7 Die SANT-Domäne als HDAC-Aktivierungsdomäne**

Die Immunopräzipitation der einzelnen Histondeacetylasen aus Extrakten von endogenen oder transient transfizierten Proteinen und die anschließende Messung ihrer Aktivität, sind in der Regel der einzige Weg, Deacetylaseaktivität festzustellen. (Fischle et al., 2002; Hassig et al., 1998; Kadosh und Struhl, 1998; Taunton et al., 1996). Die biochemische Fraktionierung von Säugerzellextrakten zeigte, dass verschiedene andere Faktoren neben HDAC1 und HDAC2 notwendig sind, um eine volle enzymatische Aktivität dieser Histondeacetylasen zu bekommen. Das Fehlen essentieller Proteine im Komplex könnte daher erklären, warum rekombinante Histondeacetylasen keine oder nur eine sehr geringe Enzymaktivität besitzen (Zhang et al. 1999). Die HDAC-Domänen von HDAC4 und HDAC5 besitzen als isolierte Polypeptide ebenfalls keine intrinsische enzymatische Aktivität, erlangen aber HDAC Aktivität im Kontext des SMRT/N-CoR-HDAC3 Komplexes (Fischle et al., 2002). Allerdings konnten Fischle und Mitarbeiter nicht klar zwischen der Aktivität der Klasse II HDACs und der Aktivität der HDAC3 unterscheiden. Für rekombinante HDAC3 konnte gezeigt werden, dass die Bindung an N-CoR/SMRT in der Aktivierung des Enzyms resultiert (Guenther et al., 2001) und dass eine solche Aktivierung nicht für HDAC4, 5 und 7 zutrifft (Fischle et al., 2002). Allerdings schlossen die Autoren nicht vollständig aus, dass Klasse II HDACs im Kontext von N-CoR und SMRT Enzymaktivität erlangen können. Möglicherweise fehlt für das Verständnis ein zusätzlicher Faktor oder eine posttranslationale Modifikation von HDAC4 oder SMRT/N-CoR (Fischle et al., 2002). Dies könnte beispielsweise die SUMO-Modifikation der Repressionsdomäne III sein, die so eine Interaktion mit Klasse II HDACs ermöglichen könnte (Abschnitt 4.4). Das GPS2 (G-protein pathway suppressor 2) ist mit dem N-CoR-HDAC3 Komplex assoziiert (Zhang et al., 2002). Dieser Komplex enthält ferner TBL1 und hat ein Molekulargewicht von 2 MDa. Immunopräzipitate von Flag-HDAC3 aus 293T Zellen besitzen nur eine geringe HDAC-Aktivität. Die Kotransfektion von N-CoR (As 1-1445) und HDAC3-Flag lässt die heterolog exprimierte HDAC3 jedoch Enzymaktivität erlangen (Zhang et al., 2002). Die Autoren konnten die minimale Interaktionsstelle für HDAC3 auf 69 As in dem Repressor eingrenzen (As 420-488).

In Anlehnung an die native Situation der HDAC3 Aktivierung, in der die Histoninteraktionsdomäne (HID) N-terminal von der SANT1-Domäne lokalisiert, wurden die HIDs aus Sin3 (HDAC1 und HDAC2) und N-CoR (HDAC4, 5 und 7) ebenfalls N-terminal zu der SANT1, SANT2 oder den SANT1+2-Domänen kloniert (Abb. 3.34). Ein Pulldown Experiment zeigte die spezifische Interaktion zwischen der DAD+SANT1-Domäne aus N-CoR und HDAC3 (Abb. 3.35). HDACs 1 und 2 interagieren im Pulldown Experiment sowohl mit der minimalen HID als auch mit der PAH3 HID aus Sin3A. Die Interaktion von HDAC2 mit Sin3A HID war jedoch deutlich stärker als die Interaktion von HDAC1 mit dieser Domäne. Die Klasse II Histondeacetylase HDAC4 interagiert ebenfalls mit der beschriebenen HID in N-CoR. Die Klonierung einer SANT-Domäne oder beider SANT-Domänen N-terminal vor eine HID sowohl für N-CoR wie für Sin3A, beeinflusste die Interaktion der HDACs nicht. Die Konstrukte eigneten sich daher für die Untersuchung der enzymatischen Aktivierung der Klasse I und II HDACs. Die Aktivierung rekombinanter HDAC3 durch die N-CoR DAD SANT1-Domäne oder die N-CoR DAD SANT1+2 Domäne konnte in einem Histondeacetylasetest bestätigt werden (Abb. 3.36). Histondeacetylasetests mit Chimärenproteinen und den Histondeacetylase 2 und 4 ergaben keine Aktivierung (Daten nicht gezeigt). Die rekombinanten HDACs besaßen keine Aktivität und wurden auch nicht durch Inkubation der Chimärenproteine aktiviert. Guenther und Koautoren berichteten, dass HDAC3 erst durch Vorinkubation mit einem Chaperon-Komplex (TRiC) mit SMRT interagieren kann (Guenther et al., 2002). Dieser TRiC Komplex ist notwendig für eine korrekte Proteinfaltung in einem ATP-abhängigen Prozeß. SMRT ersetzt durch die Interaktion mit HDAC3 den TRiC Komplex, welches zur Aktivierung des Enzyms führt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die N-CoR SANT1-Domäne im Kontext der Histoncodehypothese zu sehen ist. In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die N-CoR SANT1-Domäne mit Histonen interagiert, hauptsächlich mit Histon H3 und H4. Diese Interaktion könnte den Repressionskomplex stabilisieren oder die Acetylierung der Histone durch HATs verhindern. Biacore-Experimente und Pulldown-Experimente deuten auf eine Interaktion unmodifizierter Histone mit der N-CoR SANT1-Domäne hin. Erstmals konnte demnach gezeigt werden, dass die N-CoR SANT1-Domäne eine elementare Rolle in der Repression und in der Proteininteraktion des Korepressorkomplexes spielt.

