## INAUGURAL-DISSERTATION

zur

## Erlangung der Doktorwürde

der

## Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

# Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Thorsten Belz aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2003

# Untersuchungen zur Assoziation des transkriptionellen Repressors Snail aus *Drosophila melanogaster* mit den Korepressoren CtBP und HDAC1

Gutachter: PD Dr. Frank Sauer Prof. Dr. Dr. h. c. Konrad Beyreuther für Julia

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frank für die Bereitstellung des Themas, einen Platz in seinem Labor und die langjährige freundschaftliche Zusammenarbeit.

Bei meinen liebgewonnenen Kollegen, Christian Beisel, Jochen Bogin, Simona Kwoczynski, Sandra Müller und Anh-Dung Pham bedanke ich mich für tatkräftige Unterstützung.

Bei meinen Freunden bedanke ich mich für "all die ganzen Jahre".

Versuchte ich zum Ausdruck zu bringen, was meine Eltern zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, würde ich den Rahmen einer Danksagung sprengen. Desahlb auch hier ein einfaches Danke!

Nicht unerwähnt bleiben soll mein Dank gegenüber M. Levine für die Bereitstellung des *anti*-CtBP Antikörpers, B. Turner für die Bereitstellung der *anti*-HDAC1 und *anti*-HDAC3 Antikörper und J. T. Kadonaga für den HDAC1-Baculovirus.

1. EINLEITUNG	1
1.1. Chromatin in der Transkriptionsregulation	2
1.2. Der ´core Promotor´ und die GTM	4
1.3. 'Enhancer/Silencer' und Transkriptionsfaktoren	5
1.4. Kofaktoren	9
1.4.1. Koaktivatoren	9
1.4.2. Korepressoren	10
1.5. Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen	12
1.5.1. Histon-Acetyltransferasen und deren Komplexe	12
1.5.2. Histon-Deacetylasen und deren Komplexe	13
1.6. Drosophila melanogaster als Modellsystem	18
1.6.1. Der transkriptionelle Repressor Snail	19
2. ERGEBNISSE	22
2.1. Expression rekombinanter Proteine	22
2.1.1. E. coli Expressionssystem	23
2.1.1.1. Snail-GST Fusionsprotein	23
2.1.2. Baculovirus Expressionssystem	25
2.1.2.1. FLAG-Epitop markierte Proteine	25
2.1.2.1.1. FLAG-Snail	26
2.1.2.1.2. FLAG-CtBP	27
2.1.2.2. HDAC1-His/C	29
2.1.2.2.1. Intrinsische Histon-Deacetylase-Aktivität von HDAC1-His/C	30
2.2. Gewinnung eines Snail-spezifischen Antikörpers	32
2.2.1. Snail-Antigen, His-Snail-1/253	32
2.2.2. Reinigung des anti-Snail Antikörpers aus Kaninchen-Serum	34
2.3. Untersuchungen zur Interaktion von Snail und CtBP	36
2.4. Identifikation einer Snail-assoziierten HDAC-Aktivität	38
2.4.1. CtBP als Snail-assoziierte Histon-Deacetylase?	39
2.4.2. Snail assoziiert mit HDAC1	40
2.4.2.1. Kopräzipitation von rek. HDAC1 mit rek. Snail	40

2.4.2.2. Kopräziptiation von endogenem HDAC1 mit rek. Snail	42
2.4.2.3. Immunopräzipitation eines nativen Snail-HDAC1 Komplexes	43
2.5. Die Interaktion zwischen Drosophila HDAC1 und CtBP	45
2.6. HDAC-Aktivitätsrekrutierung durch Snail kontra CtBP	46
3. DISKUSSION	48
3.1. Rekombinante Proteine	49
3.2. Die Interaktion zwischen Snail und CtBP	51
3.3. Die Interaktion zwischen Snail und HDAC1	52
3.4. Regulierte Snail / CtBP Interaktion	54
3.5. Snail-CtBP versus Snail-HDAC1	57
3.6. Der Korepressor CtBP und seine Beziehung zu HDAC1	60
3.7. Modelle der Snail-vermittelten transkript. Repression	62
3.7.1. Klassische Modelle	62
3.7.2. Alternatives Modell	64
3.8. Perspektiven	65
4. MATERIAL UND METHODEN	67
4.1. Analyse von DNA	67
4.1.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	67
4.1.2. Agarosegelelektrophorese von DNA	67
4.1.3. Automatische Sequenzierung von DNA	68
4.2. Isolierung und Reinigung von DNA	68
4.2.1. Ethanol-Präzipitation	68
4.2.2. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	68
4.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli	69
4.2.3.1. Schnellmethode zur Reinigung von Plasmid-DNA (Miniprep)	69
4.2.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßtsab (Maxiprep)	69
4.3. Modifikation und Rekombination von DNA	70
4.3.1. Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	70

4.3.2. Dephosphorylierung der 5´ Enden linearisierter Vektoren	71
4.3.3. Ligation von DNA-Fragmenten	71
4.3.4. Polymerase Kettenreaktion	72
4.3.5. Expressionskonstrukte	72
4.3.5.1. Bakterielle Expressionskonstrukte	72
4.3.5.1.1. pET-23a(+)/GST-snail	73
4.3.5.1.2. pET19b-snail-1/253	73
4.3.5.2. Baculovirus Expressionskonstrukte	74
4.3.5.2.1. pVL1392-FLAG-snail (vorher pSVL-FLAG-snail)	74
4.3.5.2.2. pVL1392-FLAG-CtBP	74
4.3.5.2.3. HDAC1-His/C	75
4.4. DNA-Transfer in <i>E. coli</i> Bakterien	75
4.4.1. Herstellung kompetenter E. coli Bakterien	75
4.4.2. Transformation kompetenter E. coli Bakterien	76
4.5. Protein-Analytik	76
4.5.1. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	76
4.5.2. Zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	77
4.5.3. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	78
4.5.4. Färbung von SDS-Gelen mit "kolloidalem" Coomassie	79
4.5.5. Western-Blot Analyse	79
4.5.5.1. ECL-Plus Immunodetektion	80
4.5.5.2. Alkalische Phosphatase Immunodetektion	80
4.5.6. Identifikation von Proteinen durch Massenspektroskopie	81
4.6. Expression und Reinigung von Proteinen	81
4.6.1. Proteinexpression in und Proteinreinigung aus E. coli	81
4.6.1.1. Snail-GST/C	81
4.6.1.2. His-Snail-1/253	82
4.6.2. Proteinexpression in und Proteinreinigung aus Sf9-Zellen	83
4.6.2.1. Primär-Transfektion	83
4.6.2.2. Amplifikation des rekombinanten Viruses	84
4.6.2.3. Reamplifikation des rekombinanten Viruses	84
4.6.2.4. Expression rekombinanter Proteine in Sf9-Zellen	84
4.6.2.4.1. Monolayer-Kultur	85
4.6.2.4.2. "Schüttelkultur"	85
4.6.2.5. Aufschluss von Sf9-Zellen und Reinigung der in Sf9-Zellen exprimierten Proteine	86
4.6.2.5.1. FLAG-Snail und FLAG-CtBP	86
4.6.2.5.2. HDAC1-His/C	87

4.7. Protein/Protein Interaktionsstudien	87
4.7.1. Kopräzipitation von rek. HDAC1 mit rek. Snail	88
4.7.2. Kopräzipitation von endogenen Faktoren aus Kernextrakt	88
4.7.3. Immunopräzipitation eines nativen Snail-Komplexes	89
4.8. Histon-Deacetylase-Assay	90
4.8.1. Snail- bzw. CtBP assoziierte HDAC-Aktivität	90
4.8.2. Intrinsische HDAC-Aktivität von rek. CtBP und HDAC1	91
4.9. Herstellung von Drosophila Kernextrakt	91
4.9.1. Zubereitung von Apfelsaft-Agarplatten	91
4.9.2. Sammeln und Dechorionisieren von Drosophila Embryonen	91
4.9.3. Kernextrakt Präparation	92
4.10. Herstellung eines Snail-spezifischen Antikörpers	93
4.10.1. Immunisierung von Kaninchen	93
4.10.2. Reinigung des Snail-spezifischen Antikörpers	94
4.10.2.1. Kopplung von His-Snail 1/253 an 'SulfoLink Coupling Gel'	94
4.10.2.2. Anreicherung des Snail-spezifischen Antikörpers	94
4.11. Material	95
4.11.1. Laborausstattung	95
4.11.2. Verbrauchsmaterial	97
4.11.3. Chemikalien und Enzyme	97
4.11.3.1. Chemikalien	97
4.11.3.2. Enzyme	97
5. ABKÜRZUNGEN	98
6. LITERATUR	101
7. ZUSAMMENFASSUNG	113

# 1. Einleitung

Der Aufbau höherer eukaryotischer Organismen ist unglaublich komplex. Der menschliche Körper besteht aus weit mehr als 10<sup>13</sup> Zellen, die alle exakt die gleiche genetische Information beinhalten (Müller, 1995). Das sich trotzdem verschiedene Zelltypen, aus denen letztendlich verschiedene Gewebe wie Herz, Leber, Lunge, usw. bestehen, ausbilden können, verdanken wir einem Geniestreich der Natur, der differenziellen Genexpression. Die räumlich und zeitlich präzise Regulation der Genexpression bildet die Grundlage der Zelldifferenzierung.

Eukaryotische Zellen sind in der Lage, eine große Anzahl verschiedener Proteine zu synthetisieren. Proteine sind Makromoleküle, deren kleinste Struktureinheit die Aminosäuren sind. Die Reihenfolge der Aminosäuren im Protein, die Primärstruktur, bestimmt die physikalischen Wechselwirkungen der Aminosäuren untereinander und damit die dreidimensionale Struktur eines Proteins. Erst seine spezifische Struktur verleiht einem Protein funktionale Eigenschaften und macht es zu einem essentiellen Baustein des Lebens. Proteine katalysieren als Enzyme chemische Reaktionen, als Strukturproteine vermitteln sie Form und Gestalt, als Membranproteine sind sie für den Transport von Substanzen verantwortlich und ermöglichen so z. B. Informationsaustausch zwischen Zellen (Darnell et al., 1994). Die Komposition der Proteine einer Zelle bestimmt ihre Funktion und Identität. Der "Bauplan", d. h. die Primärstruktur der Proteine, ist in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Zellkern jeder Zelle gespeichert (Lewin, 1997). Die kleinste vollständige Informationseinheit der DNA ist das Gen, das einen DNA-Abschnitt repräsentiert, der für die Primärsequenz eines Proteins codiert. Zusätzlich enthält ein Gen Informationen zur zeitlichen und räumlichen Synthese eines Proteins. Die Gesamtheit der Gene nennt man das Genom. Das Genom der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae codiert für etwa 6.100 Gene, das von Drosophila melanogaster für etwa 13.600 Gene und das des Menschen für etwa 24.000-40.000 Gene (Lewin, 1997, Adams et al., 2000, Venter et al., 2001). Ein Multienzymkomplex, die DNA-abhängige RNA-Polymerase II (RNA-Pol. II), synthetisiert in einem als Transkription bezeichneten Vorgang eine Matrize des Gens, die "Boten (messenger) -Ribonukleinsäure" (mRNA). Die Information der mRNA wird in dem nachfolgenden Prozess der Translation, durch Mulitproteinkomplexe, den Ribosomen, in ein

Protein übersetzt. Die Kombination der Vorgänge der Transkription und der Translation werden auch als Genexpression bezeichnet (Towle *et al.*, 1976, Merrick, 1992).

Da jede Zelle die Information besitzt, jedes Protein zu exprimieren, die Zelle jedoch nur einen bestimmten Satz an Proteinen benötigt, um funktional und lebensfähig zu sein, muss der Vorgang der Genexpression als Antwort auf extra- oder intrazelluläre Signale oder in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums der Zelle reguliert sein. Während des Prozesses der Genexpression gibt es viele Zwischenschritte, die reguliert werden können, z. B. Transkriptionselongation oder Termination, mRNA Reifung, mRNA Transport, mRNA Translation, mRNA Stabilität u. a. (Ogbourne & Antalis, 1998). Hauptsächlich dürfte Transkription aber wohl auf der Ebene des Chromatins und der Initiation reguliert werden (Grunstein, 1990a und b).

# 1.1. Chromatin in der Transkriptionsregulation

Vergleicht man den Durchmesser eines typischen eukaryotischen Zellkerns von etwa 60 Mikrometern (µm) mit der Länge der DNA des "entfalteten" menschlichen Genoms von über zwei Metern, so wird schnell klar, in welch umfassendem Maße die DNA im Zellkern kondensiert sein muss (Alberts et al., 1997). Um chromosomale DNA zu kondensieren, "verpacken" Zellen die DNA mit Proteinen zu Chromatin. Als "Verpackungsmaterial" dienen hauptsächlich Histone. Histone sind eine phylogenetisch hochkonservierte Familie eukaryotischer Kernproteine, die sich aus den nukleosomalen Histonen H2A, H2B, H3 und H4 und dem 'Linker'-Histon H1 zusammensetzt (Grunstein, 1990b). Die nukleosomalen Histone bestehen aus je drei Domänen, einer globulären Domäne, verantwortlich für Histon-Histon- und Histon-DNA Kontakte und je einer Amino- (NH<sub>2</sub>, Histontail) und Carboxy-(COOH) terminalen Domäne (Horn & Peterson, 2002). Die nukleosomalen Histone sind für die Kondensation der DNA in Nukleosomen, der kleinsten Chromatinstruktur, verantwortlich. Jedes Nukleosom setzt sich aus acht nukleosomalen Histonen zusammen, zwei H2A-H2B Dimeren und einem H3-H4 Tetramer. Jedes Oktamer ist mit 146 Bp DNA assoziiert, die in 1,65 Windungen um das Oktamer gewickelt sind (Luger et al., 1997). Die auf der DNA aufgereihten Nukleosomen bilden eine perlenkettenartige Struktur von etwa 10 nm Durchmesser (Thomas, 1984). Wechselwirkungen der Histontails mit benachbarten Nukleosomen führen wahrscheinlich zur Bildung einer höheren Organisationsstufe, der 30 nm

Fibrille. Die Bindung von H1 an die Nukleosomen stabilisiert sowohl die intramolekulare Faltung als auch Interaktionen zwischen den 30 nm Fibrillen (Horn & Peterson, 2002). Höher geordnete Strukturen wie 100-300 nm Chromonema-Fibrillen wurden beobachtet, die genaue Organisation von Chromatin *in vivo* bleibt aber weiterhin ein Rätsel. Beobachtungen an lebenden Zellen zeigten jedoch, dass transkriptionell aktive Abschnitte bis hinunter zur 30 nm Fibrille oder 100 nm Chromonema-Fibrille dekondensiert wurden (Horn & Peterson, 2002). Somit scheint der Kondesationsgrad der DNA entscheidenden Einfluss auf die transkriptionelle Regulation zu haben und sollte daher Regulationsmechanismen unterliegen.

Hinweise auf einen daran beteiligten Mechanismus ergaben sich anhand von Beobachtungen die zeigten, dass Histone in transkriptionell aktiven Genabschnitten hyperacetyliert, in inaktiven Abschnitten dagegen hypoacetyliert sind (Hebbes et al., 1988, Braunstein et al., 1993). Die NH<sub>2</sub>-terminalen Domänen der nukleosomalen Histone enthalten hochkonservierte Lysinreste, die von nukleären Histon-Acetyltransferasen (HATs) bzw. Histon-Deacetylasen (HDACs) reversibel modifiziert werden (Kuo & Allis, 1998). Dabei wird ein Acetylrest von Acetyl-Koenzym A auf die  $\varepsilon$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> Gruppe eines Lysins übertragen, wodurch die positive Nettoladung der  $\varepsilon$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> Gruppe neutralisiert wird. Der umgekehrte Prozess der Deacetylierung entfernt die Acetylgruppe und regeneriert die positive Nettoladung des Lysinrestes (Kuo & Allis, 1998). Die Acetylierung eines Lysinrestes kann mehrere funktionale Konsequenzen haben. Neutralisierung der positiven Ladung könnte z. B. die Interaktion der NH2-terminalen Domänen der Histone mit DNA schwächen und/oder internukleosomale Interaktionen inhibieren. Dadurch wird vermutlich die Chromatinstruktur destabilisiert und ermöglicht somit, dass Transkriptionsfaktoren und/oder die generelle RNA-Pol. II Transktiptionsmaschinerie (GTM) an Zielgene binden und deren Expression aktivieren können (Kuo & Allis, 1998). Eine Deacetylierung der Lysinreste führt zur Entstehung einer positiven Ladung des Lysinrestes und somit ensprechend zu gegensätzlichen Effekten. Eine weitere Möglichkeit der Interpretation von kovalenten Histonmodifikationen durch die Zelle hat D. Allis mit dem Ausdruck des "Histon-Codes" geprägt (Strahl & Allis, 2000). Dabei etablieren verschiedene Histonmodifikationen wie Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung einen individuellen Code, durch den bestimmte Proteinmodule an Chromatin rekrutiert werden. Diese können z.B. Aktivierung der Transkription initiieren, indem sie die Struktur des Chromatins derart verändern, dass eine Bindung von regulatorischen Faktoren (siehe 1.3.) möglich wird oder sie vermitteln Repression der

Genexpression, indem sie eine Kondensation der Chromatinstruktur bewirken und somit regulatorische Faktoren von der DNA-Bindung ausschließen (Jenuwein & Allis, 2001).

Transkription wird auf hierarchisch zwei unterschiedlichen Ebenen reguliert. Die erste Stufe bildet die Veränderung der Chromatinstruktur, die zweite die Transkriptionsinitiation.

# 1.2. Der 'core Promotor' und die GTM

Der Prozess der Initiation der Genexpression ist durch den regulierten Zusammenbau von Multiproteinkomplexen auf den regulatorischen Bereichen eines Gens charakterisiert (Tjian & Maniatis, 1994). Auf der Ebene der DNA sind verschiedene Elemente an diesem Prozess beteiligt. Der 'core Promotor' ist eine kurze Erkennungssequenz (ca. 100 Bp) für die GTM und definiert in dieser Eigenschaft die Position des Transkriptionsstarts eines Gens. Bekannte DNA-Elemente, die ein 'core Promotor' umfassen kann, sind die TATA-Box, das Initiatorelement (Inr), das 'TFIIB recognition element' (BRE) und das 'down-stream promoter element' (DPE). Die TATA-Box ist eine A/T-reiche Sequenz, typischerweise an Position -20 bis -30 relativ zum Transkriptionsstart gelegen und wird durch eine Untereinheit von TFIID, dem 'TATA-binding protein' (TBP) erkannt und gebunden (Pugh & Tjian, 1992, Smale, 1994, Burley & Roeder, 1996). Das Inr überlappt mit dem Transkriptionsstart und bildet ebenfalls eine Bindungsstelle für TFIID (Burley & Roeder, 1996). An der Inr-Bindung durch TFIID sind die zwei TFIID-Untereinheiten TAF<sub>II</sub>150 und TAF<sub>II</sub>250 (siehe 1.4.1.) beteiligt (Verrijzer et al., 1994, Hansen & Tjian, 1995, Verrijzer et al., 1995, Kaufmann et al., 1998, Chalkley & Verrijzer, 1999). Wahrscheinlich sind in Drosophila TAF<sub>II</sub>60 und TAF<sub>II</sub>40 in die TFIID Bindung des Inr involviert (Burke & Kadonaga, 1997). In einigen Promotoren befindet sich in 5'-Richtung zum Transkriptionsstart das BRE, das die Affinität von TFIIB zum Promotor erhöht (Lagrange et al., 1998). DPEs dagegen befinden sich in vielen Drosophila Promotoren an Position +28 bis +33 relativ zum Transkriptionsstart. Zumindest in Drosophila scheinen DPEs annähernd so häufig in 'core Promotoren' vorzukommen wie die TATA-Box und sind genau wie diese in die Bindung von TFIID an den 'core-Promotor' involviert (Kutach & Kadonaga, 2000).

Die DNA-abhängige RNA-Pol. II ist das zentrale Enzym der differenziellen Genexpression. Zur Transkriptionsinitiation muss sie mit mindestens sieben basalen Transkriptionsfaktoren (GTF), TFIIA, -B, -D, -E, -F, -H und –I assoziieren und bildet mit diesen die GTM. Die basalen Transkriptionsfaktoren vermitteln die Bindung der RNA-Pol. II an den 'core Promotor' und regulieren durch posttranslationale Modifikationen deren Aktivität (Feaver et al., 1991, Lu et al., 1992, Zawel & Reinberg, 1993, Maxon et al., 1994, Akoulltchev et al., 1995, Ohkuma et al., 1995). Das TFIID assoziierte TBP und TFIIB sind sequenzspezifisch DNA-bindende Proteine (Hernandez, 1993, Lagrange et al., 1998). Die Bindung von TFIID an den 'core-Promotor' initiiert einen sequenziellen Aufbau der GTM am Promotor. Nachfolgend bindet TFIIA und bildet mit TFIID einen Komplex, der eine Konformationsänderung durchläuft, bevor TFIIB binden kann (Horikoshi et al., 1988, Chi & Carey, 1996). Die Bindung von TFIIB ermöglicht wiederum die Bindung der mit TFIIF assoziierten RNA-Pol. II, was zur Rekrutierung von TFIIE und TFIIH führt (Maxon et al., 1994). Alternativ könnten TFIIB und TFIID gleichzeitig oder TFIIB vor TFIID an DNA Möglicherweise vermittelt TFIIB durch seine spezifische DNA-Bindung binden. Transkriptionsinitiation an Promotoren, die keine TATA-Box enthalten (Lagrange et al., 1998). Der komplette 'core-Promotor' gebundene Komplex bildet den Präinitiationskomplex (PIK). Ein alternatives Modell postuliert, dass die RNA-Pol. II und einige GTFs einen als Holoenzym bezeichneten Proteinkomplex bilden, der als Einheit an den 'core-Promotor' bindet (Roeder, 1996). Der Übergang vom PIK in den Vorgang der Elongation ist gekennzeichnet durch die Phosphorylierung der Carboxy-terminalem Domäne (CTD) der RNA-Pol. II durch TFIIH (Roeder, 1996, Svejstrup et al., 1996, Ogbourne & Antalis, 1998). Um Transkription zeitlich und räumlich zu regulieren, werden weitere DNA-Elemente und Faktoren benötigt, die 'Enhancer/Silencer'und Transkriptionsfaktoren.

# 1.3. 'Enhancer/Silencer' und Transkriptionsfaktoren

Die zeitliche und räumliche Kontrolle der Genexpression wird von definierten DNA-Abschnitten vermittelt, den 'Enhancern/Silencern' und 'upstream promoter elements' (UPEs). 'Enhancer' vermitteln Aktivierung, 'Silencer' Repression der Genexpression. Charakteristisch für 'Enhancer/Silencer' ist ihre orientierungs- und positionsunabhängige Wirkungweise (Maniatis et al., 1987, Ogbourne & Antalis, 1998). Im Gegensatz zu 'Enhancern/Silencern' **UPEs** distale Promotorelemente, die ebenso wie 'Enhancer/Silencer' sind orientierungsunabhängig arbeiten (Maniatis et al., 1987). Die genannten cis-regulatorischen Zielsequenzen **DNA-Elemente** transregulatorische sind für Proteine, die

Transkriptionsfaktoren. Diese sind modular aufgebaute Proteine, die eine DNA-Bindungsdomäne und eine oder mehrere regulatorische Domänen besitzen.

Erstgenannte vermitteln die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die 'Enhancer/Silencer' Regionen ihrer Zielgene, die Zweiten vermitteln entweder Aktivierung oder Repression der Genexpression (Ptashne & Gann, 1990). Die Kombination von Aktivatoren und Repressoren auf den regulatorischen DNA-Elementen ihrer Zielgene bestimmt die Expression des Gens durch verschiedene Mechanismen. Allen Modellen zur transkriptionellen Regulation ist der erste Schritt gemeinsam, die spezifische Bindung der Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen ihrer Zielgene.

In vitro und in vivo Studien geben Anlass zu der Hypothese, dass in Hefe die Rekrutierung des RNA-Pol. II Holoenzyms durch DNA-gebundene Aktivatoren zum Promotor ein Hauptmechanismus zur transkriptionellen Aktivierung darstellt. Dabei wurde gezeigt, dass die Fusion der Aktivierungsdomäne verschiedener transkriptioneller Aktivatoren an Komponenten von TFIID (z.B. TBP) oder andere Komponenten des RNA-Pol. II Holoenzyms nicht zu einer Aktivierung der Transkription führte, während die Fusion der DNA-Bindungsdomäne eines Aktivators an die gleichen Komponenten eine erhöhte transkriptionelle Aktivität zur Folge hatte (Keaveney & Struhl, 1998). Bestärkt wurde diese Hypothese durch in vitro Experimente, in denen eine Abhängigkeit der transkriptionellen Aktivität von der Konzentration des Hefe Holoenzyms gezeigt wurde. Während ein transkriptioneller Aktivator die transkriptionelle Aktivität bei geringer RNA-Pol. II Konzentration steigern konnte, hatte er bei hoher RNA-Pol. II Konzentration keinen Einfluss mehr (Gaudreau et al., 1998). Neben der Rekrutierung des Hefe Holoenzyms aktivieren Aktivatoren die Transkription auch durch Rekrutierung einzelner Bausteine der GTM und erleichtern/ermöglichen somit den Zusammenbau des PIK (Zawel & Reinberg, 1993, Hori & Carey, 1994, Kingston & Green, 1994, Tjian & Maniatis, 1994). Ein erweitertes Modell postuliert einen Mechanismus zur Transkriptionsaktivierung durch aktivatorinduzierte Konformationsänderungen von GTFs. In vitro Studien mit dem GTF TFIIB lassen vermuten, dass die NH<sub>2</sub>- und COOH-terminalen Domänen von TFIIB intramolekular interagieren. Diese Interaktion könnte die Rekrutierung der mit TFIIF assoziierten RNA-Pol. II durch TFIIB inhibieren. Die Interaktion eines Aktivators mit TFIIB führt zur Zerstörung der intramolekularen Assoziation, was eine Konformationsänderung von TFIIB zur Folge hat. Erst jetzt werden die Bindungsstellen für TFIIF und die RNA-Pol. II freigegeben und es kommt zum Zusammenbau des PIK (Roberts & Green, 1994).

Die funktionalen Gegenspieler der Aktivatoren der Transkription sind die Repressoren. Ein Hauptunterscheidungskriterium für Repressoren ist die Distanz, über die sie ihre Funktion vermitteln. Während die 'short range' Repressoren über eine Distanz von <100 Bp die Genexpression inhibieren, agieren die 'long range' Repressoren über Distanzen von >1 kBp. Je nach Anordnung von Aktivator- und Repressorbindungsstellen in der regulatorischen Region des Zielgens kann man verschiedene Arten der 'short-range' Repression unterscheiden. (1) Kompetetive Bindung: Aufgrund überlappender Repressor- und Aktivatorbindungsstellen können Repressoren die Aktivatoren von der DNA-Bindung ausschließen und so Repression vermitteln (Gray & Levine, 1996a und b). Diese Art der Repression ist abhängig von unterschiedlichen Konzentrationen und/oder DNA-Bindungsaffinitäten der Aktivatoren und Repressoren. Obwohl es mehrere Beispiele für eine solche kompetetive DNA-Bindung von Aktivatoren und Repressoren gibt, scheint es unwahrscheinlich, dass dies einer der Hauptmechanismen zur Repression der Genregulation in Eukaryoten ist. Die meisten 'Enhancer/Silencer' eukaryotischer Gene sind sehr komplex aufgebaut und die Aktivierung erfolgt häufig durch eine Kombination mehrerer DNAgebundener Faktoren. Um ein solches Gen effektiv durch kompetetive DNA-Bindung zu reprimieren, wären eine ganze Reihe überlappender Bindungssequenzen notwendig (Johnson, (2)"Quenching": Dabei ermöglichen benachbarte 1995). Aktivatorund Repressorbindungssequenzen in den regulatorischen Sequenzen von Zielgenen eine gleichzeitige DNA-Bindung und Interaktion von Aktivatoren und Repressoren. Diese Interaktion kann die Aktivierungsdomäne des Aktivators maskieren, wodurch Repression vermittelt wird (Arnosti et al., 1996, Gray & Levine, 1996a). Dieser Mechanismus bietet die Möglichkeit, Proteine gleichzeitig als Aktivatoren und Repressoren zu nutzen. Während die beiden Aktivatoren als separate DNA-gebundene Proteine Aktivierung vermitteln, führt der Kontakt der beiden in direkter Nachbarschaft an DNA-gebundenen Proteine zur Inhibierung ihrer Aktivität (Johnson, 1995). Nicht nur die Positionen der Aktivatorbzw. der Repressorbindungsstellen in regulatorischen Region bestimmen den Repressionsmechanismus sondern auch die relative Lage der regulatorischen Sequenzen zum Promotor. Während die kompetetive DNA-Bindung und der "Quenching"-Mechanismus aktivatorabhängig sind, ermöglichen promotornahe Bindungssequenzen für 'short range' Repressoren einen aktivatorunabhängigen Repressionsmechanismus. (3) "Aktiver" oder "direkter" Repressionsmechanismus: Dabei nehmen nahe am Promotor gebundene Repressoren Einfluss auf Funktion und Wirkung der GTM (Arnosti et al., 1996, Gray &

Einleitung

Levine, 1996a). DNA-gebundene Repressoren können direkt mit Komponenten der GTM interagieren und evtl. Bindungsstellen für weitere GTFs maskieren oder zum Aufbau des PIK notwendige enzymatische Aktivitäten der GTFs inhibieren (Johnson, 1995). Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Bindung von Repressoren an die TATA-Box, wodurch die Bindung von TBP und somit der Aufbau des PIK unterbunden wird (Dostanti *et al.*, 1991). Einige Repressoren inhibieren Genexpression durch die Interaktion mit TBP. Mot1 bindet den TBP-DNA Komplex und verursacht eine ATP-abhängige Dissoziation von TBP von der DNA. Auch NC2, eine Komponente der 'USA' (siehe 1.4.1.), bindet DNA-assoziiertes TBP und verhindert den weiteren Zusammenbau des PIK (Lee & Young, 2000). Mit der direkten Repression steht der Zelle ein einfaches Mittel zur Verfügung, Genexpression aktivatorunabhängig zu reprimieren.

Einen möglichen Mechanismus zur Funktionsweise von 'long-range' Repressoren lieferten Experimente mit chimeren Proteinen, bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne von 'short-range' Repressoren und der "Repressordomäne" von 'long-range' Repressoren (Nibu *et al.*, 2001). Solche chimeren Repressoren vermitteln 'longe range' Repression und zeigen eine funktionale Abhängigkeit von 'Enhancer'-gebundenen Aktivatoren. Im 'hot chromatin' Modell postuliert man, dass 'long-range' Repressoren nur an "offene" oder "aktive" 'Enhancer' binden, die mit Aktivatoren besetzt sind (Nibu *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu 'short-range' Repressoren, die eine lokale Wirkung zeigen, beobachtet man bei 'long range' Repressoren oftmals einen "globalen" oder "dominanten" Wirkungsmechanismus. Dabei wird der betreffende Promotor "resistent" gegen mehrere 'Enhancer' einer regulatorischen Region (Gray & Levine, 1996b). Die Kommunikation zwischen den DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren, unabhängig ob Aktivatoren oder Repressoren, und der GTM muss aber nicht zwangsweise durch direkten Kontakt erfolgen. Vielmehr zeigen unzählige Studien der letzten Jahre, dass die Kommunikation zwischen DNA-gebundenen Faktoren und der GTM häufig durch Kofaktoren vermittelt wird.

# 1.4. Kofaktoren

Kofaktoren können in zwei Klassen eingeteilt werden. Zum einen in solche, die als Adaptoren zwischen Transkriptionsfaktoren und der GTM fungieren und zum anderen Kofaktoren mit chromatinmodifizierenden Aktivitäten. Die meisten Kofaktoren binden nicht selbstständig an DNA. Sie vermitteln Aktivierung oder Repression der Genexpression und können somit in Koaktivatoren und Korepressoren unterteilt werden. Viele Kofaktoren üben ihre Funktion als Bestandteile großer Multienzymkomplexe aus.

## 1.4.1. Koaktivatoren

Einer der am besten charakterisierten Koaktivatoren ist TFIID. TFIID setzt sich aus TBP und zehn oder mehr, abhängig vom Organismus, 'TBP-associated-factors' (TAF<sub>II</sub>s) zusammen (Albright & Tjian, 2000). In vitro Experimente belegen, dass TAF<sub>II</sub>s zwar für Transkriptionsaktivierung, nicht jedoch für basale Transkription benötigt werden. Es wurde gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren verschiedene  $TAF_{IIS}$  kontaktieren, um TFIID an den core-Promotor zu rekrutieren (Näär et al, 2001). Die größte TFIID-Untereinheit ist TAF<sub>II</sub>250, ein multifunktionales Protein. Neben seiner Aufgabe als zentraler Gerüstbaustein in TFIID wird es durch Aktivatoren kontaktiert, wodurch der Aufbau des PIK begünstigt wird. Ferner besitzt TAFII250 mehrere intrinsische enzymatische Aktivitäten, die mit Transkriptionsaktivierung in Verbindung gebracht werden (Näär et al., 2001). Das Protein besitzt zwei unabhängige Serin/Threonin Kinase-Aktivitäten, eine im NH2- und eine im COOH-terminalen Bereich. Während die COOH-terminale Aktivität TAF<sub>11</sub>250 autophosphoryliert, modifiziert die NH2-terminale Aktivität Komponeten der GTM. Außerdem besitzt TAFII250 HAT-Aktivität, die Histone und GTFs in vitro acetyliert und bindet durch eine "Tandem-Bromodomäne" acetylierte Histone (Wassarman & Sauer, 2001). Zudem vermittelt TAF<sub>II</sub>250 Monoubiquitinierung von H1 (Pham & Sauer, 2000). Zusammenfassend lässt sich für die TAFII250-vermittelte Transkriptionsaktivierung folgendes Modell aufstellen: Durch spezifische Interaktionen von DNA-gebundenen Aktivatoren und TAF<sub>II</sub>250 wird TFIID zum Promotor rekrutiert, wo die kovalente Modifikation von Histonen oder Komponenten der GTM durch TAFII250 zur Transkriptionsaktivierung führt (Wassarman & Sauer, 2001).

Ein weiterer gut charakterisierter Kofaktorkomplex ist der erstmals aus Hefe isolierte Mediator-Komplex. Er setzt sich aus bis zu 80 Proteinen zusammen und assoziiert mit der COOH-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Pol. II. Der Mediator stimuliert die TFIIH abhängige Phosphorylierung der CTD, ein Vorgang, der mit der Initiation der Elongation in Verbindung gebracht wird (Roeder, 1996, Svejstrup *et al.*, 1996, Ogbourne & Antalis, 1998, Näär *et al.*, 2001). Biochemische und genomweite Expressionsanalysen lassen vermuten, dass der Hefe-Mediator-Komplex das Ziel von Transkriptionsfaktoren ist und als Transmitter zwischen den Transkriptionsfaktoren und der GTM fungiert (Näär *et al.*, 2001).

Ein weiterer Kofaktorkomplex, der aber im Gegensatz zu TFIID und Mediator nicht direkt mit der GTM assoziiert, ist die aus menschlichen Zellkernen isolierte 'Upstream Stimulatory Activity' (USA), eine biochemische Fraktion, die sowohl positive wie negative Kofaktoren der Transkriptionsregulation enthält (Kaiser & Meisterernst, 1996).