In der Transkription gibt es eine große Anzahl regulatorischer Proteine, die mit Chromatin interagieren und es modulieren. Die Spezifität dieser Faktoren ist unter anderem auf ihre selektive Bindung von Histonen und Nukleosomen zurückzuführen. Die Frage, wie diese chromatinmodifizierenden Proteine spezifisch ihr Substrat erkennen, ist ebenfalls elementar für die Klärung des Kontextes von Chromatin in Krebszellen und wird letztendlich eine Grundlage für die Entwicklung spezifischer Substanzen zur Bekämpfung einzelner Stadien

dieser Krankheit darstellen. Die vollständige Entschlüsselung des Histon-Kodes wird sicherlich eine wichtige Forschungsarbeit der nächsten Jahre darstellen.

## 5 Literatur

- Aasland, R., Stewart, A.F. and Gibson, T. (1996) The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem Sci*, 21, 87-8.
- Abdel-Hafiz, H., Takimoto, G.S., Tung, L. and Horwitz, K.B. (2002) The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J Biol Chem*, 277, 33950-6.
- Alkema, M.J., Jacobs, J., Voncken, J.W., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Satijn, D.P., Otte, A.P., Berns, A. and van Lohuizen, M. (1997) MPC2, a new murine homolog of the Drosophila polycomb protein is a member of the mouse polycomb transcriptional repressor complex. *J Mol Biol*, 273, 993-1003.
- Aranda, A. and Pascual, A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, 81, 1269-304.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 10148-52.
- Asahara, H., Dutta, S., Kao, H.Y., Evans, R.M. and Montminy, M. (1999) Pbx-Hox heterodimers recruit coactivator-corepressor complexes in an isoform-specific manner. *Mol Cell Biol*, 19, 8219-25.
- Asano, K., Phan, L., Valasek, L., Schoenfeld, L.W., Shalev, A., Clayton, J., Nielsen, K., Donahue, T.F. and Hinnebusch, A.G. (2001) A multifactor complex of eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and tRNA(i)Met promotes initiation complex assembly and couples GTP hydrolysis to AUG recognition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 66, 403-15.
- Bailey, P., Downes, M., Lau, P., Harris, J., Chen, S.L., Hamamori, Y., Sartorelli, V. and Muscat, G.E. (1999) The nuclear receptor corepressor N-CoR regulates differentiation: N-CoR directly interacts with MyoD. *Mol Endocrinol*, 13, 1155-68.
- Baniahmad, A., Kohne, A.C. and Renkawitz, R. (1992) A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *Embo J*, 11, 1015-23.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410, 120-4.
- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*, 14, 920-4.
- Bassi, M.T., Ramesar, R.S., Caciotti, B., Winship, I.M., De Grandi, A., Riboni, M., Townes, P.L., Beighton, P., Ballabio, A. and Borsani, G. (1999) X-linked late-onset sensorineural deafness caused by a deletion involving OAI and a novel gene containing WD-40 repeats. *Am J Hum Genet*, 64, 1604-16.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R. and Becker, J. (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol*, 280, 275-86.
- Becker, P.B. and Horz, W. (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem*, 71, 247-73.
- Bereshchenko, O.R., Gu, W. and Dalla-Favera, R. (2002) Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet*, 32, 606-13.

- Bies, J., Markus, J. and Wolff, L. (2002) Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J Biol Chem*, 277, 8999-9009.
- Bone, J.R. and Roth, S.Y. (2001) Recruitment of the yeast Tup1p-Ssn6p repressor is associated with localized decreases in histone acetylation. *J Biol Chem*, 276, 1808-13.
- Bonifacino, J.S. and Weissman, A.M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 19-57.
- Boutell, J.M., Thomas, P., Neal, J.W., Weston, V.J., Duce, J., Harper, P.S. and Jones, A.L. (1999) Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin. *Hum Mol Genet*, 8, 1647-55.
- Boyer, L.A., Langer, M.R., Crowley, K.A., Tan, S., Denu, J.M. and Peterson, C.L. (2002) Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol Cell*, 10, 935-42.
- Brown, C.E., Lechner, T., Howe, L. and Workman, J.L. (2000) The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci*, 25, 15-9.
- Busch, K., Martin, B., Baniahmad, A., Martial, J.A., Renkawitz, R. and Muller, M. (2000) Silencing subdomains of v-ErbA interact cooperatively with corepressors: involvement of helices 5/6. *Mol Endocrinol*, 14, 201-11.
- Carim-Todd, L., Sumoy, L., Andreu, N., Estivill, X. and Escarceller, M. (2001) Identification and characterization of BTBD1, a novel BTB domain containing gene on human chromosome 15q24. *Gene*, 262, 275-81.
- Carlone, D.L., Hart, S.R., Ladd, P.D. and Skalnik, D.G. (2002) Cloning and characterization of the gene encoding the mouse homologue of CpG binding protein. *Gene*, 295, 71-7.
- Chakrabarti, S.R. and Nucifora, G. (1999) The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun*, 264, 871-7.
- Chakrabarti, S.R., Sood, R., Nandi, S. and Nucifora, G. (2000) Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13281-5.
- Chen, J.D. and Evans, R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 377, 454-7.
- Cheung, P., Allis, C.D. and Sassone-Corsi, P. (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, 103, 263-71.
- Ciana, P., Braliou, G.G., Demay, F.G., von Lindern, M., Baretino, D., Beug, H. and Stunnenberg, H.G. (1998) Leukemic transformation by the v-ErbA oncoprotein entails constitutive binding to and repression of an erythroid enhancer in vivo. *Embo J*, 17, 7382-94.
- Cohen, R.N., Brzostek, S., Kim, B., Chorev, M., Wondisford, F.E. and Hollenberg, A.N. (2001) The specificity of interactions between nuclear hormone receptors and corepressors is mediated by distinct amino acid sequences within the interacting domains. *Mol Endocrinol*, 15, 1049-61.
- Collingwood, T.N., Urnov, F.D. and Wolffe, A.P. (1999) Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol*, 23, 255-75.
- Collins, T., Stone, J.R. and Williams, A.J. (2001) All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. *Mol Cell Biol*, 21, 3609-15.