#### 1.4.2. Korepressoren

Koaktivatoren finden ihre funktionalen Gegenstücke in den bei weitem nicht so gut charakterisierten Korepressoren. Genau wie die meisten Koaktivatoren können auch die meisten Korepressoren nicht direkt an DNA binden und besitzen als funktionale Gegenspieler zu den Koaktivatoren intrinsische Repressoraktivität. Sie werden durch DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren zu den regulatorischen Sequenzen ihrer Zielgene rekrutiert und tragen zur Repression derselben bei. Die zwei Prinzipien der transkriptionellen Repression, repräsentiert durch 'short range' und 'long range' Repressoren (siehe 1.3.), spiegeln sich in den beiden *Drosophila* Korepressoren Groucho und CtBP wieder. Grund der Namensgebung für CtBP war die spezifische Interaktion des Proteins mit der COOH-terminalen Region von E1A ('C-terminal binding protein'). Groucho-assoziierte Repressoren vermitteln 'longe range' und CtBP-assoziierte Repressoren 'short range' Repression (Mannervik *et al.*, 1999).

Groucho wurde ursprünglich als Korepressor des basischen-Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteins Hairy identifiziert (Paroush *et al.*, 1994). Heute weiß man, dass nahezu die Hälfte der derzeit am besten charakterisierten Repressoren im frühen *Drosophila* Embryo mit Groucho interagieren (Paroush *et al.*, 1994, Aronson *et al.*, 1997, Dubnicoff *et al.*, 1997). Zwei von diesen, Hairy und Dorsal, wurden in Bezug auf ihren "Aktionsradius" untersucht und fungieren als 'long range' Repressoren (Cai *et al.*, 1996, Barolo & Levine, 1997). Dorsal vermittelt nicht nur Aktivierung von mesodermalen und neuroektodermalen Determinanten in ventralen und lateralen Regionen des frühen Embryos, sondern fungiert auch als Repressor, der die Expression von decapentaplegic (dpp) und zerknüllt (zen) auf dorsale Regionen beschränkt (Jiang et al., 1993). Hinweise auf einen möglichen Mechanismus der Grouchovermittelten Repression gab die Entdeckung der direkten Interaktion zwischen Drosophila Groucho und der Histon-Deacetylase HDAC1 (Chen et al., 1999). Studien in humanen Zellen zeigten eine Kopräzipitation von Groucho mit HDAC1 und mindestens zwei Komponenten des Sin3 Repressorkomplexes. Somit könnte Groucho als Adaptor zwischen dem Sin3 Komplex und Repressoren fungieren und so die Rekrutierung von HDAC1 vermitteln (Choi et al., 1999). Weitere Experimente in Hefe mit dem Groucho Homolog Tup1 erlauben die Hypothese eines 'Spreading' Mechanismusses. Dabei könnte Tup1 durch Rekrutierung einer Histon-Deacetylase eine Veränderung des Acetylierungsmusters der Histone verursachen. Dies könnte die kooperative Bindung von Proteinen entlang des Chromatins und damit die Etablierung einer repressiven Domäne zur Folge haben (Courey & Jia, 2001). Eine funktionale Interaktion zwischen Tup1 und Bestandteilen des RNA-Pol. II assoziierten Mediators lassen alternativ oder zusätzlich einen Einfluss von Tup1 auf die GTM vermuten (Gromoller & Lehming, 2000).

Genetische Studien haben in *Drosophila* das Homolog des humanen Korepressors CtBP identifiziert (Nibu *et al.*, 1998a und b, Poortinga *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu Groucho scheint CtBP 'short range' Repression zu vermitteln. Obwohl die Funktion der drei *Drosophila* Repressoren Knirps, Krüppel und Snail von CtBP-abhängig ist, bleibt der Mechanismus der CtBP-vermittelten Repression derzeit unbekannt (Nibu *et al.*, 1998b). Aus Ergebnissen einer Studie, die eine spezifische Interaktion von humanem CtBP mit der Untereinheit HPC2 des Polycombkomplexes zeigte, entstand ein Modell, in dem CtBP als "Brückenprotein" fungiert. Dabei wird ein CtBP-assoziierter Repressor und der CtBPassoziierte Polycombkomplex durch Homodimerisierung von CtBP zusammengeführt (Sewalt *et al.*, 1999). Genau wie Groucho wurde auch CtBP als Bestandteil des Sin3 Repressorkomplexes identifiziert (Koipally & Georgopoulos, 2000). Untersuchungen zur Beteiligung von HDAC-Aktivität an CtBP-vermittelter Repression lieferten widersprüchliche Resultate und lassen keine klaren Schlussfolgerungen zu (siehe 1.6.1.).

Obwohl transkriptionelle Repression ein essentieller Bestandteil der differenziellen Genexpression ist, beginnt man erst heute die Mannigfaltigkeit der Repressionsmechanismen zu untersuchen und zu verstehen. Die am besten charakterisierten Kofaktoren stellen die HATs und die HDACs. Bereits 1964 vermutete man einen Zusammenhang zwischen dem Acetylierungsstatus von Histonen und transkriptioneller Aktivität (Allfrey *et al.*, 1964).

# 1.5. Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen

Histon Acetylierung/Deacetylierung ist derzeit die am besten untersuchte Histonmodifikation und scheint entscheidenden Einfluss auf die Genregulation zu haben (siehe 1.1.). Die funktionelle Verknüpfung von Histon-Acetylierung bzw. -Deacetylierung mit Transkriptionsregulation basiert auf der Assoziation der HATs und HDACs mit Trankriptionsfaktoren (Imhof & Wolffe, 1998). *In vivo* scheinen HATs und HDACs ihre Aktivität vorwiegend als Bestandteile von großen Multienzymkomplexen zu vermitteln (Narlikar *et al.*, 2002).

# 1.5.1. Histon-Acetyltransferasen und deren Komplexe

Heute sind drei Familien von nukleären HATs bekannt, die GNAT-, die MYST- und die p300/CBP-Familie (Roth et al., 2001). Die Namensgebung erfolgte nach Verwandtschaft zu repräsentativen Proteinen der einzelnen Familien. So steht "GNAT" für 'Gcn5-related Nacetyltransferase' und beschreibt damit eine Familie an Proteinen, die Ähnlichkeit zu der heute am besten charakterisierten HAT Gcn5 aus Hefe (y) haben (Neuwald & Landsman, 1997, Roth et al., 2001). Die MYST-Familie trägt ihren Namen aufgrund der Benennung der vier repräsentativen Mitglieder MOZ, Ybf2/Sas2, Sas3 und Tip60 (Reifsnyder et al., 1996, Borrow et al., 1996, Roth et al., 2001). Die p300/CBP Familie ist gekennzeichnet durch die zwei strukturell sehr ähnlichen Proteine p300 und CBP (Chrivia et al., 1993, Eckner, et al., 1994). Allen gemeinsam ist ein hochkonserviertes Motiv, das ein Acetyl-Koenzym A Bindungsmotiv umfasst (Roth et al., 2001). Die Vielzahl der bekannten HATs interagiert mit weiteren HATs oder anderen Kofaktoren wie TAFIIs und bildet somit eine ebenso große Anzahl verschiedener HAT-Komplexe. Manche Komplexe besitzen zwar die gleichen HAT-Untereinheiten, unterscheiden sich jedoch in der Zusammensetzung weiterer Komponenten und der Histonspezifität (Roth et al., 2001). Zu den derzeit bestcharakterisierten HAT-Komplexen gehören die vGcn5- oder die humanen P/CAF-Komplexe. Der vSAGA-Komplex enthält neben der katalytischen Einheit yGcn5 Komponenten, welche die Bindung von TBP

an die TATA-Box stabilisieren (Roth *et al.*, 2001). Das lässt vermuten, dass der SAGA-Komplex Aktivierung nicht nur durch HAT-Aktivität vermittelt, sondern auch als Adaptor zwischen Transkriptionsfaktoren und TBP fungiert. Diese These wird durch die Assoziation von mehreren TAF<sub>II</sub>s mit dem SAGA-Komplex gestützt. Tatsächlich zeigten genetische Studien, dass erst die Eliminierung der Funktion beider Module von SAGA, der HAT-Aktivität und der TBP-Assoziation, die Transkriptionsaktivierung vollständig unterbindet (Roth *et al.*, 2001).

Obwohl per Definition Histone die präferierten Substrate für HATs darstellen, werden immer mehr "Nicht-Histon" Substrate identifiziert. Zu den "Nicht-Histon" Substraten für die HATs p300/CBP und P/CAF zählen z. B. Aktivatoren, Koaktivatoren, GTFs, Strukturproteine, Kernimportproteine und HATs selbst. Die Acetylierung solcher Faktoren kann ihr Bindungsverhalten gegenüber DNA oder anderen Proteinen beeinflussen, die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen regulieren oder enzymatische Aktivitäten steuern (Roth *et al.*, 2001).

## 1.5.2. Histon-Deacetylasen und deren Komplexe

Die funktionalen Gegenspieler der HAT-Komplexe sind die HDAC-Komplexe. HDACs sind, basierend auf Ähnlichkeiten zu bekannten Hefe HDACs, in drei Klassen eingeteilt. Klasse I HDACs zeigen Ähnlichkeit zu yRPD3, während Klasse II HDACs mit yHDA1 verwandt sind (Taunton *et al.*, 1996, Grozinger *et al.*, 1999). Klasse III HDACs sind durch ySIR2 (<u>Silent Information Regulator 2</u>) definiert (Imai, *et al.*, 2000, Berstein *et al.*, 2000, Shore, 2000).

Zur Zeit sind vier Klasse I HDACs bekannt, HDAC1, -2, -3 und 8, davon sind bis jetzt nur HDAC1 und HDAC3 in *Drosophila melanogaster* identifiziert (De Rubertis, *et al.*, 1996, Barlow *et al.*, 2001, Khochbin *et al.*, 2001). HDAC1 und HDAC2 wurden als Komponenten der zwei großen HDAC-Komplexe, des Sin3- und des NuRD- (<u>nu</u>cleosome <u>r</u>emodelling and <u>d</u>eacetylation) Komplexes identifiziert. Sowohl der Sin3- als auch der NuRD-Komplex sind in Vertebraten und Hefe gut untersucht. Sie besitzen als gemeinsamen Kern die Enzyme HDAC1, HDAC2 und die Histon-bindenden Proteine RbAp46 und -48. Neben mehreren unterschiedlichen assoziierten Faktoren unterscheiden sie sich im Falle des Sin3-Komplexes durch den namensgebenden Korepressor Sin3 und im Falle des NuRD-Komplexes durch die Anwesenheit des ATP-abhängigen 'nucleosome remodeling' Proteins Mi-2 (Knoepfler & Eisenman, 1999). Genetische Studien in *Drosophila* führten zur Identifikation eines Sin3 Homologs (dSin3), das starke Ähnlichkeit zu Sin3 aus Hefe und Maus zeigt (Pennetta & Pauli, 1998). Die genaue Zusammensetzung des Sin3-Komplexes in *Drosophila* ist noch unbekannt, Färbung von Polytänchromosomen unter Verwendung von *anti*-HDAC1 und *anti*-Sin3 Antikörpern zeigten jedoch eine strenge Kolokalisation der beiden Proteine (Pile & Wassarman, 2000).

Drosophila Mi-2 (dMi-2), das Homolog zu dem humanen Autoantigen Mi-2, ist zentraler Bestandteil des NuRD-Komplexes und wurde ursprünglich als Interaktionspartner des Drosophila Gap-Gens hunchback in einem 'yeast-two-hybrid screen' identifiziert (Kehle et al., 1998). Biochemische Anlaysen zeigten, dass in Drosophila alle homologen Proteine des Mi-2/NuRD-Komplexes exprimiert werden (Wade et al., 1999). Sowohl der NuRD- als auch der Sin3-Komplex vermitteln transkriptionelle Repression, wahrscheinlich aber in einem völlig unterschiedlichen Kontext. Studien in Drosophila haben eine genetische Interaktion zwischen dem Gap-Gen Hunchback und dMi-2, Bestandteil des NuRD-Komplexes und Proteinen der Polycomb-Gruppe gezeigt (Kehle et al., 1998). Die Proteine der Polycomb-Gruppe reprimieren dauerhaft und vererbbar homöotische Genexpression, wahrscheinlich durch Veränderung der Chromatinstruktur (Pirrotta, 1998). Diese und andere Studien lassen vermuten, dass der NuRD-Komplex in die Etablierung und Erhaltung von transkriptionell dauerhaft inaktiven Chromatindomänen involviert ist. Dabei könnte der Komplex an "unzugängliche" Chromatinbereiche rekrutiert werden, wobei die 'nucleosome remodeling activity' von Mi-2 den Zugang zu den Histonen ermöglicht und anschließend die Histone durch die Aktivität der Histon-Deacetylase modifiziert werden können (Knoepfler & Eisenman, 1999). Die Interaktion von Sin3 mit einer Vielzahl an Transkriptionsfaktoren wie Mad, Ume6, p53 und Korepressoren wie N-CoR, SMRT u. a., lässt dagegen eine genspezifische und transiente Funktion vermuten (Knoepfler & Eisenman, 1999).

Der dritte charakerisierte HDAC-Komplex, der CoREST-HDAC-Komplex, ist durch den namensgebenden Korepressor CoREST gekennzeichnet. Er unterscheidet sich u. a. von den beiden erstgenannten Komplexen sowohl durch die Abwesenheit von Sin3 und Mi-2 als auch durch die Abwesenheit von RbAp46 und RbAp48. Er wurde biochemisch aus HeLa-Zellen isoliert, über ein Vorkommen eines CoREST-Homologs in *Drosophila* ist bisher nichts bekannt (You *et al.*, 2001, Humphrey *et al.*, 2001).

Neben HDAC1 und -2 ist HDAC3 ein gut charakterisiertes Mitglied der Klasse I HDACs. HDAC3 nimmt unter den Klasse I HDACs insofern eine Sonderstellung ein, indem es das einzige Protein dieser Klasse ist, für dessen Funktion ein geregelter Kernimport und - export essentiell zu sein scheint (Takami & Nakayama, 2000). HDAC3 ist weder Bestandteil des Sin3- noch des NuRD-Komplexes, scheint aber zusammen mit den Kernrezeptor-Korepressoren SMRT und N-CoR in großen Multiproteinkomplexen assoziiert zu sein (Khochbin *et al.*, 2001).

Die Familie der Klasse II HDACs umfasst derzeit mit HDAC4, -5, -6, -7 und -9 fünf Proteine (Bertos at al., 2001). Aufgrund von Sequenzhomologien ihrer Deacetylase Domänen wurden die Klasse II HDACs in zwei Subgruppen unterteilt. Die Klasse IIa umfasst HDAC4, HDAC5 und HDAC7, während die Klasse IIb von HDAC6 und HDAC9 gebildet wird (Bertos et al., 2001). Charakteristisch für alle Klasse II HDACs ist die Homologie der katalytischen Domäne zum yHDA1 Protein. Sie sind signifikant größer als die Klasse I Enzyme und ihre katalytische Domäne befindet sich in der COOH-terminalen Hälfte des Proteins, während die katalytische Domäne der Klasse I HDACs NH2-terminal orientiert ist. HDAC6 bildet eine Ausnahme unter allen HDACs, indem es zwei katalytische Domänen besitzt (Khochbin et al., 2001). Während die Klasse I HDACs ubiquitär exprimiert werden, zeigen Klasse II HDACs in Maus und Mensch eine gewebespezifische Expression (Bertos et al., 2001). Eine der interessantesten Charakteristika der Klasse IIa HDACs ist der regulierte Transfer zwischen Cytoplasma und Zellkern. HDAC4 und -5 interagieren phosphorylierungsabhängig mit 14-3-3 Adaptorproteinen. Von den 14-3-3 Proteinen vermutet man, dass sie durch Interaktion mit dem Kernexportprotein CRM1 Proteine aus dem Zellkern transportieren (Bertos et al., 2001, Fischle et al., 2001). In Zellen, die mit einem Protein-Kinase Inhibitor behandelt wurden, akkumulierte HDAC4 im Zellkern, während eine Behandlung mit einem Phosphatase Inhibitor oder die Überexpression von 14-3-3 Proteinen zu einer Akkumulation von HDAC4 im Cytoplasma führte (Grozinger & Schreiber, 2000). Eine ektopische Expression von konstitutiv aktiven Mutanten der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin abhängigen Kinasen (CaMKs) führte zu einem verstärkten Kernexport von HDAC5 (McKinsey et al., 2000). Trotz der hohen Sequenzhomologie zwischen HDAC4 und -5 scheint die Regulation ihrer subzellulären Lokalisation durch 14-3-3 Proteine unterschiedlich zu sein. Von HDAC4 vermutet man, dass die Bindung von 14-3-3 Proteinen Kernlokalisationssignale (NLS) maskiert und somit der Kernimport durch die Inhibition der Bindung des Importin α-Komplexes verhindert wird (Grozinger & Schreiber, 2000). Eine mutante Variante von HDAC5 dagegen, der das NLS fehlt, interagiert nach wie vor mit

14-3-3 Proteinen, bleibt aber dennoch nukleär (Fischle *et al.*, 2001). Da auch HDAC7 ein 14-3-3 Interaktionsmotiv besitzt, vermutet man eine Regulation der Aktivität durch subzelluläre Kompartimentierung für alle Klasse IIa Proteine, während die Klasse IIb Enzyme keine

14-3-3 Interaktionsmotive aufweisen (Bertos et al., 2001). Die cytoplasmatisch lokalisierten, mit 14-3-3 Proteinen assoziierten HDAC4, -5 und -7 könnten durch unbekannte Phosphatasen dephosphoryliert, von den Adaptorproteinen freigesetzt und zurück in den Zellkern geschleußt werden (Fischle et al., 2001). HDACs der Klasse II interagieren mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren und Korepressoren. Sowohl HDAC4 als auch HDAC5 interagieren mit MEF2, einem Transkriptionsfaktor, der in die Regulation der Expression von und herzmuskelspezifischen Genen involviert ist. In vivo wird die skelettal-Muskeldifferenzierung durch die Interaktion von MEF2 mit HDAC4 und -5 inhibiert (Bertos et al., 2001, Fischle et al., 2001). HDAC4 und -5 interagieren beide mit dem Korepressor CtBP, der auch als Bindungspartner der Klasse I HDAC1 bekannt ist (Sundqvist et al., 1998, Bertos et al., 2001). Für HDAC7 vermutet man eine solche Interaktion auch, da es ein CtBP Interaktionsmotiv besitzt (Bertos et al., 2001). Weiterhin assoziieren Klasse IIa HDACs mit den Hormonrezeptor-Korepressoren N-CoR und SMRT. Von HDAC7 vermutet man, dass es mit dem Korepressor Sin3 assoziiert (Fischle et al., 2001). Dies sind Hinweise, dass HDACs der Klasse II, ähnlich wie die Klasse I Enzyme, ihre Aktivität als Bestandteile von grossen Multiproteinkomplexen vermitteln.

Die große Familie der Klasse III HDACs zeichnet sich durch Verwandtschaft mit dem Hefe Repressor ySIR2 aus. ySIR2 ist eine Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid- (NAD) abhängige Histon-Deacetylase, die in die Repression des 'silent mating type' Lokus, der Telomere und der rDNA in Hefe involviert ist (Imai *et al.*, 2000). Genetische Studien in Hefe zeigten, dass eine reduzierte Kalorienzufuhr zu einer erhöhten Lebensspanne (messbar durch die Anzahl der Teilungen der Mutterzelle) durch einen SIR2- und NPT1-abhängigen Mechanismus führte (Lin *et al.*, 2000). NPT1 ist eine Nikotinsäure-phosphoribosyltransferase (NPRTase) und synthetisiert in einem "Recyclingverfahren" NAD aus Nikotinsäure. In Hefe ist dieses Enzym durch das Gen *NPT1* codiert und repräsentiert in Eukaryoten einen von zwei Hauptsynthesewegen für NAD (Rajavel *et al.*, 1998). Man vermutet, dass die Aktivierung von ySIR2 durch NAD zur verstärkten Reprimierung bestimmter Chromatinbereiche führt, was eine Verlängerung der Lebensspanne zur Folge hat (Lin *et al.*, 2000). Somit verknüpft ySIR2 den Metabolismus mit dem Chromatinstatus der Zelle. Da auch das humane Homolog zu ySIR2, mSir2 $\alpha$ , eine NAD-abhängige HDAC- Aktivität aufweist, ist ein solcher Mechanismus auch für höhere Eukaryoten denkbar. Man vermutet, dass die Etablierung und Erhaltung inaktiver Chromatinbereiche ein kritischer Faktor zur Verlängerung der Lebensspanne ist, entweder durch Repression genomischer Instabilität oder durch Inhibition "unnötiger" Genexpression (Imai *et al.*, 2000, Lin *et al.*, 2000). Während die HDAC-Aktivität von ySIR2 essentiell für transkriptionelle Repressionsvorgänge in Hefe ist, vermutet man für die intrinsische ADP-Ribosylase Aktivität eine Funktion während DNA Reparaturvorgängen (Imai *et al.*, 2000). Neben der Funktion der Repression von Heterochromatinbereichen weisen die genetische und physikalische Interaktion von *Drosophila* SIR2 (dSIR2) mit dem bHLH-Repressor Hairy auf eine Funktion in euchromatischer Repression hin (Rosenberg & Parkhurst, 2002). Die Summe der Eigenschaften der Klasse III Enzyme lässt vermuten, dass sie völlig andere Aufgaben erfüllen als die Klasse I und II nicht sensitiv gegen den Inhibitor der HDAC-Aktivität Trichostatin A (TSA) und ist damit von diesen funktionell zu unterscheiden (Taunton *et al.*, 1996, Grozinger *et al.*, 1999, Imai *et al.*, 2000).

Für die Funktionsweise von HDACs, unabhängig welcher Klasse sie angehören, lässt sich folgendes vereinfachtes Modell aufstellen. Die HDACs werden durch spezifisch DNAgebundene Repressoren an die regulatorischen Sequenzen ihrer Zielgene rekrutiert und deacetylieren hochkonservierte Lysinreste in den NH<sub>2</sub>-terminalen Domänen der nukleosomalen Zielproteine. Histone oder andere Alternativ könnten die Transkriptionsfaktoren und die HDAC-Repressorkomplexe schon vor ihrer DNA-Bindung als Einheit vorliegen und so an die DNA rekrutiert werden (siehe Abb. 1.).



Abb. 1 Modell zum Mechansimus der HDAC-vermittelten transienten transkriptionellen Repression der Klasse I HDACs. Verändert nach Razin, EMBO J. (1998)

# 1.6. Drosophila melanogaster als Modellsystem

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* stellt aus mehreren Gründen ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der transkriptionellen Repression dar. Die schnelle Generationszeit ist für genetische Studien und die relativ einfache Gewinnung großer Mengen Kernextrakt für biochemische Studien von unschätzbarem Wert.

Heute sind etwa zehn Repressoren im frühen *Drosophila* Embryo gut charakterisiert und es ist bekannt, dass diese von essentieller Bedeutung für die Regulation der Genexpression während der Körpermusterbildung und während der Bildung der Primärgewebe sind (Zusammenfassung siehe Nibu *et al.*, 1998b). Während die Wirkungsmechanismen für einige Repressoren gut untersucht sind, sind die molekularen Vorgänge während der Repression der Zielgene des Repressors Snail weitestgehend unbekannt.

## 1.6.1. Der transkriptionelle Repressor Snail

Snail ist ein sequenzspezifisch DNA-bindendes Protein des Zinkfingertyps, dessen Expression der Regulation durch Twist und das Morphogen Dorsal unterliegt (Boulay et al., 1987, Ip et al., 1992a). Dorsal ist im unbefruchteten Ei gleichmäßig im Cytoplasma verteilt und akkummuliert etwa 90 Minuten nach der Befruchtung in lateralen und ventralen Zellen in den Zellkernen. stimmuliert durch die asymmetrische Aktivität des Toll Transmembranproteins (Hashimoto et al., 1988, Stein et al., 1991). Der relativ "flache" Dorsal Gradient stimuliert die Expression eines "steileren" Twist Gradienten in ventrolateralen und ventralen Regionen. Dorsal und Twist zusammen aktivieren die Expression von Snail in einer 18 Zellen breiten ventralen Domäne (siehe Abb. 2, Ip et al., 1992a). Weiterhin aktiviert Dorsal zusammen mit bHLH Proteinen die Expression des neuroektoderm spezifischen Gens rhomboid in lateralen und ventralen Regionen des frühen Embryos (Ip et al., 1992b). Snail schließt seine neuroektodermalen Zielgene wie rhomboid und lethal of scute durch Repression aus seiner eigenen Expressionsdomäne aus und etabliert so die Grenze zwischen prospektivem Mesoderm und Neuroektoderm (Kosman et al., 1991).



Abb.2 Schema der Etablierung der Mesoderm/Neuroektoderm Grenze im frühen Drosophila Embryo. Verändert nach Ip et al., (1992b)

Hinweise auf einen möglichen Mechanismus der Snail-vermittelten Repression lieferten Studien, die sowohl eine physikalische als auch genetische Interaktion zwischen Snail und dem Korepressor CtBP zeigten (Nibu et al., 1998a und b, siehe auch 1.4.2.). CtBP wurde ursprünglich als Interaktionspartner des adenoviralen Proteins E1A identifiziert (Schaeper et al., 1995). CtBP bindet E1A durch das konservierte Motiv P-DLS, das auch in den drei Drosophila Repressoren Knirps, Krüppel und Snail vorkommt. Die korrekte Funktionsweise aller drei Repressoren in vivo ist abhängig von einem intakten CtBP-Bindungsmotiv (Nibu et al., 1998b). Es konnte gezeigt werden, dass Snail und CtBP in vitro interagieren und dass Mutationen in den beiden CtBP-Bindungsmotiven von Snail diese Interaktion unterbinden (Nibu et al., 1998a und b). Im Gegensatz zu den Groucho assoziierten Transkriptionsfaktoren Dorsal und Hairy (siehe 1.4.2.) vermitteln Knirps, Krüppel und Snail 'short range' Repression (Gray et al., 1994, Arnosti et al., 1996, Cai et al., 1996, Gray & Levine, 1996a, Barolo & Levine, 1997). Alle Mitglieder der CtBP Familie besitzen Homologie zu einer D-Isomer spezifischen 2-Hydroxy-Säure Dehydrogenase (Schaeper et al., 1995). Bis heute ist es jedoch nicht gelungen, eine intrinsische Dehydrogenase Aktivität von CtBP nachzuweisen. Eine Mutation eines im putativen katalytischen Zentrum der Dehydrogenase konservierten Histidin Restes zeigte keinen Einfluss auf die Korepressoraktivität von CtBP (Turner & Crossley, 1998). Möglicherweise ist das Motiv mehr struktureller als enzymatischer Natur und ist verantwortlich für die Dimerisierung von CtBP (Schaeper et al., 1995, Poortinga et al., 1998). Die Hinweise auf eine Beteiligung von Histon-Deacetylasen an einem CtBP-vermittelten Repressionsmechanismus sind konträr. Eine physikalische Interaktion von humanem CtBP mit HDAC1 in vitro und in vivo stützt die These eines HDAC-vermittelten Mechanismusses (Sundqvist et al., 1998). Weiterhin wurde in CHO-Zellen (Chinesischer Hamster, Ovar) die Repressoraktivität eines Gal4-mCtBP1 Fusionsproteins (Gal4-Maus CtBP1) durch den Histon-Deacetylase Inhibitor TSA reduziert (Criqui-Filipe et al., 1999). Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu Untersuchungen die zeigten, dass TSA in NIH3T3-Zellen (Maus Fibroblasten) keinen Einfluss auf die Repressoraktivität von humanem Gal4-CtBP1 hatte (Koipally & Georgopoulos 2000). Weiterhin stellen genetische Studien mit frühen Drosophila Embryonen mit stark reduzierter Dosis an maternalem und zygotischem HDAC1 eine genetische Interaktion von CtBP und HDAC1 in Frage. Während Embryonen mit reduzierter Dosis an maternalem und zygotischem CtBP umfassende Musterbildungsdefekte aufwiesen, fielen diese in HDAC1 defizienten Embryonen sehr viel schwächer aus und reduzierten sich weitgehend auf Paarregel-Gendefekte (Mannervik & Levine, 1999). Das

macht eine funktionelle Interaktion von CtBP und HDAC1 im frühen *Drosophila* Embryo unwahrscheinlich. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass CtBP-vermittelte Repression zumindest zu einem Teil HDAC-abhängig ist, in Abhängigkeit vom Promotorkontext oder der eingesetzten Zelllinie.

Genetische Studien ergaben, dass die beiden CtBP-Bindungsmotive in Snail essentiell für die Snail-Funktion im frühen Embryo sind. Frühe *CtBP*<sup>-</sup> Embryonen zeigten die gleiche Derepression von *rhomboid* in ventrale Bereiche wie sie auch für *snail*<sup>-</sup> Embryonen beobachtet wurde (Nibu *et al.*, 1998b). Diese Ergebnisse weisen auf einen CtBP-vermittelten Repressionmechanismus von Snail hin. Eigene Studien hingegen haben eine Assoziation von Snail mit nukleärer HDAC-Aktivität gezeigt. Dies lässt einen HDAC-vermittelten Mechanismus der Snail-abhängigen Repression vermuten (Belz, 1998).

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der Snail-vermittelten Repression zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Beteiligung und das Zusammenspiel von Snail, CtBP und der Histon-Deacetylase HDAC1 gelegt.

# 2. Ergebnisse

Snail, ein Zinkfingertyp Transkriptionsfaktor, etabliert durch Repression spezifischer Zielgene die Mesoderm/Neuroektoderm-Grenze im frühen Drosophila Embryo (Boulay et al., 1987, Kosman et al., 1991). Mit Einsetzen der Keimbahnstreckung wird Snail in Neuroblasten detektiert und ist zusammen mit escargot und worniu verantwortlich für die Entwicklung des zentralen Nervensystems (Alberga et al., 1991, Ashraf et al., 1999). Mutationen in den beiden CtBP Interaktionsmotiven von Snail verhindern eine korrekte Funktionsweise von Snail, sowohl während der Etablierung der Mesoderm/Ektoderm-Grenze, als auch während der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Nibu et al., 1998b, Ashraf & Ip, 2001). Dies lässt vermuten, dass die Rekrutierung von CtBP ein Mechanimus der Snailvermittelten Repression ist. Eigene Studien haben dagegen gezeigt, dass Snail eine TSAsensitive Histon-Deacetylase- (HDAC) Aktivität aus embryonalem Drosophila Kernextrakt rekrutiert (Belz, 1998). Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse die Hypothese zu, dass der Repressor Snail mit CtBP und/oder einer Histon-Deacetylase interagiert, um Genexpression zu reprimieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des funktionalen Zusammenspiels von Snail mit CtBP und/oder einer bis dato uncharakterisierten Histon-Deacetylase.

# 2.1. Expression rekombinanter Proteine

Um in kontrollierter Umgebung Protein/Protein-Interaktionen untersuchen zu können, müssen die Interaktionspartner zuerst in einem geeigneten System exprimiert und anschließend gereinigt werden. Die Expression rek. Proteine erfolgte in mit rekombianten Baculoviren infizierten Insektenzellen (siehe 2.1.2.) oder in *E. coli* (siehe 2.1.1.). Zur Reinigung und Detektion wurden die Proteine als Histidin- (His), Glutathion-S-Transferase- (GST) oder FLAG- (artifzielles, acht Aminosäuren umfassendes Epitop) Fusionsproteine exprimiert und mit entsprechenden Affinitäts-Materialien gereinigt (siehe 4.6.).

Im Rahmen dieser Arbeit kamen verschiedene Snail-Fusionen (Snail-GST/C und FLAG-Snail, siehe 2.1.1.1. und 2.1.2.1.1.) zum Einsatz, da eigene Tests zeigten, dass rek. exprimiertes HDAC1-His/C (siehe 2.1.2.2.) unspezifisch mit FLAG-Agarose-Kügelchen

("FLAG-Beads" = *anti*-FLAG M2 Antikörper (*anti*-FLAG AK) auf Agarose-Kügelchen immobilisiert) interagiert. Somit war es nicht möglich, Kopräzipitationsexperimente mit rekombinatem HDAC1-His/C und auf FLAG-Beads immobilisiertem Snail durchzuführen, da durch das unspezifisch kopräzipitierte HDAC-His/C keine zuverlässigen Aussagen über eine Interaktion zwischen Snail und HDAC1 möglich waren. Alternativ wurde in diesen Experimenten Snail-GST/C eingesetzt (siehe 2.4.2.1.).

## 2.1.1. E. coli Expressionssystem

Heterologe Genexpression in E. coli ermöglicht die Herstellung großer Mengen rek. Proteine. Die Expression eukaryotischer Proteine, besonders aus Drosophila melanogaster, führt in Bakterien oftmals zu vorzeitigen Translationsabbrüchen (F. Sauer, persönliche Kommunikation). Der Grund hierfür ist, dass E. coli und Drosophila unterschiedliche Kodons für bestimmte Aminosäuren bevorzugen. Das hat zur Folge, dass die für die Expression von Drosophila Proteinen erforderlichen tRNAs in nur sehr geringer Menge in E. coli vorliegen. Dabei handelt es sich vornehmlich um die tRNAs für die Kodons AGA, AGG (Arginin) und CCC (Prolin). Diesem Umstand wurde in dieser Arbeit dadurch Rechnung getragen, dass ein E. coli Stamm verwendet wurde, der zusätzliche Gene trägt, die für die in Bakterien seltenen tRNAs codieren (BL21-Codon Plus RP; Stratagene). Der eingesetzte E. coli Stamm besitzt außerdem eine chromosomale Kopie des T7 RNA-Polymerase Gens unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren lacUV5 Promotors. Als Expressionssystem kam das pET-System der Firma Novagen zum Einsatz. Dabei stehen die zu exprimierenden Gene unter der Kontrolle des T7-Promotors, welcher nicht durch die E. coli RNA-Polymerase erkannt wird. Die Zugabe von IPTG zum Medium führt zur Expression der T7 RNA-Polymerase und somit zur Expression des Gens von Interesse.

#### 2.1.1.1. Snail-GST Fusionsprotein

Das von Smith und Johnson (1988) eingeführte 'pGEX Fusionsprotein Reinigungssystem' erlaubt eine einfache und schnelle Reinigung von rekombinant exprimierten Proteinen aus bakteriellen Lysaten. Hierzu werden Plasmide eingesetzt, die Fusionsproteine, bestehend aus einem Carboxy- (COOH) terminalen 26 kDa Fragment (GST/C) der Glutathion-S-Transferase (GST) des Parasiten *S. japonicum* und dem Protein von Interesse exprimieren. GST bindet

reversibel mit hoher Affinität an Glutathion. Unter Verwendung von an eine Matrix gekoppeltem Glutathion kann das GST-Fusionsprotein aus einem bakteriellen Zelllysat gereinigt und durch einen Überschuss von Glutathion wieder kompetetiv von der Matrix eluiert werden. Das Snail-GST-Fusionsprotein setzt sich aus volllängen Snail (390 AS, ca. 43 kDa) und dem GST/C-Fragment (26 kDa) zusammen. Das ca. 69 kDa große Fusionsprotein wurde in dieser Arbeit als "Snail-GST/C" bezeichnet.

Zur Reinigung von Snail-GST/C wurden die Bakterien einer Snail-GST/Cexprimierenden Kultur lysiert und das Lysat mit einer Glutathion-Matrix inkubiert. Durch die COOH-terminale Stellung des GST-Fusionsteils konnte nur vollständig translatiertes Fusionsprotein an die Glutathion-Matrix binden. Gebundene Proteine wurden unter Verwendung eines Überschusses an Glutathion von der Affinitäts-Matrix eluiert, ein Alliquot auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-Gel) aufgetragen und die Proteine anschließend durch Coomassie-Färbung detektiert.



Abb. 3 Affinitätsgereinigtes Snail-GST/C: Rek. Snail-GST/C, Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. In 12,5%igen SDS-Gel wurden 5 einem μΙ Molekulargewichtsmarker (Spur 1) und 0,5 µg des eluierten Snail-GST/C (Spur 2) elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung detektiert. Die graue Pfeilspitze repräsentiert proteolytisches ein Spaltprodukt von volllängen Snail-GST/C. Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links).