- Crawford, P.A., Dorn, C., Sadovsky, Y. and Milbrandt, J. (1998) Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol*, 18, 2949-56.
- Damm, K., Thompson, C.C. and Evans, R.M. (1989) Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature*, 339, 593-7.
- David, G., Neptune, M.A. and DePinho, R.A. (2002) SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *J Biol Chem*, 277, 23658-63.
- Davie, J.K., Trumbly, R.J. and Dent, S.Y. (2002) Histone-dependent association of Tup1-Ssn6 with repressed genes in vivo. *Mol Cell Biol*, 22, 693-703.
- Davis, P.J., Shih, A., Lin, H.Y., Martino, L.J. and Davis, F.B. (2000) Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem*, 275, 38032-9.
- Deckert, J. and Struhl, K. (2001) Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol Cell Biol*, 21, 2726-2735.
- Deroo, B.J. and Archer, T.K. (2001) Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo. *Oncogene*, 20, 3039-46.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S. and Hay, R.T. (1998) SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell*, 2, 233-9.
- Deutsch, H.F. (1991) Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Adv Cancer Res*, 56, 253-312.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399, 491-6.
- Dhordain, P., Lin, R.J., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J.P., Evans, R.M. and Albagli, O. (1998) The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res*, 26, 4645-51.
- Dixson, J.D., Forstner, M.J. and Garcia, D.M. (2003) The alpha-Actinin Gene Family: A Revised Classification. *J Mol Evol*, 56, 1-10.
- Dong, X., Tsuda, L., Zavitz, K.H., Lin, M., Li, S., Carthew, R.W. and Zipursky, S.L. (1999) ebi regulates epidermal growth factor receptor signaling pathways in Drosophila. *Genes Dev*, 13, 954-65.
- Dowell, P., Ishmael, J.E., Avram, D., Peterson, V.J., Nevriy, D.J. and Leid, M. (1999) Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *J Biol Chem*, 274, 15901-7.
- Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de The, H., Hay, R.T. and Freemont, P.S. (1999) SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci*, 112, 381-93.
- Edmondson, D.G., Smith, M.M. and Roth, S.Y. (1996) Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev*, 10, 1247-59.
- Edmondson, D.G., Zhang, W., Watson, A., Xu, W., Bone, J.R., Yu, Y., Stillman, D. and Roth, S.Y. (1998) In vivo functions of histone acetylation/deacetylation in Tup1p repression and Gcn5p activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 63, 459-68.
- Eloranta, J.J. and Hurst, H.C. (2002) Transcription factor AP-2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is sumolated in vivo. *J Biol Chem*, 277, 30798-804.

- Feng, X., Jiang, Y., Meltzer, P. and Yen, P.M. (2001) Transgenic targeting of a dominant negative corepressor to liver blocks basal repression by thyroid hormone receptor and increases cell proliferation. *J Biol Chem*, 276, 15066-72.
- Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M.J., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Voelter, W. and Verdin, E. (2002) Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol Cell*, 9, 45-57.
- Flores-Saib, R.D. and Courey, A.J. (2000) Analysis of Groucho-histone interactions suggests mechanistic similarities between Groucho- and Tup1-mediated repression. *Nucleic Acids Res*, 28, 4189-96.
- Gambacorta, M., Flenghi, L., Fagioli, M., Pileri, S., Leoncini, L., Bigerna, B., Pacini, R., Tanci, L.N., Pasqualucci, L., Ascani, S., Mencarelli, A., Liso, A., Pelicci, P.G. and Falini, B. (1996) Heterogeneous nuclear expression of the promyelocytic leukemia (PML) protein in normal and neoplastic human tissues. *American Journal of Pathology*, 149, 2023-35.
- Gelmetti, V., Zhang, J., Fanelli, M., Minucci, S., Pelicci, P.G. and Lazar, M.A. (1998) Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol Cell Biol*, 18, 7185-91.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D. and Hay, R.T. (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell*, 11, 1043-54.
- Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, 14, 121-41.
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23, 175-82.
- Goodson, M.L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Park-Sarge, O.K. and Sarge, K.D. (2001) Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem*, 276, 18513-8.
- Gottschling, D.E. (2000) Gene silencing: two faces of SIR2. *Curr Biol*, 10, R708-11.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- Gray, S.G. and Ekstrom, T.J. (2001) The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res*, 262, 75-83.
- Greenhalgh, C.J. and Hilton, D.J. (2001) Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol*, 70, 348-56.
- Gromoller, A. and Lehming, N. (2000) Srb7p is a physical and physiological target of Tup1p. *Embo J*, 19, 6845-52.
- Grunstein, M. (1990) Histone function in transcription. *Annu Rev Cell Biol*, 6, 643-78.
- Guenther, M.G., Barak, O. and Lazar, M.A. (2001) The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol*, 21, 6091-101.
- Guenther, M.G., Lane, W.S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M.A. and Shiekhattar, R. (2000) A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev*, 14, 1048-57.
- Guenther, M.G., Yu, J., Kao, G.D., Yen, T.J. and Lazar, M.A. (2002) Assembly of the SMRT-histone deacetylase 3 repression complex requires the TCP-1 ring complex. *Genes Dev*, 16, 3130-5.