Snail-GST/C wurde mit einem Molekulargewicht von etwa 75 kDa detektiert. Somit liegt das detektierte Molekulargewicht signifikant höher als das berechnete (69 kDa). Ein Grund hierfür könnten postranslationale Modifikationen und der hohe Anteil an Prolin in Snail sein (siehe Diskussion, 3.1.). Neben dem volllängen Fusionsprotein wurde GST ohne Snail-Fusion exprimiert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Anwesenheit eines Startkodons im Amino- (NH<sub>2</sub>) Terminus im GST-Anteil des Snail-GST/C Fusionsproteins sein. Sollte im *snail* Gen eine rudimentäre Ribosomenbindungsstelle verborgen liegen, würde eine in Bakterien typische polycistronische mRNA entstehen, von der aus sowohl Snail-GST/C als

auch GST translatiert werden könnten. Neben Snail-GST/C und GST wurde eine dritte Bande mit etwa 55 kDa detektiert (Abb. 3, graue Pfeilspitze). Hierbei handelt es sich vermutlich um ein proteolytisches Spaltprodukt, da verkürzte Formen durch Translationsabbrüche, denen aufgrund der COOH-terminalen Stellung des GST-Anteils dieser fehlt, nicht gereinigt werden konnten. Die unspezifische Reinigung eines anderen Proteins ist weitgehend auszuschließen, da die Bande durch einen GST-spezifischen AK detektiert wurde (siehe Abb. 13A).

## 2.1.2. Baculovirus Expressionssystem

Die Verwendung eines eukaryotischen Expressionssystems bringt mehrere Vorteile mit sich. Es erlaubt die Herstellung großer Mengen löslicher volllängen Proteine aus verschiedensten Organismen, die zudem posttranslational modifiziert sind. Die Insektenzelle (*Sf9*-Zellen, *Spodoptera frugiperda*) bietet eine Umgebung, in der die überexprimierten Proteine korrekt gefaltet werden und Oligomerisation stattfinden kann, alles Vorgänge, die dazu beitragen, biologisch aktive Proteine und Protein-Komplexe zu erhalten (Summers, 1989, Davies *et al.*, 1993). Rekombinante Baculoviren wurden hergestellt, indem lineare Baculovirus-DNA mit einer lethalen Deletion und ein komplementierender Transfervektor in die Insektenzellen kotransfiziert wurden. Jeder Vektor für sich kann keine reproduktionsfähigen Viren erzeugen. Erst durch die Rekombination der beiden Plasmide in der Insektenzelle entstand ein reproduktionsfähiger Baculovirus, der das gewünschte Gen unter der Kontrolle eines späten Viruspromotors exprimierte.

#### 2.1.2.1. FLAG-Epitop markierte Proteine

Snail und CtBP wurden als NH<sub>2</sub>-terminal FLAG-Epitop markierte Proteine (FLAG-Snail, FLAG-CtBP) exprimiert. Das FLAG-Epitop ist ein artifzielles, acht Aminosäuren umfassendes Epitop, welches von *anti*-FLAG AK (Sigma) erkannt wird. Nach der Infektion von *Sf9*-Zellen mit den entsprechenden rek. Baculoviren wurden die rek. Fusionsproteine mit Hilfe von FLAG-Beads affinitätsgereinigt.

#### 2.1.2.1.1. FLAG-Snail

Das FLAG-Snail Fusionsprotein (ca. 44 kDa) setzt sich aus Snail (ca. 43 kDa) und dem NH<sub>2</sub>terminalen FLAG-Anteil (ca. 1 kDa) zusammen. In Kopräzipitationsexperimenten wurde FLAG-Snail immobilisiert auf FLAG-Beads eingesetzt (Snail-Beads, siehe 2.3., 2.4.2.2., 2.6.). Zur Herstellung der Snail-Beads wurden FLAG-Beads mit *Sf9*-Ganzzellextrakt inkubiert, der aus *Sf9*-Zellen gewonnen wurde, die mit rek. FLAG-Snail exprimierenden Baculoviren infiziert worden waren (FLAG-Snail *Sf9*-Ganzzellextrakt). Als Negativ-Kontrolle dienten in diesen Experimenten FLAG-Beads, die mit Wildtyp (WT) *Sf9*-Ganzzellextrakt (WT-*Sf9*-Ganzzellextrakt) inkubiert wurden (WT-Beads). Zur Kontrolle wurden je 5 µl der WT-Beads und Snail-Beads auf ein SDS-Gel aufgetragen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und die assoziierten Proteine durch Coomassie-Färbung detektiert.



Abb. 4 Affinitätsgereinigtes FLAG-Snail: Rek. FLAG-Snail, Coomassie gefärbtes SDS-Gel. 5 µl Marker (Spur 1) und die assoziierten Proteine von 5 µl WT-Beads (Spur 2) bzw. Snail-Beads (Spur 3) wurden auf ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetragen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch anschließende Coomassie-Färbung detektiert. Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links).

Während die FLAG-Matrix aus dem FLAG-Snail *Sf*9-Ganzzellextrakt eine Reihe von Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 43-50 kDa präzipitierte (Abb. 4, Spur 3, eckige Klammer), waren diese in der Präzipitation aus WT *Sf*9-Ganzzellextrakt nicht zu detektieren (Abb. 4, Spur 2). Der Nachweis, dass es sich bei diesen Proteinbanden um Snail handelte, erfolgte durch Western-Blot- und massenspektroskopische Analysen (Belz, 1998). Es ist möglich, dass die verschiedenen Proteinbanden unterschiedlich modifizierte Formen von Snail repräsentieren. Die zwei dominanten Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 27 kDa und 55 kDa (Abb. 4, Spuren 2 und 3) repräsentieren die leichten und schweren AK-Ketten der auf den FLAG-Beads immobilisierten *anti*-FLAG AKs. Einen Hinweis auf die korrekte Faltung des rek. exprimierten und affinitätsgereinigten FLAG-Snail Proteins ergab sich aus seiner Fähigkeit, mit dem bekannten Bindungspartner CtBP zu interagieren (siehe 2.3.).

## 2.1.2.1.2. FLAG-CtBP

Das FLAG-CtBP Fusionsprotein (ca. 43 kDa) setzt sich aus CtBP (ca. 42 kDa) und dem NH<sub>2</sub>terminalen FLAG-Anteil (ca. 1 kDa) zusammen. Um eine mögliche intrinsische enzymatische Aktivität von FLAG-CtBP untersuchen zu können (siehe 2.4.1.), wurde das Protein in nicht immobilisierter Form eingesetzt, da eine Immobilisierung auf einer Matrix den Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum behindern könnte. In Kopräzipitationsexperimenten mit embryonalem *Drosophila* Kernextrakt wurde FLAG-CtBP immobilisiert auf FLAG-Beads (CtBP-Beads) eingesetzt (siehe 2.5. und 2.6.).

Zur Herstellung der FLAG-CtBP Matrix wurden FLAG-Beads mit *Sf9*-Ganzzellextrakt inkubiert, der aus *Sf9*-Zellen gewonnen wurde, die mit rek. FLAG-CtBP exprimierenden Baculoviren infiziert worden waren (FLAG-CtBP *Sf9*-Ganzzellextrakt). Um FLAG-CtBP in nicht immobilisierter Form für Aktivitätsexperimente zu erhalten, wurde das auf der FLAG-Matrix immobilisierte Protein durch Zugabe eines Überschusses eines Peptides kompetetiv eluiert, welches das Antigen repräsentiert, gegen das der *anti*-FLAG AK gerichtet ist (FLAG-Peptid). Ein Alliquot dieses Eluates wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die eluierten Proteine durch Coomassie-Färbung detektiert (Abb. 5A). Zur eindeutigen Identifizierung des Proteins wurde ein Alliquot des FLAG-CtBP *Sf9*-Ganzzellextraktes (Abb. 5B) oder des Eluates (Abb. 5C) auf ein SDS-Gel aufgetragen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und FLAG-CtBP im Western-Blot mittels eines *anti*-FLAG und eines *anti*-CtBP Antikörpers nachgewiesen.



Abb. 5 Affinitätsreinigung von FLAG-CtBP: (A) Rek. gereinigtes FLAG-CtBP, Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. 25 ml FLAG-CtBP *Sf9*-Ganzzellextrakt wurden mit 300 µl FLAG-Beads inkubiert und gebundene Proteine mit 300 µl FLAG-Peptid-haltigem Puffer (1 mg/ml) eluiert. 5 µl Marker (Spur 1) und 5 µl Eluat (Spur 2) wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Färbung detektiert. Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links). (B+C) Western Blot Analyse von rek. FLAG-CtBP mit *anti*-FLAG AK bzw. *anti*-CtBP AK. Auf ein 10%iges SDS-Gel wurden 3 µl FLAG-CtBP *Sf9*-Ganzzellextrakt (B) oder 80 ng des affinitätsgereinigten FLAG-CtBP (C) aufgetragen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. FLAG-CtBP wurde durch Western-Blot Analyse mittels *anti*-FLAG (B) bzw. *anti*-CtBP (C) detektiert (ECL-Detektion, siehe Mat. und Meth.). Die Expositionszeit der Filme auf der Membran betrug 10 Sek (B) bzw. 30 Sek (C). Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links).

Von der mit FLAG-CtBP *Sf9*-Ganzzellextrakt inkubierten Flag-Matrix wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 48 kDa eluiert (Abb. 5A). Im FLAG-CtBP *Sf9*-Ganzzellextrakt detektierte der *anti*-FLAG AK ein Protein mit etwa dem gleichen Molekulargewicht (Abb. 5B). Das affinitätsgereinigte Protein wurde durch einen spezifischen *anti*-CtBP AK ebenfalls mit etwa 48 kDa detektiert (Abb. 5C). Damit handelt es sich bei dem eluierten Protein um CtBP. Das Molekulargewicht von CtBP beträgt rechnerisch ca. 42 kDa und ist somit geringer als das des detektierten Proteins. Diese Beobachtung lässt sich auf eventuelle posttranslationale Modifikationen des rek. CtBP's in den *Sf9*-Zellen zurückführen (siehe Diskussion, 3.1.).
#### 2.1.2.2. HDAC1-His/C

Um eine eventuelle Interaktion zwischen rek. exprimiertem Snail und rek. HDAC1 zu analysieren (siehe 2.4.2.1.), wurden beide Proteine in gereinigter Form benötigt. Das in dieser Arbeit eingesetzte poly-Histidin-HDAC1-Fusionsprotein (ca. 59 kDa) setzt sich aus Drosophila HDAC1 (ca. 58 kDa) und einem Histidin-Epitop, das aus sechs Histidin-Resten besteht (ca. 0,8 kDa), zusammen. HDAC1 wurde COOH-terminal mit dem Histidin-Epitop fusioniert, da eine NH<sub>2</sub>-terminale Fusion die Aktivität der rek. Histon-Deacetylase dramatisch reduziert (J.T. Kadonaga, persönliche Mitteilung). Somit ist davon auszugehen, dass eine Fusion die damit möglicherweise NH<sub>2</sub>-terminale Struktur und auch die Bindungscharakteristik gegenüber potentiellen Interaktionspartnern verändert. Aufgrund der COOH-terminalen Stellung des Histidin-Epitops im Fusionsprotein wurde dieses im Verlauf dieser Arbeit als "HDAC1-His/C" bezeichnet. Bei der Reinigung Histidin-Epitop markierter Proteine macht man sich die Eigenschaft von poly-Histidin zunutze, zweiwertige Metallionen wie z.B. Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> konformationsunabhängig zu binden. Da Imidazol Bestandteil der Struktur von Histidin ist, wird es im Überschuss verwendet, um die Histidin-Fusionsproteine kompetetiv von der verwendeten Metallionen-Matrix zu eluieren.

Zur partiellen Reinigung von HDAC1-His/C wurde *Sf9*-Ganzzellextrakt von *Sf9*-Zellen, die mit HDAC1-His/C exprimierenden Baculoviren infiziert worden waren, auf eine mit Nickelionen beladene Metall-Chelat-Affinitäts Säule aufgetragen (Amersham). Auf der Säule immobilisiertes HDAC1-His/C wurde mit Imidazol eluiert und ein Alliquot des Eluates mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine durch Coomassie-Färbung detektiert.



**Abb. 6** Affinitätsgereinigtes HDAC1-His/C: Rek. HDAC1-His/C, Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. 25 ml HDAC1-His/C *Sf9*-Ganzzellextrakt wurden auf eine 1 ml mit Ni<sup>2+</sup>-gesättigte Metall-Chelat-Affinitäts Säule (HiTrap Chelating HP, Amersham) aufgetragen und gebundenes HDAC1-His/C anschließend mit Imidazol-haltigem Puffer eluiert. 5 µl Marker (Spur 1) und 2,5 µg eluiertes HDAC1-His/C (Spur 2) wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Färbung detektiert. Die grauen Pfeilspitzen repräsentieren *alpha*- und *beta*-Tubulin und Hsp60. Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links). Das HDAC1-His/C Fusionsprotein wurde durch die Metall-Affinitäts-Chromatographie nur partiell gereinigt. Neben HDAC1-His/C wurden drei Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 65 kDa, 58k Da und 57 kDa in nicht stöchiometrischer Menge gereinigt (Abb. 6, zwei graue Pfeilspitze, die untere repräsentiert eine Doppelbande). Um auszuschließen, dass es sich bei den Verunreinigungen um Sf9-Proteine handelt, die homolog zu bekannten Interaktionspartner von HDAC1 in *Drosophila* sind, wurden diese durch eine massenspektroskopische Analyse identifiziert. Es handelte sich dabei um die Mikrotubuli Bausteine alpha- und beta-Tubulin und das Hitzeschockprotein Hsp60. Alle drei Proteine kommen in Zellen in sehr großen Mengen vor. Die Tubulin-Moleküle machen in manchen eukaryotischen Zellen 10-20% der Gesamtmenge des löslichen Proteins aus (Alberts et al., 1997). Die nicht stöchiometrische und geringe Menge der kogereinigten Proteine lässt vermuten, dass es sich um unspezifische Kontaminanten handelt. Im Gegensatz zum errechneten Molekulargewicht von etwa 59 kDa, zeigt HDAC1-His/C im SDS-Gel ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa. Dieses Phänomen entspricht dem publizierten Laufverhalten des rek. Fusionsproteins und dem des endogenen HDAC1 (siehe Abb. 14 und 15) und ist unter Umständen auf postranslationale Modifikationen zurückzuführen (Huang & Kadonaga, 2001).

#### 2.1.2.2.1. Intrinsische Histon-Deacetylase-Aktivität von HDAC1-His/C

Protein/Protein Interaktionen basieren auf physikalischen Wechselwirkungen zwischen spezifischen Aminosäureresten der Interaktionspartner. Somit ist die dreidimensionale Struktur der Proteine für deren Wechselwirkungen von essentieller Bedeutung. Eine direkte Kontrolle des dreidimensionalen Zustandes eines Proteins entzieht sich normalerweise einem einfachen experimentellen Zugang. Um einen Hinweis auf die korrekte Strukur rek. exprimierter und chromatographisch gereinigter Proteine zu erhalten, kamen in dieser Arbeit zwei Methoden zum Einsatz. Zum einen wurde die Interaktion des betreffenden Proteins mit einem bekannten Interaktionspartner untersucht (siehe 2.3., Interaktion zwischen Snail und CtBP), zum anderen wurde die intrinsische enzymatische Aktivität der Histon-Deacetylase HDAC1 als "interne" Kontrolle für die korrekte Faltung von HDAC1-His/C verwendet. Bleibt die intrinsische Aktivität im rek. Protein erhalten, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es nicht nur im aktiven Zustand, sondern auch korrekt gefaltet vorliegt.

Im HDAC-Assay (siehe 4.8.) wurde rek. HDAC1 mit einem <sup>3</sup>H-markiertem H4-Peptid (Rinder H4, AS 1-24) inkubiert und die freigesetzten, radioaktiv markierten Acetylreste quantifiziert. Um sicherzustellen, dass es sich weder um eine rein chemische, nicht enzymatisch vermittelte noch durch eine unspezifische Deacetylase vermittelte Deacetylierung handelte, wurde der Histon-Deacetylase spezifische Inhibitor Trichostatin A (TSA) eingesetzt.



Abb. 7 Intrinsische HDAC-Aktivität von HDAC1-His/C: HDAC-Assay mit rek. HDAC1-His/C. Etwa 5 μg rek. HDAC1-His/C oder Puffer ohne Protein wurden im Standard HDAC-Assay mit acteyliertem Histon H4-Peptid (AS 1-24, 50.000 DPM) mit oder ohne TSA (40 nM) eingesetzt.

Der HDAC-Assay mit HDAC1-His/C zeigte, dass das gereinigte Protein intrinsische Histon-Deacetylase-Aktivität besitzt (Abb. 7). Da der Einsatz von TSA die Aktivität auf Hintergrundniveau reduzierte und HDAC1 TSA sensitiv ist, handelt es sich bei der gemessenen Aktivität um eine spezifische HDAC1-Aktivität. Eine nicht Enzym-vermittelte Reaktion kann somit ausgeschlossen werden. Die funktionale enzymatische Aktivität ist ein Hinweis auf die korrekte Faltung des gereinigten Proteins.

## 2.2. Gewinnung eines Snail-spezifischen Antikörpers

Um *in vivo* eine Interaktion zwischen Snail und HDAC1 untersuchen zu können (siehe 2.4.2.3.), wurde ein Antikörper gegen Snail in Kaninchen erzeugt.

#### 2.2.1. Snail-Antigen, His-Snail-1/253

Das 390 AS umfassende Snail Protein enthält eine COOH-terminale DNA-Bindungsdomäne, die fünf Zinkfinger beinhaltet (AS 245-390) und eine NH2-terminale Repressor-Domäne ((AS 1-244), Boulay et al., 1987, Gray & Levine, 1996a). Da Zinkfinger strukturell und phylogenetisch hochkonserviert sind und höhere Eukaryoten viele Zinkfingerproteine besitzen, eignet sich die Zinkfinger-Domäne nicht als Antigen. Als Antigen wurden die NH2terminalen 253 AS (Snail-1/253, ca. 27 kDa) ausgewählt. Zur einfacheren Reinigung von Snail-1/253 wurde es als poly-Histidin-Fusionsprotein mit zehn Histidin-Resten am NH<sub>2</sub>terminalen Ende exprimiert (His-Snail-1/253, ca. 30 kDa). Um Verunreinigungen des Antigens durch unspezifisch assoziierte bakterielle Proteine auszuschließen, wurde der erste denaturierenden Bedingungen durchgeführt, Reinigungsschritt unter die jegliche Protein/Protein Wechselwirkung und unspezifische Interaktionen mit der Chelating-Matrix unterbanden.