- Guschin, D., Wade, P.A., Kikyo, N. and Wolffe, A.P. (2000) ATP-Dependent histone octamer mobilization and histone deacetylation mediated by the Mi-2 chromatin remodeling complex. *Biochemistry*, 39, 5238-45.
- Hardeland, U., Bentele, M., Lettieri, T., Steinacher, R., Jiricny, J. and Schar, P. (2001) Thymine DNA glycosylase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 68, 235-53.
- Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J. and Schar, P. (2002) Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *Embo J*, 21, 1456-64.
- Hassig, C.A., Tong, J.K., Fleischer, T.C., Owa, T., Grable, P.G., Ayer, D.E. and Schreiber, S.L. (1998) A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3519-24.
- Hauet, T., Liu, J., Li, H., Gazouli, M., Culty, M. and Papadopoulos, V. (2002) PBR, StAR, and PKA: partners in cholesterol transport in steroidogenic cells. *Endocr Res*, 28, 395-401.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387, 733-6.
- Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*, 387, 43-8.
- Hermanson, O., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2002) Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab*, 13, 55-60.
- Hildebrand, D., Tiefenbach, J., Heinzel, T., Grez, M. and Maurer, A.B. (2001) Multiple regions of eto cooperate in transcriptional repression. *J Biol Chem*, 276, 9889-95.
- Hill, D.A. (2001) Influence of linker histone H1 on chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol*, 79, 317-24.
- Hochstrasser, M. (2000) Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol*, 2, E153-7.
- Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419, 135-41.
- Hong, S.H., David, G., Wong, C.W., Dejean, A. and Privalsky, M.L. (1997) SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9028-33.
- Hong, S.H. and Privalsky, M.L. (2000) The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export. *Mol Cell Biol*, 20, 6612-25.
- Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Mayhew, C.N., Goodson, M.L., Park-Sarge, O.K., Sarge, K.D. and Goodson, M. (2001) Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem*, 276, 40263-7.
- Hörlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K. and et al. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377, 397-404.
- Horn, P.J. and Peterson, C.L. (2002) Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science*, 297, 1824-7.

- Hsiao, P.W., Deroo, B.J. and Archer, T.K. (2002) Chromatin remodeling and tissue-selective responses of nuclear hormone receptors. *Biochem Cell Biol*, 80, 343-51.
- Hu, G., Chung, Y.L., Glover, T., Valentine, V., Look, A.T. and Fearon, E.R. (1997) Characterization of human homologs of the *Drosophila* seven in absentia (*sina*) gene. *Genomics*, 46, 103-111.
- Hu, X. and Lazar, M.A. (1999) The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*, 402, 93-6.
- Hu, X., Li, Y. and Lazar, M.A. (2001) Determinants of CoRNR-dependent repression complex assembly on nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol*, 21, 1747-58.
- Huang, E.Y., Zhang, J., Miska, E.A., Guenther, M.G., Kouzarides, T. and Lazar, M.A. (2000) Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway. *Genes Dev*, 14, 45-54.
- Hughes, C.L. and Kaufman, T.C. (2002) Hox genes and the evolution of the arthropod body plan. *Evol Dev*, 4, 459-99.
- Humphrey, G.W., Wang, Y., Russanova, V.R., Hirai, T., Qin, J., Nakatani, Y. and Howard, B.H. (2001) Stable histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. *J Biol Chem*, 276, 6817-24.
- Huynh, K.D. and Bardwell, V.J. (1998) The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT. *Oncogene*, 17, 2473-84.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M. and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403, 795-800.
- Iniguez-Lluhi, J.A. and Pearce, D. (2000) A common motif within the negative regulatory regions of multiple factors inhibits their transcriptional synergy. *Mol Cell Biol*, 20, 6040-50.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., 3rd and Maul, G.G. (1999) PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol*, 147, 221-34.
- Iso, T., Sartorelli, V., Poizat, C., Iezzi, S., Wu, H.Y., Chung, G., Kedes, L. and Hamamori, Y. (2001) HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling. *Mol Cell Biol*, 21, 6080-9.
- Jackson, T.A., Richer, J.K., Bain, D.L., Takimoto, G.S., Tung, L. and Horwitz, K.B. (1997) The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol*, 11, 693-705.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S. and Tjian, R. (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science*, 288, 1422-5.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144, 1425-36.
- Jang, M.K., Goo, Y.H., Sohn, Y.C., Kim, Y.S., Lee, S.K., Kang, H., Cheong, J. and Lee, J.W. (2001) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV stimulates nuclear factor-kappa B transactivation via phosphorylation of the p65 subunit. *J Biol Chem*, 276, 20005-10.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-80.
- Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T.M., Gleiberman, A.S., Lunyak, V., McEville, R.J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E., Hedrick, S.M., Mandel, G., Glass, C.K., Rose, D.W. and Rosenfeld, M.G. (2000) Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell*, 102, 753-63.

- Johnson, E.S. and Gupta, A.A. (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, 106, 735-44.
- Jones, P.L., Sachs, L.M., Rouse, N., Wade, P.A. and Shi, Y.B. (2001) Multiple n-cor complexes contain distinct histone deacetylases. *J Biol Chem*, 276, 8807-11.
- Kadosh, D. and Struhl, K. (1998) Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo. *Genes Dev*, 12, 797-805.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A. and Wotton, D. (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell*, 113, 127-37.
- Kahyo, T., Nishida, T. and Yasuda, H. (2001) Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell*, 8, 713-8.
- Kakizawa, T., Miyamoto, T., Ichikawa, K., Takeda, T., Suzuki, S., Mori, J., Kumagai, M., Yamashita, K. and Hashizume, K. (2001) Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors interacts with octamer transcription factor-1 and acts as a transcriptional repressor. *J Biol Chem*, 276, 9720-5.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T. and Yeh, E.T. (1998) Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem*, 273, 26675-82.
- Kao, H.Y., Downes, M., Ordentlich, P. and Evans, R.M. (2000) Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev*, 14, 55-66.
- Kao, H.Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C.R., Evans, R.M. and Kadesch, T. (1998) A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev*, 12, 2269-77.
- Khochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C. and Seigneurin-Berny, D. (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev*, 11, 162-166.
- Kim, J., Cantwell, C.A., Johnson, P.F., Pfarr, C.M. and Williams, S.C. (2002) Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J Biol Chem*, 277, 38037-44.
- Kim, Y.H., Choi, C.Y. and Kim, Y. (1999) Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 12350-5.
- Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F. and Dejean, A. (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J*, 21, 2682-91.
- Kopp, P., Kitajima, K. and Jameson, J.L. (1996) Syndrome of resistance to thyroid hormone: insights into thyroid hormone action. *Proc Soc Exp Biol Med*, 211, 49-61.
- Kuo, M.H., vom Baur, E., Struhl, K. and Allis, C.D. (2000) Gen4 activator targets Gen5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription. *Mol Cell*, 6, 1309-20.
- Lammer, D., Mathias, N., Laplaza, J.M., Jiang, W., Liu, Y., Callis, J., Goebel, M. and Estelle, M. (1998) Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev*, 12, 914-26.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S.T., Heller, R.C., Stebbins, J., Pillus, L. and Sternglanz, R. (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5807-11.

- Lavinsky, R.M., Jepsen, K., Heinzel, T., Torchia, J., Mullen, T.M., Schiff, R., Del-Rio, A.L., Ricote, M., Ngo, S., Gemsch, J., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. and Rose, D.W. (1998) Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2920-5.
- Lee, J.H. and Skalnik, D.G. (2002) CpG-binding protein is a nuclear matrix- and euchromatin-associated protein localized to nuclear speckles containing human trithorax. Identification of nuclear matrix targeting signals. *J Biol Chem*, 277, 42259-67.
- Lee, S.K., Kim, J.H., Lee, Y.C., Cheong, J. and Lee, J.W. (2000) Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor. *J Biol Chem*, 275, 12470-4.
- Li, H., Leo, C., Schroen, D.J. and Chen, J.D. (1997a) Characterization of receptor interaction and transcriptional repression by the corepressor SMRT. *Mol Endocrinol*, 11, 2025-37.
- Li, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J.M., Qin, J. and Wong, J. (2000) Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *Embo J*, 19, 4342-50.
- Li, S., Li, Y., Carthew, R.W. and Lai, Z.C. (1997b) Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack. *Cell*, 90, 469-78.
- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K. and Jentsch, S. (1998) A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *Embo J*, 17, 2208-14.
- Lin, R.J., Egan, D.A. and Evans, R.M. (1999) Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Trends Genet*, 15, 179-84.
- Lin, X., Sun, B., Liang, M., Liang, Y.Y., Gast, A., Hildebrand, J., Brunicardi, F.C., Melchior, F. and Feng, X.H. (2003) Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell*, 11, 1389-96.
- Liu, J., Cavalli, L.R., Haddad, B.R. and Papadopoulos, V. (2003) Molecular cloning, genomic organization, chromosomal mapping and subcellular localization of mouse PAP7: a PBR and PKA-R1alpha associated protein. *Gene*, 308, 1-10.
- Lufkin, T. (1997) Transcriptional regulation of vertebrate Hox genes during embryogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 7, 195-213.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251-60.
- Luger, K. and Richmond, T.J. (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 140-6.
- Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S. and Zhou, Q. (1999) The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev*, 13, 2196-206.
- Lutterbach, B., Westendorf, J.J., Linggi, B., Patten, A., Moniwa, M., Davie, J.R., Huynh, K.D., Bardwell, V.J., Lavinsky, R.M., Rosenfeld, M.G., Glass, C., Seto, E. and Hiebert, S.W. (1998) ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. *Mol Cell Biol*, 18, 7176-84.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, 88, 97-107.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. and Blobel, G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 135, 1457-70.

- Matunis, M.J., Wu, J. and Blobel, G. (1998) SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 140, 499-509.
- Maurer, A.B., Wichmann, C., Gross, A., Kunkel, H., Heinzl, T., Ruthardt, M., Groner, B. and Grez, M. (2002) The Stat5-RARalpha fusion protein represses transcription and differentiation through interaction with a corepressor complex. *Blood*, 99, 2647-52.
- McInerney, E.M., Rose, D.W., Flynn, S.E., Westin, S., Mullen, T.M., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R.T., Assa-Munt, N., Milburn, M.V., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1998) Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev*, 12, 3357-68.
- Melchior, F. (2000) SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 591-626.
- Mills, M., Yang, N., Weinberger, R., Vander Woude, D.L., Beggs, A.H., Eastal, S. and North, K. (2001) Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum Mol Genet*, 10, 1335-46.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M. and Caput, D. (2000) Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem*, 275, 36316-23.
- Missero, C., Pirro, M.T., Simeone, S., Pischetola, M. and Di Lauro, R. (2001) The DNA glycosylase T:G mismatch-specific thymine DNA glycosylase represses thyroid transcription factor-1-activated transcription. *J Biol Chem*, 276, 33569-75.
- Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., Nakatani, Y. and Allis, C.D. (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*, 87, 1261-70.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. and Heldin, C.H. (2001) Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci*, 114, 4359-69.
- Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y. and Dejean, A. (2000) c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem*, 275, 13321-9.
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 202-10.
- Muller, S., Matunis, M.J. and Dejean, A. (1998) Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J*, 17, 61-70.
- Munoz, A., Zenke, M., Gehring, U., Sap, J., Beug, H. and Vennstrom, B. (1988) Characterization of the hormone-binding domain of the chicken c-erbA/thyroid hormone receptor protein. *Embo J*, 7, 155-9.
- Nagy, L., Kao, H.Y., Love, J.D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J.T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R.M. and Schwabe, J.W. (1999) Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev*, 13, 3209-16.
- Nakajima, H., Brindle, P.K., Handa, M. and Ihle, J.N. (2001) Functional interaction of STAT5 and nuclear receptor co-repressor SMRT: implications in negative regulation of STAT5-dependent transcription. *Embo J*, 20, 6836-44.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y. and Kingston, R.E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, 108, 475-87.
- Nishida, T. and Yasuda, H. (2002) PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem*, 277, 41311-7.