Um die Proteine zu denaturieren, wurden die His-Snail-1/253 exprimierenden Bakterien in einem Guanidiniumchlorid-haltigen Puffer lysiert. Das denaturierte Lysat wurde auf eine mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen gesättigte 'Chelating Sepharose Fast Flow' (Amersham) Säule aufgetragen und gebundene Proteine mit Hilfe von Imidazol-haltigem Puffer eluiert. Die eluierten Proteine wurden durch Dialyse gegen Arginin-haltigen Puffer renaturiert und auf eine Anionentauscher-Säule (Hi Trap Sepharose Q Fast Flow, Amersham) aufgetragen. Gebundene Proteine wurden durch einen steigenden Salzgradienten eluiert und durch Verwendung einer Entsalzungssäule (Hi Prep 26/10 Desalting Column, Amersham) in einen neutralen, für die Immunisierung geeigneten Puffer überführt. Zur Identifizierung des gereinigten Proteins wurde eine *anti*-His AK Western-Blot Analyse durchgeführt.



Abb. 8 Denaturierende Reinigung von His-Snail-1/253: (A) Eluatfraktionen der Ni<sup>2+</sup>-Chelating Coomasie-gefärbtes SDS-Gel. His-Snail-1/253 exprimierende Bakterien wurden in Säule. Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer lysiert. Das Lysat wurde auf eine 25 ml Chelating Sepharose Fast Flow' Säule aufgetragen, die gebundenen Proteine mit Hilfe eines Imidazol-haltigen Puffers eluiert und das Eluat in 10 ml Fraktionen gesammelt. 5 µl Molekulargewichtsmarker (M) und 5 µl Eluat pro Fraktion (Fraktionen 1-19, D=Durchlauf) wurden in 12,5%igen SDS-Gelen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Färbung detektiert. Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links). (B) Anti-His AK Western-Blot Analyse des partiell gereinigten His-Snail-1/253. 1 µl des Eluates der Fraktion 5 (A) wurde in einem 12,5% igen SDS-Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine NC-Membran transferiert und mittels anti-His AK durch Western-Blot Analyse detektiert (AP-Detektion, siehe Mat. und Meth.). Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links). (C) Gereinigtes His-Snail-1/253, Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. 5 µl Molekulargewichtsmarker (Spur 1) und etwa 0,8 µg gereinigtes His-Snail-1/253 (Spur 2) wurden in einem 12,5% igen SDS-Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert. Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links).

Vergleicht man den Durchlauf der 'Chelating Sepharose Fast Flow' Säule (Abb. 8A, "D") mit den Eluatfraktionen (Abb. 8A, Fraktionen 1-19) erkennt man eine starke Anreicherung des His-Snail-1/253 Fusionsproteins in den Fraktionen 5-19. Während die Fraktionen 5-10 noch beträchtliche Mengen an kontaminierenden Proteinen enthielten, waren die Fraktionen 11-14 schon annähernd kontaminationsfrei. Die Fraktionen 15-19 enthielten neben His-Snail-1/253 keine weiteren durch Coomassie-Färbung detektierbaren Proteine (Abb. 8A). Ein anti-His AK Western-Blot mit Fraktion 5 (Abb. 8B) zeigte, dass His-Snail-1/253 in dieser Fraktion als Doppelbande von der 'Chelating Sepharose Fast Flow' Säule eluierte. Dies ist bis etwa Fraktion 9 zu beobachten, danach war nur eine Bande zu detektieren. Möglicherweise handelt es sich bei der kleineren Bande um ein proteolytisches Spaltprodukt oder ein Fragment, das durch Translationsabbrüche entstanden ist und eine unterschiedliche Affinität zur verwendeten Matrix als das volllängen Produkt besitzt. Die Fraktionen 15-19 wurden vereinigt und nach Renaturierung durch Dialyse durch einen starken Anionentauscher weiter gereinigt und konzentriert. Abb. 8C zeigt das vollständig gereinigte Antigen, wie es zur Immunisierung der Kaninchen eingesetzt wurde. His-Snail-1/253 zeigte in der SDS-PAGE ein Laufverhalten wie ein Protein mit etwa 38 kDa, obwohl das errechnete Molekulargewicht bei ca. 29 kDa liegt. Diese Abweichung ist unter Umständen auf den sehr hohen Prolingehalt von etwa 9,5% im Protein zurückzuführen (siehe Diskussion 3.1.). Nach der Immunisierung des Kaninchens und Erhalt des Serums (His-Snail-1/253 Serum) wurde der Snail-spezifische AK mit Hilfe von immobilisiertem His-Snail-1/253 Antigen aus dem Serum angereichert (siehe 2.2.2.).

#### 2.2.2. Reinigung des anti-Snail Antikörpers aus Kaninchen-Serum

Um AK in Immunopräzipitationen einsetzen zu können ist es von Vorteil, den AK affinitätschromatographisch zu reinigen, um so unspezifische, im Serum enthaltene AK zu entfernen.

Dazu wurde das gereinigte His-Snail-1/253 Protein auf 'Sulfo Link® Coupling Gel' (Pierce) immobilisiert. Diese aktivierte Matrix bindet kovalent Thiolgruppen und damit His-Snail-1/253 über einen der fünf im Protein enthaltenen Cysteinreste. Um die Kopplungseffizienz der Immobilisierung des Antigens abschätzen zu können, wurde ein Alliquot der Kopplungsreaktion vor und nach der Reaktion auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine durch Commassie-Färbung detektiert. Anschließend wurde das Serum des immunisierten Kaninchens mit der Antigenmatrix inkubiert, die Matrix gewaschen und spezifisch gebundene AK pH-abhängig in Fraktionen eluiert. Alliquots der eluierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Färbung detektiert. Um die Spezifität des gereinigten AK zu untersuchen, wurden Western-

А В Walter topung ung Pool M #1 #2 #3 #4 #5 #6 #7 #8 #9 #10 #11 #12 175,0 175,0 83,0 83,0 62,0 62,0 Schwere AK-Kette 47,5 47,5 His-Snail-1/253 32.5 32,5-1 2 3



Blot Analysen mit

durchgeführt.

Abb. 9 Affinitätsreinigung des anti-Snail AK: (A) His-Snail-1/253 Antigen, Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. 5 µl Molekulargewichtsmarker (Spur 1) und 0,8 µg bis zur Homogenität gereinigtes His-Snail-1/253 Antigen wurde vor (Spur 2) und nach der Kopplung (Spur 3) auf 'Sulfo Link® Coupling Gel'auf einem 12,5%igen SDS-Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert. Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links) (B) Affinitätsgereinigter anti-Snail AK, Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. 5 ml Serum wurden mit 200 µl His-Snail-1/253 beladenem 'Sulfo Link® Coupling Gel' inkubiert und die gebundenen AK anschließend mit 2 ml Puffer (pH 2,5) in 170 µl Fraktionen eluiert (Fraktionen 1-12). 5 µl Marker (M) und je 10 µl der Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Färbung detekiert. Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links). (C) Anti-Snail- und anti-FLAG AK Western Blot mit affinitätsgereinigtem FLAG-Snail. In einem 12,5% igen SDS-Gel wurden je ca. 100 ng partiell gereinigtes FLAG-Snail Protein (siehe Abb. 4) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine NC-Membran transferiert. Die

affinitätsgereinigtem FLAG-Snail (siehe Abb. 4) als Antigen

Proteine wurden mit Hilfe eines anti-FLAG AK (1:2000, Spur 1) und des gereinigten anti-Snail AK (1:100.000, Spur 2) analysiert (ECL-Detektion, siehe Mat. und Meth.). Die Expositionszeiten der Filme auf der Membran sind in der Abb. angegeben.

Vor der Zugabe des 'Sulfo Link® Coupling Gel' zu der His-Snail-1/253 Proteinlösung konnte das Protein durch Coomassie-Färbung detektiert werden (Abb. 9A, Spur 2). Nach der Zugabe der "aktivierten" Matrix zu der Proteinlösung war kein Protein mehr im Überstand nachzuweisen (Abb. 9, Spur 3). Das bedeutet, dass His-Snail-1/253 nahezu vollständig auf dem 'Sulfo Link® Coupling Gel' immobilisiert wurde. Nach der Inkubation der beladenen Antigenmatrix mit dem His-Snail-1/253 Kaninchenserum und der pH-abhängigen Elution der Proteine von der Antigenmatrix konnte in den Eluaten ein 55 kDa Protein nachgewiesen werden, das der schweren Kette des *anti*-Snail AK entspricht (Abb. 9B). Die antikörperhaltigen Fraktionen 4-12 (Abb. 9B) wurden gepoolt und in dieser Arbeit im Weiteren als "*anti*-Snail AK" eingesetzt. Die Spezifitätsuntersuchung durch Western-Blot Analyse zeigte, dass sowohl der *anti*-FLAG AK (Abb. 9C, Spur 1) als auch der *anti*-Snail AK (Abb. 9C, Spur 2) FLAG-Snail spezifisch detektierten.

### 2.3. Untersuchungen zur Interaktion von Snail und CtBP

CtBP wurde sowohl in einem 'yeast-two-hybrid screen' als auch in Protein/Protein Bindungsexperimenten unter Verwendung von *in vitro* exprimiertem Snail und bakteriell exprimiertem CtBP als Interaktionspartner von Snail identifiziert (Nibu *et al.*, 1998a). Weiterhin wurde gezeigt, dass die beiden Proteine im frühen und späten *Drosophila* Embryo in einem funktionalem Zusammenhang stehen (Nibu *et al.*, 1998b, Ashraf & Ip, 2001). Kopräzipitationsexperimente mit Snail und embryonalem *Drosophila* Kernextrakt zeigten eine physikalische Interaktion von Snail und CtBP im Zellkern der Taufliege (Belz, 1998). Einerseits, um diese Ergebnisse zu bestätigen, andererseits, um den in dieser Arbeit eingesetzten *anti*-CtBP AK, den verwendeten Kernextrakt und FLAG-Snail (siehe Abb. 4) auf Ihre Funktionalität hin zu überprüfen, wurden Kopräzipitationsexperimente mit rek. Snail und embryonalem Kernextrakt durchgeführt. Dazu wurde immobilisiertes FLAG-Snail (siehe 2.1.2.1.1.) mit Kernextrakt inkubiert, die kopräzipitierten Proteine auf einem SDS-Gel durch SDS-PAGE aufgetrennt und assoziiertes endogenes CtBP mittels eines *anti*-CtBP AK detektiert. Als Kontrolle wurden WT-Beads (siehe 2.1.2.1.1.) mit Kernxtrakt inkubiert.



Abb.10 Kopräzipitation von endogenem CtBP mit FLAG-Snail aus embryonalem Drosophila Kernextrakt: Anti-CtBP AK Western-Blot. Je 10 µl WT- (Spur 1) oder Snail-Beads (Spur 2) wurden mit 200 µl Kernextrakt inkubiert und die mit jeweils 1 µl Beads assoziierten Proteine auf ein 10% iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine NC-Membran transferiert und CtBP mit Hilfe eines anti-CtBP AK (1:50.000) detektiert (ECL-Detektion). Die Expositionszeit des Films auf der Membran betrug ca. 10 Sek. Das Molekulargewicht der Standardproteine des Molekulargewichtsmarkers ist in kDa angegeben (links).

Die Snail-Beads kopräzipitierten ein Protein aus embryonalem *Drosophila* Kernextrakt (Abb. 10, Spur 2), das durch den *anti*-CtBP AK detektiert wurde und dem errechneten Molekulargewicht von CtBP (ca. 42 kDa) entspricht, während die WT-Beads ein solches Protein nicht kopräzipitierten (Abb. 10, Spur 1). Vergleicht man das Molekulargewicht des in diesem Experiment durch FLAG-Snail rekrutierten endogenen CtBP's (Abb. 10, Spur 2) mit dem des rek. exprimierten und gereinigten FLAG-CtBP (siehe Abb. 5), fällt ein signifikanter Unterschied in den Molekulargewichten auf, der nicht alleine durch die Anwesenheit des etwa 1 kDa großen FLAG-Epitops in FLAG-CtBP erklärt werden kann. Während das aus *Sf*9-Zellen gewonnene rek. FLAG-CtBP ein Molekulargewicht von etwa 48 kDa besitzt (siehe Abb. 5), weist das durch FLAG-Snail kopräzipitierte enodgene CtBP (Abb. 10) ein Molekulargewicht des rek. und endogenen CtBP's und dieser Diskrepanz zwischen dem Molekulargewicht des rek. und endogenen CtBP AK detektierten Proteins wurde das putative CtBP Protein massenspektroskopisch untersucht.

Da hierzu Coomassie-gefärbte Proteinbanden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten werden müssen bietet sich eine zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese an. Diese ermöglicht die Darstellung komplexer Proteingemische auf einem Gel und produziert konzentrierte "Proteinpunkte" (Protein-Spots), die leicht ausgeschnitten werden können. In der 2D-Gelelektrophorese werden die Proteine nach zwei unterschiedlichen Parametern, ihrem isoelektrischen Punkt und der elektrophoretischen Beweglichkeit (Molekulargewicht), aufgetrennt. Immobilisiertes FLAG-Snail wurde mit embryonalem Kernextrakt oder Puffer (Negativkontrolle) inkubiert und die rekrutierten Proteine einer isoelektrischen Fokussierung mit Hilfe eines immobilisierten pH-Gradienten (Immobiline Dry Strip pH 3-10, Amersham) in einem elektrischen Feld unterzogen. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht in einem SDS-Gel. Nach der Commassie-Färbung (kolloidales Coomassie, Novex) wurden Proteinpunkte, die dem in Abb. 10 ermittelten putativen Molekulargewicht von endogenem CtBP entsprachen und in der Negativkontrolle (nicht gezeigt) nicht zu detektieren waren, aus dem Gel ausgeschnitten, partiell proteolytisch verdaut und massenspektroskopisch analysiert.



Abb. 11 2D-Gelektrophorese Snail-assoziierter Proteine: Coomassie-gefärbtes 2D-SDS-Gel. Je 250 µl Snail-Beads (siehe Abb. 4) wurden mit 7,5 ml Kernextrakt oder 7,5 ml Puffer inkubiert (gezeigt hier nur Snail-Beads inkubiert mit Kernextrakt). Die an die Beads gebundenen Proteine wurden zuerst einer isoelektrischen Fokussierung unterzogen, dann in einem 10%igen SDS-Gel durch SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und durch Färbung mit kolloidalem Coomassie detektiert. Die Pfeilspitzen repräsentieren CtBP. Das Molekulargewicht der Standardproteine des Molekulargewichtsmarkers ist in kDa angegeben (links).

Alle analysierten Banden (Abb. 11, Pfeilspitzen) mit einem Molekulargewicht von etwa 42 kDa repräsentierten CtBP (GenBank NCBI: gi|2982719). Die gegebene Varianz in Bezug auf das Molekulargewicht und den isoelektrischen Punkt lässt vermuten, dass das Protein im *Drosophila* Embryo unterschiedlich modifiziert vorliegt (siehe Diskussion, 3.1., Phosphorylierung von CtBP). Denkbar ist auch, dass die Proteine unterschiedliche 'Splice'-Varianten von CtBP darstellen (siehe Diskussion, 3.1.). Im Gegensatz zu Abb. 10 wurde hier ein SDS-Gel mit bedeutend längerer Trennstrecke verwendet, was erklären könnte, warum die unterschiedlichen CtBP Populationen bezüglich des Molekulargewichtes aufgelöst werden konnten. Dieses Ergebniss bestätigt die Resultate aus Abb. 10 und zeigt, dass endogenes CtBP ein vom rek. exprimierten FLAG-CtBP (siehe Abb. 5) abweichendes Laufverhalten zeigt.

Zusammenfassend bestätigen die Kopräzipitationsexperimente aus 2.3., dass FLAG-Snail endogenes CtBP aus *Drosophila* Kernextrakt rekrutiert. Dies ist gleichzeitig ein Hinweis auf die korrekte Faltung des gereinigten FLAG-Snail Fusionsproteins.

## 2.4. Identifikation einer Snail-assoziierten HDAC-Aktivität

Eigene 'Untersuchungen zur Assoziation von Repressoren der Transkription aus *Drosophila melanogaster* mit Histon-Deacetylase-Aktivität' (Belz, 1998) zeigten eine Assoziation von nukleärer HDAC-Aktivität mit dem transkriptionalen Repressor Snail. In den folgenden Experimenten sollte die Snail-assoziierte HDAC-Aktivität identifiziert werden.

#### 2.4.1. CtBP als Snail-assoziierte Histon-Deacetylase?

Durch die funktionale (Nibu *et al.*, 1998b) und physikalische Interaktion (siehe 2.3.) von Snail und CtBP und eines enzymatischen Motivs mit bis heute ungeklärter Aktivität in CtBP (Schaeper *et al.*, 1995) bietet sich CtBP als evtl. Snail-assoziierte HDAC-Aktivität an.

Um zu überprüfen, ob CtBP intrinsische HDAC-Aktivität besitzt, wurde ein <sup>3</sup>Hmarkiertes H4-Peptid (siehe 2.1.2.2.1.) mit rek. CtBP (siehe Abb. 5) oder mit Puffer inkubiert, die freigesetzten Acetylreste aus der Reaktion extrahiert und im Szintillationszähler quantifiziert. Da Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) als Kofaktor für die HDAC-Aktivität von SIR2 bekannt ist (Imai *et al.*, 2000), wurde die Reaktion in An- und Abwesenheit von NAD durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde Kernextrakt eingesetzt.



**Abb. 12 Intrinsische HDAC-Aktivität von CtBP:** HDAC-Assay mit rek. FLAG-CtBP. Pro Reaktion wurden 4 µl H4-Peptid (20.000 DPM/µl), 0,5 µg FLAG-CtBP (siehe Abb. 5), 200 µl Kernextrakt und 1 mM NAD eingesetzt.