- Nishitani, H., Hirose, E., Uchimura, Y., Nakamura, M., Umeda, M., Nishii, K., Mori, N. and Nishimoto, T. (2001) Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene*, 272, 25-33.
- Nomura, T., Khan, M.M., Kaul, S.C., Dong, H.D., Wadhwa, R., Colmenares, C., Kohno, I. and Ishii, S. (1999) Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes Dev*, 13, 412-23.
- Ordentlich, P., Downes, M., Xie, W., Genin, A., Spinner, N.B. and Evans, R.M. (1999) Unique forms of human and mouse nuclear receptor corepressor SMRT. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2639-44.
- Orphanides, G. and Reinberg, D. (2000) RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature*, 407, 471-5.
- O'Shea, J.J., Gadina, M. and Schreiber, R.D. (2002) Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*, 109, S121-31.
- Owen, D.J., Ornaghi, P., Yang, J.C., Lowe, N., Evans, P.R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P. and Travers, A.A. (2000) The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *Embo J*, 19, 6141-9.
- Park, E.J., Schroen, D.J., Yang, M., Li, H., Li, L. and Chen, J.D. (1999) SMRTe, a silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors-extended isoform that is more related to the nuclear receptor corepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 3519-24.
- Perissi, V., Staszewski, L.M., McInerney, E.M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D.W., Lambert, M.H., Milburn, M.V., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1999) Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev*, 13, 3198-208.
- Pham, A.D. and Sauer, F. (2000) Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science*, 289, 2357-60.
- Pichler, A. and Melchior, F. (2002) Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic*, 3, 381-7.
- Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O.A. and Palvimo, J.J. (2000) Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14145-50.
- Rao, M.A., Cheng, H., Quayle, A.N., Nishitani, H., Nelson, C.C. and Rennie, P.S. (2002) RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, 277, 48020-7.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P. and Hay, R.T. (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J*, 18, 6455-61.
- Ross, S., Best, J.L., Zon, L.I. and Gill, G. (2002) SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell*, 10, 831-42.
- Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B.M. and Grunstein, M. (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14503-8.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. and Grosschedl, R. (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev*, 15, 3088-103.
- Safer, J.D., Cohen, R.N., Hollenberg, A.N. and Wondisford, F.E. (1998) Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *J Biol Chem*, 273, 30175-82.



- Saitoh, H. and Hinchev, J. (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem*, 275, 6252-8.
- Sampson, D.A., Wang, M. and Matunis, M.J. (2001) The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem*, 276, 21664-9.
- Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H. and Vennstrom, B. (1986) The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*, 324, 635-40.
- Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F. and Suske, G. (2002) Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo J*, 21, 5206-15.
- Schmidt, D. and Muller, S. (2002) Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2872-7.
- Schneider, S.L., Fuqua, S.A., Speeg, K.V., Tandon, A.K. and McGuire, W.L. (1990) Isolation and characterization of an adriamycin-resistant breast tumor cell line. *In Vitro Cell Dev Biol*, 26, 621-8.
- Schulz, M., Eggert, M., Baniahmad, A., Dostert, A., Heinzl, T. and Renkawitz, R. (2002) RU486-induced glucocorticoid receptor agonism is controlled by the receptor N terminus and by corepressor binding. *J Biol Chem*, 277, 26238-43.
- Seeler, J.S. and Dejean, A. (2001) SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene*, 20, 7243-9.
- Seo, S., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W.S. and Chakravarti, D. (2001) Regulation of Histone Acetylation and Transcription by INHAT, a Human Cellular Complex Containing the Set Oncoprotein. *Cell*, 104, 119-130.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A. and Brown, M. (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*, 103, 843-52.
- Shanmugam, K., Green, N.C., Rambaldi, I., Saragovi, H.U. and Featherstone, M.S. (1999) PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Mol Cell Biol*, 19, 7577-88.
- Shi, Y., Downes, M., Xie, W., Kao, H.Y., Ordentlich, P., Tsai, C.C., Hon, M. and Evans, R.M. (2001) Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes Dev*, 15, 1140-51.
- Shibata, H., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W. and Tsai, M.J. (1997) Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT). *Mol Endocrinol*, 11, 714-24.
- Smith, C.L., Nawaz, Z. and O'Malley, B.W. (1997) Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol*, 11, 657-66.
- Smith, J.S., Brachmann, C.B., Celic, I., Kenna, M.A., Muhammad, S., Starai, V.J., Avalos, J.L., Escalante-Semerena, J.C., Grubmeyer, C., Wolberger, C. and Boeke, J.D. (2000) A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6658-63.
- Snowden, A.W., Anderson, L.A., Webster, G.A. and Perkins, N.D. (2000) A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol Cell Biol*, 20, 2676-86.

- Sohda, M., Misumi, Y., Yamamoto, A., Yano, A., Nakamura, N. and Ikehara, Y. (2001) Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin. *J Biol Chem*, 276, 45298-306.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 51, 1409-16.
- Sterner, D.E., Wang, X., Bloom, M.H., Simon, G.M. and Berger, S.L. (2002) The SANT domain of Ada2 is required for normal acetylation of histones by the yeast SAGA complex. *J Biol Chem*, 277, 8178-86.
- Sternsdorf, T., Jensen, K. and Will, H. (1997) Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol*, 139, 1621-34.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41-5.
- Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q. and Luo, K. (1999) Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science*, 286, 771-4.
- Struhl, K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*, 12, 599-606.
- Tang, A.H., Neufeld, T.P., Kwan, E. and Rubin, G.M. (1997) PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell*, 90, 459-67.
- Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H. and Hay, R.T. (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem*, 276, 35368-74.
- Taunton, J., Hassig, C.A. and Schreiber, S.L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, 272, 408-11.
- Thiagalingam, S., Cheng, K.H., Lee, H.J., Mineva, N., Thiagalingam, A. and Ponte, J.F. (2003) Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci*, 983, 84-100.
- Tini, M., Benecke, A., Um, S.J., Torchia, J., Evans, R.M. and Chambon, P. (2002) Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. *Mol Cell*, 9, 265-77.
- Tong, J.K., Hassig, C.A., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E. and Schreiber, S.L. (1998) Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature*, 395, 917-21.
- Tsai, C.C., Kao, H.Y., Yao, T.P., McKeown, M. and Evans, R.M. (1999) SMRTER, a Drosophila nuclear receptor coregulator, reveals that EcR-mediated repression is critical for development. *Mol Cell*, 4, 175-86.
- Turner, B.M. (1993) Decoding the nucleosome. *Cell*, 75, 5-8.
- Um, S., Harbers, M., Benecke, A., Pierrat, B., Losson, R. and Chambon, P. (1998) Retinoic acid receptors interact physically and functionally with the T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J Biol Chem*, 273, 20728-36.
- Underhill, C., Qutob, M.S., Yee, S.P. and Torchia, J. (2000) A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J Biol Chem*, 275, 40463-70.
- Verger, A., Perdomo, J. and Crossley, M. (2003) Modification with SUMO. *EMBO Rep*, 4, 137-42.
- Vidal, M. and Gaber, R.F. (1991) RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 11, 6317-27.

- Wang, D., Li, Z., Messing, E.M. and Wu, G. (2002) Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem*, 277, 36216-22.
- Wang, J., Hoshino, T., Redner, R.L., Kajigaya, S. and Liu, J.M. (1998) ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10860-5.
- Wang, L. and Hiebert, S.W. (2001) TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene*, 20, 3716-25.
- Wassarman, D.A. and Sauer, F. (2001) TAF(II)250: a transcription toolbox. *J Cell Sci*, 114, 2895-902.
- Watson, A.D., Edmondson, D.G., Bone, J.R., Mukai, Y., Yu, Y., Du, W., Stillman, D.J. and Roth, S.Y. (2000) Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev*, 14, 2737-44.
- Wen, Y.D., Perissi, V., Staszewski, L.M., Yang, W.M., Krones, A., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. and Seto, E. (2000) The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7202-7.
- Winston, F. and Allis, C.D. (1999) The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat Struct Biol*, 6, 601-4.
- Wolffe, A.P. and Hayes, J.J. (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res*, 27, 711-20.
- Wong, C.W. and Privalsky, M.L. (1998) Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J Biol Chem*, 273, 27695-702.
- Wu, X., Li, H., Park, E.J. and Chen, J.D. (2001) SMRTE inhibits MEF2C transcriptional activation by targeting HDAC4 and 5 to nuclear domains. *J Biol Chem*, 276, 24177-85.
- Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1996) The extreme C terminus of progesterone receptor contains a transcriptional repressor domain that functions through a putative corepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 12195-9.
- Xu, L., Lavinsky, R.M., Dasen, J.S., Flynn, S.E., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Heinzl, T., Szeto, D., Korzus, E., Kurokawa, R., Aggarwal, A.K., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1998) Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature*, 395, 301-6.
- Xu, L., Yang, L., Hashimoto, K., Anderson, M., Kohlhagen, G., Pommier, Y. and D'Arpa, P. (2002) Characterization of BTBD1 and BTBD2, two similar BTB-domain-containing Kelch-like proteins that interact with Topoisomerase I. *BMC Genomics*, 3, 1.
- Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Cote, J. and Wang, W. (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell*, 2, 851-61.
- Yang, S.H., Bumpass, D.C., Perkins, N.D. and Sharrocks, A.D. (2002) The ETS domain transcription factor Elk-1 contains a novel class of repression domain. *Mol Cell Biol*, 22, 5036-46.
- Yoh, S.M., Chatterjee, V.K. and Privalsky, M.L. (1997) Thyroid hormone resistance syndrome manifests as an aberrant interaction between mutant T3 receptors and transcriptional corepressors. *Mol Endocrinol*, 11, 470-80.
- Yoon, H.G., Chan, D.W., Huang, Z.Q., Li, J., Fondell, J.D., Qin, J. and Wong, J. (2003) Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *Embo J*, 22, 1336-46.