FLAG-CtBP zeigte in diesem Experiment keine intrinsische HDAC-Aktivität, weder in Annoch in Abwesenheit von NAD (Abb. 12). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass CtBP keine intrinsische HDAC-Aktivität besitzt. Alternativ könnten dieses Resultate darauf hinweisen, dass die putative CtBP HDAC-Aktivität die Gegenwart zusätzlicher Faktoren benötigt, die im verwendeten Versuchsansatz nicht vorhanden waren.

#### 2.4.2. Snail assoziiert mit HDAC1

Da, wie in 2.4.1. gezeigt, CtBP keine HDAC ist, muss die mit Snail assoziierte HDAC-Aktivität auf andere Proteine zurückgeführt werden. Neben einer Vielzahl nicht identifizierter Proteine kommen hier vor allem die in Drosophila identifizierten HDACs in Betracht. Derzeit sind in Drosophila nur zwei Klasse I, eine Klasse II und eine Klasse III HDAC charakterisiert, dRPD3 (HDAC1) und HDAC3 als Klasse I, HDAC6 als Klasse II und SIR2 als Klasse III HDACs (De Rubertis et al., 1996, Johnson et al., 1998, Barlow et al., 2001). HDAC1 wurde ursprünglich als 'position-effect variegation' (PEV) -Regulator entdeckt und ist homolog zu HDAC1 aus Mensch und Hefe (De Rubertis et al., 1996). HDAC3 wurde durch eine Datenbanksuche nach HDAC1-ähnlichen Sequenzen identifiziert und ist zu 58,1% identisch mit HDAC1 (Johnson et al., 1998). HDAC6 und SIR2 sind im Gegensatz zu HDAC1 und HDAC3 nicht TSA-sensitiv und scheiden somit als mögliche Snail-assoziierte HDAC-Aktivitäten aus, da diese TSA sensitiv ist (Belz, 1998, Barlow et al., 2001). Immunopräzipitationsexperimente mit FLAG-Snail und embryonalem Drosophila Kernextrakt mit anschließender anti-HDAC3 AK Western-Blot Analyse machen eine Interaktion von Snail und HDAC3 unwahrscheinlich (nicht gezeigt). Im Folgenden wurde daher eine evtl. Interaktion zwischen Snail und HDAC1 untersucht.

#### 2.4.2.1. Kopräzipitation von rek. HDAC1 mit rek. Snail

Um eine Interaktion von Snail und HDAC1 *in vitro* zu testen, wurden Protein/Protein Interaktionsstudien mit rek. Snail (siehe 2.1.1.1.) und rek. HDAC1 (siehe 2.1.2.2.) durchgeführt.

Hierzu wurde bakteriell exprimiertes Snail-GST/C Fusionsprotein (siehe Abb. 3) mit rek. in *Sf*9-Zellen exprimiertem und partiell gereinigtem HDAC1-His/C (siehe Abb. 6) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde anstelle von Snail-GST/C nur GST eingesetzt. Durch Zugabe von Glutathion-Sepharose (Amersham) wurde Snail-GST/C (Snail-GST/C-Beads) oder GST (GST-Beads) und assoziierte Proteine präzipitiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Mit Hilfe eines *anti*-His AK wurde analysiert, ob HDAC1-His/C mit Snail-GST/C bzw. GST kopräzipitiert wurde. Als Kontrolle wurde ein *anti*-GST AK (Sigma) Western-Blot durchgeführt um sicherzustellen, dass die Glutathion-Sepharose mit Snail-GST/C bzw. GST beladen war.



Abb. 13 Interaktion von rek. Snail mit rek. HDAC1: Etwa 2 µg HDAC1-His/C (siehe Abb. 6) wurden mit je 1 µg Snail-GST/C (siehe Abb. 3) oder GST inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Glutathion-Sepharose (Amersham) zugegeben, um mit Snail-GST/C bzw. GST assoziierte Proteine zu präzipitieren. 5 µl Marker (Spur 1), Snail-GST/C und assoziierte Proteine (Spur 2) bzw. GST und assoziierte Proteine (Spur 3) wurden auf ein 12,5%iges (A) bzw. 10% iges (B) SDS-Gel aufgetragen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. (A) Snail-GST/C (Spur 1) bzw. GST (Spur 2) wurden mittels Western-Blot Analyse mit Hilfe eines *anti*-GST AK detektiert (AP-Detektion, siehe Mat. und Meth.). Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links). (B) HDAC1-His/C wurde mittels Western-Blot Analyse mit Hilfe eines *anti*-His AK detektiert (AP-Detektion, siehe Mat. und Meth.). Das Molekulargewicht der Standardproteine ist in kDa angegeben (links).

Der *anti*-GST AK Western-Blot zeigt, dass sowohl die Snail-GST/C-Beads (Abb. 13A, Spur 2) als auch die GST-Beads (Abb. 13A, Spur 3) mit etwa der gleichen Menge Protein beladen waren. Neben dem volllängen Protein wurden Fragmente von Snail-GST/C detektiert (Abb. 13A, Spur 2 (eckige Klammer) und 2.1.1.1). Auf dem *anti*-His AK Western-Blot ist zu erkennen, dass Snail-GST/C ein Protein kopräzipitiert (Abb. 13B, Spur 2), das durch den *anti*-His AK detektiert wurde und das dem Molekulargewicht von HDAC1-His/C entspricht, während dieses Protein durch GST nicht kopräzipitiert wurde (Abb. 13B, Spur 3). Da in diesem Ansatz kein anderes Protein durch den *anti*-His-AK detektiert werden konnte, und da das Molekulargewicht des detektierten Proteins mit dem von HDAC1-His/C übereinstimmt (siehe Abb. 6), handelt es sich bei dem kopräzipitierten Protein um HDAC1-His/C. Da, wie Abb. 13A zeigt, sowohl die Snail-GST/C- als auch die GST-Beads mit etwa der gleichen Menge Protein beladen waren, wurde die Rekrutierung von HDAC1-His/C durch Snail und nicht durch den GST-Anteil vermittelt. Geht man davon aus, dass die mit HDAC1-His/C aus *Sf*9-Zellen kogereinigten Mikrotubuli-Bausteine *alpha*- und *beta*-Tubulin und das

Hitzeschockprotein Hsp60 (siehe 2.1.2.2.) nicht an der Bindung zwischen Snail und HDAC1 beteiligt sind, handelt es sich hierbei um eine direkte Interaktion.

Diese Resultate lassen eine direkte Interaktion zwischen Snail und HDAC1 vermuten.

#### 2.4.2.2. Kopräziptiation von endogenem HDAC1 mit rek. Snail

Im vorhergehenden Experiment 2.4.2.1. wurde gezeigt, dass rek. Snail und HDAC1 interagieren. Die Tatsache, dass in dieser Untersuchung rek. exprimierte und gereinigte Proteine eingesetzt wurden, stützt die Vermutung, dass es sich um eine direkte Wechselwirkung handelt. Um Aufschluss über eine evtl. Interaktion von Snail auch mit endogenem HDAC1 zu erhalten, wurden Interaktionsstudien mit aus *Sf*9-Zellen gereinigtem rek. Snail und embryonalem *Drosophila* Kernextrakt durchgeführt.

Hierzu wurden Snail-Beads bzw. WT-Beads (siehe 2.1.2.1.1.) mit embryonalem *Drosophila* Kernextrakt inkubiert. Da das verwendete FLAG-Snail in *Sf*9-Zellen exprimiert und aus dem Extrakt dieser Zellen auf FLAG-Beads immobilisiert wurde, musste zusätzlich überprüft werden, ob nicht schon das affinitätsgereinigte, immobilisierte FLAG-Snail mit einem *anti*-HDAC1 AK immunoreaktiven Protein aus *Sf*9-Zellen assoziiert war. Dazu wurden Snail-Beads bzw. WT-Beads mit Puffer inkubiert. Die mit den Snail- bzw. WT-Beads kopräzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Assoziiertes HDAC1 wurde durch Einsatz eines *anti*-HDAC1 AK detektiert. Als Positivkontrolle wurde rek. exprimiertes und gereinigtes HDAC1-His/C (siehe Abb. 6) eingesetzt.



Abb. 14 Interaktion von endogenem HDAC1 mit rek. Snail: Anti-HDAC1 Western Blot Snail-assoziierter Kernextraktproteine. Je 10 µl WT-Beads bzw. Snail-Beads (siehe Abb. 4) wurden mit 200 µl Puffer (Spuren 1 und 2) oder Kernextrakt (Spuren 3 und 4) inkubiert und die kopräzipitierten Proteine und 50 ng rek. HDAC1 (Spur 5,) mittels SDS-PAGE auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine NC-Membran transferiert und HDAC1 mit Hilfe eines anti-HDAC1 AK im Western-Blot detektiert (ECL-Detektion). Die Expositionszeit des Films auf der Membran betrug ca. 30 Sek. Das Molekulargewicht der Standardproteine des Molekulargewichtsmarkers ist in kDa angegeben (links).

Ergebnisse

Die mit Puffer inkubierten WT- (Abb. 14, Spur 1) und Snail-Beads (Abb. 14, Spur 2) zeigten im *anti*-HDAC1 AK Western-Blot kein signifikantes Signal. Das bedeutet, dass weder die WT- noch die Snail-Beads vor der Inkubation mit embryonalem *Drospohila* Kernextrakt mit HDAC1 assoziiert waren. Aus Kernextrakt dagegen kopräzipitierten die FLAG-Snail beladenen Beads ein *anti*-HDAC1 AK immunoreaktives Protein (Abb. 14, Spur 4) mit dem Molekulargewicht von rek. HDAC1 (Abb. 14, Spur 5). Dieses Protein wurde von den WT-Beads nicht kopräzipitiert (Abb. 14, Spur 3). Dieses Experiment zeigt, dass rek. Snail nicht nur mit rek. HDAC1 (siehe 2.4.2.1) sondern auch mit endogenem HDAC1 aus embryonalem *Drosophila* Kernextrakt interagiert. Dies lässt die Hypothese zu, dass Snail und HDAC1 im Zellkern von *Drosophila* assoziieren.

#### 2.4.2.3. Immunopräzipitation eines nativen Snail-HDAC1 Komplexes

In den beiden vorhergehenden Experimenten (siehe 2.4.2.1. und 2.4.2.2.) wurde gezeigt, dass rek. Snail die Histon-Deacetylase HDAC1 sowohl als rek. Protein als auch aus Kernextrakt rekrutiert. In folgendem Versuch sollte untersucht werden, ob in embryonalem *Drosophila* Kernextrakt ein nativer Snail-HDAC1 Komplex vorliegt und ob CtBP Bestandteil dieses putativen Komplexes ist. Dazu wurde ein *anti*-Snail AK gegen die 'Repressionsdomäne' (AS 1-244, Gray & Levine, 1996a) von Snail in Kaninchen etabliert und gereinigt (siehe 2.2.) und in Immunopräzipitationsexperimenten eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein kommerziell erhältlicher *anti*-GST AK verwendet.

Gleiche Mengen *anti*-Snail- und *anti*-GST AK wurden mit embryonalem *Drosophila* Kernextrakt inkubiert und die AK anschließend inklusive gebundener Proteine auf Protein A-Beads (Amersham) immobilisiert. Die immunopräzipitierten Proteine wurden mit steigender Salzkonzentration von den Antikörper-Beads eluiert, mittels SDS-PAGE auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. In der folgenden Western-Blot Analyse wurden die kopräzipitierten Proteine mit Hilfe von *anti*-Snail-, *anti*-HDAC1-, und *anti*-CtBP-AK untersucht.



Abb. 15 Interaktion von endogenem Snail und HDAC1: Anti-Snail-, anti-HDAC1- und anti-CtBP AK Western-Blot Analyse endogener Snail-assoziierter Proteine. Je 8 µl anti-GST AK (Spuren 1, 3, 5 und 7) und 500 µl gereinigter anti-Snail AK (Spuren 2, 4, 6 und 8) wurden mit 2,6 ml Kernextrakt inkubiert (entspricht etwa 50 µg schwerer AK-Kette pro AK). Durch Zugabe von je 140 µl Protein A-Beads wurden die AK gebundene und Proteine präzipitiert. Die immobilisierten Proteine wurden mit je 100 µl Puffer mit steigender MgCl<sub>2</sub> Konz. (0,5 M, Spuren 1 und 2; 1,0 M, Spuren 3 und 4; 1,5 M, Spuren 5 und 6; 2,0 M, Spuren 7 und 8) von

den AK-Beads eluiert. Dabei wurden zum Teil auch die *anti*-Snail AK und *anti*-GST AK von den AK-Beads eluiert. Die eluierten Proteine wurden mit Isopropanol gefällt, mittels SDS-PAGE auf SDS-Gelen (10%ig für *anti*-HDAC, 12,5%ig für *anti*-Snail und -CtBP) aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Anschließend wurden die Proteine durch Immunodetektion mit Hilfe von *anti*-Snail AK , *anti*-HDAC1 AK und *anti*-CtBP AK analysiert (ECL-Detektion). Als Positivkontrolle wurden etwa 80 ng rek. CtBP (Spur 9, siehe 2.1.2.1.2.) aufgetragen. Das Molekulargewicht der Standardproteine des Molekulargewichtsmarkers ist in kDa angegeben (links). Die Expositionszeit der Filme auf der Membran betrug 5 Min für den *anti*-Snail AK, 30 Sek für den *anti*-HDAC1 AK und bis zu 20 Min für den *anti*-CtBP AK.

In der 1,5 M MgCl<sub>2</sub> Fraktion der *anti*-Snail-Immunopräzipitation (*anti*-Snail-IP) detektierte der *anti*-Snail AK ein Protein mit einem Molekulargewicht, das dem von rek. Snail entspricht (Abb. 15, Spur 6, siehe auch Abb. 4). Dieses Protein wurde nur durch den *anti*-Snail AK (Abb. 15, Spur 6), nicht jedoch durch den *anti*-GST AK immunopräzipitiert (Abb. 15, Spur 5). Der *anti*-HDAC1 AK detektierte in der 0,5 M MgCl<sub>2</sub> Fraktion der *anti*-Snail-IP ein Protein, das dem Molekulargewicht von HDAC1 entspricht (Abb. 15, Spur 2, siehe auch Abb. 6). Auch dieses Protein wurde nur durch den *anti*-Snail AK (Abb. 15, Spur 2), nicht jedoch durch den *anti*-Snail AK (Abb. 15, Spur 2), nicht jedoch durch den *anti*-Snail AK (Abb. 15, Spur 2), nicht jedoch durch den *anti*-GST AK immunopräzipitiert (Abb. 15, Spur 1). Der *anti*-CtBP AK detekierte außer rek. CtBP, das als Positivkontrolle auf das SDS-Gel aufgetragen wurde, kein Signal. Das bedeutet, dass der *anti*-Snail AK aus embryonalem *Drosophila* Kernextrakt spezifisch einen Snail-HDAC1 Komplex immunopräzipitiert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Experimente 2.4.2., dass der Repressor Snail und die Histon-Deacetylase HDAC1 im *Drosophila* Embryo assoziieren und dass CtBP nicht Bestandteil dieses Komplexes ist.

### 2.5. Die Interaktion zwischen Drosophila HDAC1 und CtBP

Da in humanen Zellen eine Interaktion zwischen CtBP und HDAC1 gezeigt wurde (Sundqvist *et al.*, 1998), stellt sich die Frage, warum nicht ein Teil des im Kernextrakt enthaltenen CtBP's als HDAC1/CtBP-Komplex mit Snail kopräzipitiert wurde (siehe Abb. 15). Um dieser Frage nachzugehen, wurde untersucht, ob CtBP und HDAC1 auch in *Drosophila* interagieren.

Hierzu wurde auf FLAG-Beads immobilisiertes CtBP (siehe 2.1.2.1.2.) mit Kernextrakt inkubiert. Als Kontrolle wurden anstelle von CtBP-Beads unbeladene FLAG-Beads eingesetzt. Die rekrutierten Proteine wurden auf einem SDS-Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine NC-Membran transferiert und assoziiertes HDAC1 mit Hilfe eines *anti*-HDAC1 AK detektiert.



Abb. 16 Interaktion von endogenem HDAC1 mit rek. CtBP: Anti-HDAC1 AK Western-Blot endogener Snailassoziierter Proteine. 10 µl unbeladene (Spur 1) oder mit FLAG-CtBP (Spur 2) beladene FLAG-Beads wurden mit je 200 µl Kernextrakt inkubiert und die kopräzipitierten Proteine SDS-PAGE mittels auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine NC-Membran transferiert und mit Hilfe eines anti-HDAC1 AK im Western-Blot analysiert (ECL-Detektion). Die Expositionszeit der Membran auf dem Film betrug etwa 10 Sek. Das Molekulargewicht Standardproteine der des Molekulargewichtsmarkers ist in kDa angegeben (links).

Die CtBP-Beads kopräzipitierten aus dem Kernextrakt ein *anti*-HDAC1 AK immunoreaktives Protein (Abb. 16, Spur 2) mit dem Molekulargewicht von HDAC1 (siehe Abb. 6), während dieses Protein durch die Kontroll-Beads nicht kopräzipitiert wurde (Abb. 16, Spur 1). Dieses Ergebnis zeigt, dass rek. CtBP enodogenes HDAC1 aus embryonalem *Drosophila* Kernextrakt rekrutiert.

## 2.6. HDAC-Aktivitätsrekrutierung durch Snail kontra CtBP

Zusammenfassend zeigen die Resultate der Experimente 2.3., 2.4.2.1., 2.4.2.2. und 2.5., dass Snail mit CtBP oder HDAC1 interagiert und dass CtBP mit HDAC1 assoziiert. Ein aus embryonalem Kernextrakt immunopräzipitierter Snail-HDAC1-Komplex dagegen enthielt nur HDAC1 und kein CtBP (siehe 2.4.2.3). Daraus ergibt sich zum einen, dass Snail nur unter bestimmten Bedingungen mit CtBP oder HDAC1 assoziiert. Das bedeutet, es muss ein Regulationsmechanismus für diese Interaktionen bestehen (siehe Diskussion, 3.4.). Zum anderen ergibt sich daraus, dass HDAC1 in mindestens zwei Komplexpopulationen im Zellkern vorliegt, in einem Snail-HDAC1-Komplex und einem CtBP-HDAC1-Komplex. Um zu untersuchen, ob die beiden Komplexe unterschiedliche funktionelle Eigenschaften besitzen, wurden sie auf ihre intrinsische HDAC-Aktivität hin untersucht.