- You, A., Tong, J.K., Grozinger, C.M. and Schreiber, S.L. (2001) CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1454-1458.
- Yu, J., Li, Y., Ishizuka, T., Guenther, M.G. and Lazar, M.A. (2003) A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *Embo J*, 22, 3403-3410.
- Zamir, I., Harding, H.P., Atkins, G.B., Horlein, A., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. and Lazar, M.A. (1996) A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. *Mol Cell Biol*, 16, 5458-65.
- Zhang, J., Guenther, M.G., Carthew, R.W. and Lazar, M.A. (1998a) Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev*, 12, 1775-80.
- Zhang, J., Kalkum, M., Chait, B.T. and Roeder, R.G. (2002) The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol Cell*, 9, 611-23.
- Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Reinberg, D. (1997) Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell*, 89, 357-64.
- Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.P., Lane, W.S. and Reinberg, D. (1998b) The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*, 95, 279-89.
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. and Reinberg, D. (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*, 13, 1924-35.
- Zhang, Y., Sun, Z.W., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hampsey, M. and Reinberg, D. (1998c) SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. *Mol Cell*, 1, 1021-31.
- Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A. and Pandolfi, P.P. (2000) Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood*, 95, 2748-52.
- Zhou, S. and Hayward, S.D. (2001) Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex. *Mol Cell Biol*, 21, 6222-32.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

APL	acute promyelocytic leukemia
As	Aminosäure
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenin Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine)
CBP	CREB-binding protein
ChIP	Chromatinimmunopräzipitations
Chromodomäne	chromatin organisation modifier
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CGBP	CpG-binding protein
CRD-Domäne	Core repressor domain
CtBP Protein	C-terminal binding protein
DAD	Deacetylaseaktivierungsdomäne
DMEM	Dublecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOBA	Dropout Medium
DOBA-LTA	Dropout ohne Leucin, Tryptophan, Adenin
DOBA-LTH	Dropout ohne Leucin, Tryptophan, Histidin
DOBA-HALT	Dropout ohne Histidin, Leucin, Tryptophan, Adenin
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Erk	extracellular signal-regulated kinase
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GR	Glukokortikoidrezeptor
GST	Glutathion-S-transferase
h	Stunde

---

HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HMT	Histonmethyltransferase
HRP	horse raddish peroxidase
Ig	Immunglobulin
INHAT	inhibitor of acetyltransferases
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio-D-galactosid
kDa	Kilodalton
m	mouse
M	Molar
mM	Millimolar
Map	Mitogen-aktivierten Protein
N-CoR	nuclear receptor co-repressor
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimide
NR	nukleäre Hormonrezeptoren
NURD	nucleosome remodeling und histone deacetylation
OD <sub>(260)</sub>	Optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge
p	Plasmid
PBS	Phosphate buffered Saline
Pc2	Chromobox-homolog 4
PCR	Polymerase chain reaction
PIAS	protein inhibitor of activated STAT
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PEG	Polyethylenglycol
PLZF	promyelocytic leukemia zinc finger protein
RAR	Retinsäurerezeptor
RE	response element
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute
R	Repressionsdomäne
RT	Raumtemperatur
SANT-Domäne	SWI2, ADA2, N-CoR und TFIIB-Domäne

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecylsulfate)
SDS-Gel	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMRT	silencing mediator of retinoic and thyroid hormone receptors
STAT	Signal transducers and activators of transcription
SUMO	Small ubiquitin-related modifier
T <sub>4</sub>	Thyroxin
TAF <sub>II</sub> 250	TBP assoziierter Faktor 250
TBL1	transducin (beta)-like Protein
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TDG	Thymin DNA Glycosylase
T <sub>3</sub> R	Thyroidhormonrezeptor
TSA	Trichostatin A
Ubc9	Ubiquitin-conjugating enzyme
v/v	Volumen/ Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen

Daten aus dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Hildebrand, D., **Tiefenbach, J.**, Heinzl, T., Grez, M., and Maurer, A. B.: **Multiple Regions of ETO Cooperate in Transcriptional Repression.** The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 13, pp. 9889 – 9895, 2001.

Krämer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski, M., **Tiefenbach, J.**, Peters, M.A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T. and Gottlicher, M. (2003) **The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2.** *Embo J*, **22**, 3411-20.

Kongreßbeiträge:

**Tiefenbach, J.**, Hildebrand, D., Heinzl, T., Grez, M., and Maurer, A. B.: **A Core Repressor Domain in AML1/ETO Interacts with Sin3A and is Required for Transcriptional Repression.** 26.08.-30.08.2000; 4th EMBL Transcription Meeting Heidelberg; Thema: Transcription.

**Tiefenbach, J.**, Ducasse, M., and Heinzl, T.: **Identification and Functional Characterization of Interaction Partners of the Nuclear Receptor Corepressor N-CoR.** 10.12-12.12.2001 UK Molecular Biology and Cancer Network; Meeting Warwick; Thema: Genes and Cancer.

**Tiefenbach, J.**, Ducasse, M., and Heinzl, T.: **Identification and Functional Characterization of Interaction Partners of the Nuclear Receptor Corepressor N-CoR.** 24.08.-28.08.2002; 5th EMBL Transcription Meeting Heidelberg ; Thema: Transcription V

**Tiefenbach, J.**, Novac, N., Krämer, O., and Heinzl, T.: **The SANT-Domain of the Nuclear Receptor Corepressor N-CoR Mediates Histone Binding and Enhances HDAC Function.** 10.03-16.03.2003, Keystone Symposia. Thema: The Enzymology of Chromatin and Transcription.



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut, Georg-Speyer-Haus, in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Thorsten Heinzl angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Renkawitz für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit. Meinem Betreuer am Georg-Speyer-Haus Herrn Dr. Thorsten Heinzl danke ich für die sehr gute Kooperation, die vielen wertvollen fachlichen Anregungen und die allseits optimistische und motivierende Einstellung in allen Situationen.

Frau Dr. Frauke Melchior danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre Diskussionsbereitschaft und die Überlassung zahlreicher Proteine und Plasmide.

Frau Dr. Natasha Novac und Maresa Eck danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit im SUMO-Projekt. Gerne denke ich auch an die Zeit des Hefe-Zwei-Hybrid Screens zurück und danke Miryam Ducasse und Wiebke Baum für ihre Unterstützung.

Für die gute Ausstattung und die freundliche Atmosphäre am Institut möchte ich mich bei Herrn Prof. Bernd Groner bedanken. Ich danke allen Mitgliedern der AG Dr. Heinzl für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt am Main, den.....

.....

Jens Tiefenbach