Dazu wurden Snail-Beads (siehe 2.1.2.1.1.) oder CtBP-Beads (siehe 2.1.2.1.2.) mit Kernextrakt oder Puffer inkubiert und die rekrutierte HDAC-Aktivität im HDAC-Assay quantifiziert.



**Abb. 17 HDAC-Aktivität von Snail-HDAC1- und CtBP-HDAC1-Komplexen:** Kernextrakt-inkubiertes FLAG-Snail und FLAG-CtBP im HDAC-Assay. 10 µl Snail-Beads oder CtBP-Beads wurden mit 200 µl Kernextrakt oder Puffer inkubiert und anschließend im HDAC-Assay eingesetzt. Die durch die Kontrollen (Snail- bzw. CtBP-Beads inkubiert mit Puffer) freigesetzte und quantifizierte Menge an Radioaktivität wurde zur besseren Übersicht als 100% und die durch die mit Kernextrakt inkubierten Snail- bzw. CtBP-Beads freigesetzte Radioaktivität als ein Vielfaches davon dargestellt.

Die Snail-Beads rekrutierten aus Kernextrakt im Vergleich zur Kontrolle (Snail-Beads + Puffer) etwa die 2,8-fache Menge an HDAC-Aktivität, wogegen die mit Kernextraktinkubierten CtBP-Beads gegenüber der Negativkontrolle (CtBP-Beads + Puffer) keine signifikante HDAC-Aktivität rekrutierten (Abb. 17).

Das bedeutet, dass Snail Bestandteil eines aktiven HDAC1-Komplexes im Zellkern ist, während CtBP Bestandteil eines inaktiven HDAC1-Komplexes ist. Eine Erklärung hierfür ist eine Assoziation von Snail mit einer zweiten, im CtBP-HDAC1-Komplex nicht präsenten HDAC, während HDAC1 in beiden Komplexen inaktiv sein könnte. Weiterhin besteht die Möglichkeit der Inhibierung der HDAC1-Aktivität durch unbekannte Faktoren oder der Regulation der HDAC1-Aktivität im putativen CtBP-HDAC1-Komplex durch CtBP (siehe Diskussion, 3.6.). Alle Möglichkeiten lassen die Hypothese einer Koexistenz der beiden Komplexe, Snail-HDAC1 und CtBP-HDAC1, im Zellkern zu. Möglicherweise handelt es sich um Entwicklungsstadium-, Gen- oder Zelltyp-spezifische regulative Einheiten (siehe Diskussion).

# 3. Diskussion

Das erste Mitglied der Snail-Superfamilie der Zinkfingertyp Transkriptionsfaktoren war das in Drosophila identifizierte namensgebende Snail (Grau et al., 1984, Nüsslein-Volhard et al., 1984). Alle Mitglieder der Familie besitzen eine hochkonservierte COOH-terminale Domäne, welche vier bis sechs Zinkfinger des C2H2-Typs umfasst und sequenzspezifische DNA-Bindung vermittelt (Knight & Shimeld, 2001). Die Repressoraktivität der Snail Proteine scheint auf zwei unabhängige Motive in der NH2-terminalen Domäne der Mitglieder zurückzuführen zu sein. Während für die Snail-vermittelte Repression in humanen Zellen das SNAG-Motiv (Snail/Gfi) essentiell zu sein scheint, ist das SNAG-Motiv in Drosophila Snail nicht zu finden (Nieto, 2002). Stattdessen besitzt Drosophila Snail im NH2-Terminus zwei Bindungsmotive für den Korepressor CtBP, welche für die Repressoraktivität essentiell zu sein scheinen (Nibu et al., 1998a und b). Genetische Studien, in denen mit Hilfe des evenskipped (eve) Streifen 2 'Enhancers' Snail in einem dorsoventralen Streifen im frühen Drosophila Embryo misexprimiert wurde, zeigten eine Repression des Snail Zielgens rhomboid im Bereich der eve Streifen 2 Expressionsdomäne. Dies beruht auf einer Bindung des ektopischen Snail Produkts an der endogenen regulatorischen Sequenz (NEE, Neuroektoderm-Element) des Snail Zielgens rhomboid. Mutationen in den beiden CtBP-Bindungsmotiven PQDLSLK (zu AQAAALK) und PEDLSVR (zu AEAAAVR) von Snail eliminierten diese repressive Aktivität weitgehend, während eine Mutation im P-DLS-K Motiv alleine einen schwächeren Effekt zeigte (Nibu et al., 1998b). In vitro reduzierte eine Mutation des Snail P-DLS-R Motivs die Bindung zu CtBP erheblich, verhinderte sie jedoch nicht vollständig. Erst eine weitere Mutation im zweiten CtBP Interaktionsmotiv P-DLS-K unterband die Interaktion zwischen Snail und CtBP (Nibu et al., 1998a). Das deutet darauf hin, dass beide CtBP Interaktionsmotive in Snail essentiell für die Funktion von Snail sind. Snail-Homologe sind von der Fliege bis hin zum Menschen in die Entwicklung des neuronalen Systems und der Transition von epithelialen in mesenchymale Zellen wesentlich beteiligt (Nieto, 2002).

In *Drosophila* ist Snail eine zentrale Komponente mehrerer entwicklungsspezifischer Prozesse. Durch Ausschluss Neuroektoderm-determinierender Gene aus dem prospektiven Mesoderm etabliert Snail die Mesoderm/Neuroektoderm-Grenze im frühen Embryo (Boulay *et al.*, 1987, Kosman *et al.*, 1991). Weiterhin kontrolliert Snail die Zellinvagination während der Gastrulation, wahrscheinlich ebenfalls durch Repression spezifischer Gene, u.a. *DEcadherin* (Hemavathy *et al.*, 1997, Oda *et al.*, 1998). Snail und die verwandten Proteine Worniu und Escargot haben bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems in *Drosophila* reduntante und essentielle Funktionen. Sie steuern die asymmetrischen Zellteilungen der Neuroblasten im späten Embryo (Cai *et al.*, 2001, Ashraf & Ip, 2001). Auch in der embryonalen Flügel-Imaginalscheibe kooperieren Snail und Escargot und fungieren als Determinanten für die Flügelentwicklung (Fuse *et al.*, 1996). Obwohl Snail als Repressor der Genexpression bekannt ist, weiß man über den molekluaren Mechanismus, wie Snail Repression vermittelt, relativ wenig. Eine physikalische und genetische Interaktion mit dem Korepressor CtBP lassen einen CtBP-vermittelten Repressionsmechanismus vermuten (siehe oben). Biochemische Studien zeigten eine Assoziation von Snail mit nukleärer HDAC-Aktivität, was Hinweise auf einen HDAC-vermittelten Wirkungsmechanismus gibt (Belz, 1998). Ziel dieser Arbeit war es, die biochemischen Grundlagen der Interaktion von Snail mit CtBP und/oder HDAC-Aktivität zu untersuchen.

### 3.1. Rekombinante Proteine

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Charakterisierung des Zusammenspiels des Zinkfingertyp Repressors Snail, des Korepressors CtBP und der Histon-Deacetylase HDAC1. Um Protein/Protein Wechselwirkungen studieren zu können, wurden die betreffenden Proteine als Fusionsproteine in verschiedenen Systemen exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. In den meisten Fällen genügte eine "Ein-Schritt-Strategie", um die Proteine in ausreichend reiner Form zu erhalten. Dabei wurden die Fusionsproteine an die entsprechenden Affinitätsmaterialien gebunden, kontaminierende Proteine durch Waschen entfernt und das Protein von Interesse bei Bedarf wieder eluiert. Einzig bei der Etablierung des anti-Snail Antikörpers (siehe 2.2.) wurde auf eine extensive Reinigung des Antigens unter Verwendung mehrerer Säulen nicht verzichtet, um einen hochspezifischen Antikörper zu erhalten. Die Analyse der gereinigten Proteine Snail-GST/C (siehe Abb. 3), His-Snail-1/253 (siehe Abb. 8), FLAG-Snail (siehe Abb. 4), FLAG-CtBP (siehe Abb. 5) und HDAC1-His/C (siehe Abb. 6) ergab, dass alle eine signifikante Abweichung des detektierten von ihrem berechneten Molekulargewicht zeigten. Die Gründe hierfür könnten unterschiedlicher Natur sein.

Computeranalysen der Primärsequenz von Snail ergaben, dass Snail einen überdurchschnittlich hohen Gehalt an Prolinresten enthält: Snail-GST/C (siehe Abb. 3.) besitzt 7,2%, FLAG-Snail (siehe Abb. 4) 7,8% und His-Snail-1/253 (siehe Abb. 8) sogar 9,5% Prolinanteil im Protein. Für den Drosophila Transkriptionsfaktor Krüppel wurde durch SDS-PAGE ein um etwa 20 kDa höheres Molekulargewicht als das berechnete detektiert. Diese Diskrepanz führte man auf den hohen Prolinanteil von 8% in Krüppel zurück (Ollo & Maniatis 1987, Gaul et al., 1987, Gaul-Unnerstall, 1988). Somit könnte auch im Fall von Snail der hohe Prolinanteil im Protein für das aberrante Laufverhalten in der SDS-PAGE verantwortlich sein. Rek., aus Sf9-Zellen gereinigtes FLAG-CtBP (siehe Abb. 5) besitzt ein Molekulargewicht von etwa 48 kDa, wogegen endogenes CtBP (siehe Abb. 10 und 11) aus embryonalem Drosophila Kernextrakt mit dem errechneten Molekulargewicht von etwa 42 kDa detektiert wurde. Mehrere mögliche Szenarien können diese Diskrepanz erklären. Zum einen ist CtBP in humanen Zellen ursprünglich als Phosphoprotein identifiziert worden (Schaeper et al., 1995). Am Beispiel von Drosophila Bicoid wurde gezeigt, dass eine Phosphorylierung des Proteins eine veränderte elektrophoretische Mobilität zur Folge haben kann (Driever & Nüsslein-Volhard, 1989). Somit könnte eine Phospohorylierung des rek. CtBP's in den zur Überexpression verwendeten Sf9-Zellen der Grund für das aberrante Laufverhalten sein. Weiterhin steht CtBP in dem Verdacht, ribosyliert zu werden, was sich ebenfalls auf das Laufverhalten in der SDS-PAGE auswirken kann (Turner & Crossley, 2001). Der Unterschied im Laufverhalten zwischen rek. und endogenem CtBP kann auch auf verschiedene Spleißvarianten zurückgeführt werden. Im Drosophila Embryo wurden vier verschieden lange CtBP mRNAs detektiert, die Grund zur Annahme geben, dass CtBP mit unterschiedlichen Molekulargewichten exprimiert wird (Poortinga et al., 1998). Ein unterschiedliches Spleißmuster des endogenen CtBP's im Kernextrakt und des rek. Proteins in den Sf9-Zellen könnte den Unterschied im Molekulargewicht der beiden Proteine erklären. Die rek. Histon-Deacetylase HDAC1-His/C wurde in der SDS-PAGE mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa (siehe Abb. 6) detektiert und läuft damit etwa 11 kDa größer als errechnet. Dies entspricht dem publizierten Laufverhalten des Fusionsproteins und dem des endogenen HDAC1 (siehe Abb 14, Spuren 4 und 5) und ist unter Umständen auf nicht charakterisierte postranslationale Modifikationen zurückzuführen (Huang & Kadonaga, 2001).

Etwa fünf Jahre nach der Klonierung und Charakterisierung von Snail als Zinkfinger-Protein durch Boulay (1987) wurde das Protein als Repressor neuroektodermaler Gene

Diskussion

identifiziert (Leptin, 1991, Kosman *et al.*, 1991, Kasai *et al.*, 1992). Es dauerte etwa noch sechs weitere Jahre, bis erste Hinweise auf einen möglichen Repressionsmechanismus von Snail veröffentlicht wurden. *In vitro* wurde eine physikalische Interaktion zwischen Snail und dem Homolog des humanen Korepressors CtBP entdeckt (Nibu *et al.*, 1998a). Wenig später konnte mit *Drosophila* Keimbahnklonen, die eine stark reduzierte Dosis an maternalem und zygotischen CtBP besaßen, gezeigt werden, dass diese die gleichen Musterbildungsdefekte wie Snail Nullmutanten hatten (Nibu *et al.*, 1998b). Eigene Untersuchungen zeigten eine Interaktion von Snail und CtBP im Kernextrakt von 0-12 h alten *Drosophila* Embryonen (siehe 2.3.). Dies lässt vermuten, dass Snail-vermittelte Repression CtBP-abhängig ist. Biochemische Studien mit rek. Snail ergaben jedoch eine Assoziation von Snail mit nukleärer HDAC-Aktivität, was auf einen HDAC-Aktivitäts-abhängigen Mechanismus von Snail hindeutet. Die in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Studien sollten dazu beitragen, eine mögliche funktionale Beziehung zwischen Snail, CtBP und HDAC-Aktivität aufzuklären.

### 3.2. Die Interaktion zwischen Snail und CtBP

Die Tatsache, dass CtBP-vermittelte Repression unter bestimmten Umständen TSA-sensitiv ist und dass es Hinweise auf einen HDAC1-unabhängigen CtBP-vermittelten Mechanismus in *Drosophila* gibt (siehe 1.6.1.), ließ die Vermutung aufkommen, dass CtBP transkriptionelle Repression durch eine intrinsische HDAC-Aktivität vermittelt. Dies würde die Entdeckung einer Snail-assoziierten nukleären HDAC-Aktivität mit der physikalischen Interaktion und funktionalen Abhängigkeit von Snail und CtBP in Einklang bringen.

Rekombiantes CtBP wurde im HDAC-Assay auf seine HDAC-Aktivität hin getestet (siehe 2.4.1.). Da Nikotinamid (NAD) als Kofaktor für bestimmte HDACs bekannt ist und da CtBP selbst ein NAD-bindendes Motiv besitzt, wurde die Reaktion in An- und Abwesenheit von NAD durchgeführt (Schaeper *et al*, 1995). CtBP zeigte in diesem Experiment keine signifikante HDAC-Aktivität (siehe Abb. 12). Möglicherweise werden zu einer enzymatischen Aktivität von CtBP zusätzliche Faktoren benötigt, die im Versuchsaufbau nicht vorhanden waren. Alternativ könnte die Snail-assoziierte HDAC-Aktivität nicht durch CtBP sondern einen anderen Interaktionspartner von Snail vermittelt werden. Als potentielle

Kandidaten kommen hier vor allem die in *Drosophila* charakterisierten Histon-Deacetylasen HDAC1, HDAC3, HDAC6 und SIR2 in Betracht.

## 3.3. Die Interaktion zwischen Snail und HDAC1

Während in Hefe zur Zeit etwa zehn verschiedene HDACs bekannt sind und die Anzahl in Säugerzellen noch größer zu sein scheint, sind in *Drosophila* nur vier HDACs charaktersiert: HDAC1, HDAC3, HDAC6 und SIR2. HDAC1 und HDAC3 gehören zur Klasse I, HDAC6 zur Klasse II und SIR2 zur Klasse III der HDACs (De Rubertis *et al.*, 1996, Johnson *et al.*, 1998, Barlow *et al.*, 2001, Rosenberg & Parkhurst, 2002). *Drosophila* HDAC6 und SIR2 scheiden als Snail-assoziierte HDACs aus, da beide insensitiv gegen Trichostatin (TSA) sind, wogegen die Snail-assoziierte HDAC-Aktivität TSA sensitiv ist (Belz, 1998, Barlow *et al.*, 2001). Kopräzipitationsexperimente mit rek. Snail und embryonalem *Drosophila* Kernextrakt und anschließender Western-Blot Analyse unter Verwendung eines *anti*-HDAC3 AK (nicht gezeigt), machen eine Assoziation von Snail und HDAC3 unwahrscheinlich.

Um eine evtl. Interaktion von Snail und HDAC1 *in vitro* zu untersuchen, wurden beide Proteine rek. exprimiert, gereinigt (siehe Abb. 3 und 6) und in Protein/Protein Interaktionsstudien eingesetzt (siehe 2.4.2.1.). Da HDAC-His/C keine Affinität zu Gluthation-Sepharose zeigte, wurde für dieses Experiment Snail-GST/C eingesetzt. Während Snail-GST/C in diesem Experiment mit HDAC1-His/C interagierte (siehe Abb. 13B, Spur 2), zeigte GST keine Assoziation mit HDAC1-His/C (siehe Abb. 13B, Spur 3). Mit HDAC1-His/C wurden die Mikrotubuli-Bausteine *alpha-* und *beta-*Tubulin und das Hitzeschockprotein Hsp60 aus den zur Expression verwendeten *Sf*9-Zellen kogereinigt (siehe 2.1.2.2.). Da diese Proteine in nicht stöchiometrischen Mengen auftraten, handelte es sich wahrscheinlich um Kontaminanten und nicht um spezifische Bindungspartner von HDAC1. Somit sollten diese Proteine nicht an einer Bindungsvermittlung zwischen Snail und HDAC1 beteiligt sein. Daher lässt sich aus diesen Ergebnissen eine direkte Interaktion zwischen Snail und HDAC1 postulieren.

Um den Nachweis der Interaktion zwischen Snail und HDAC1 nicht auf reine *in vitro* Experimente beschränken zu müssen, wurde untersucht, ob Snail im Zellkern mit endogenem HDAC1 interagiert (siehe 2.4.2.2.). Da unbekannt ist, ob Snail homodimerisiert, ist es möglich, dass die Dimerisierung durch den GST-Fusionsanteil von Snail-GST/C eine

artifizielle Bindungsstelle für HDAC1 bildet. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Untersuchungen ein aus *Sf*9-Zellen gereinigtes FLAG-Snail Fusionsprotein (siehe Abb. 4) eingesetzt. FLAG-Snail rekrutierte endogenes HDAC1 aus embryonalem *Drosophila* Kernextrakt (siehe Abb. 14, Spur 4), während die Kontrolle kein HDAC1 kopräzipitierte (siehe Abb. 14, Spur 3). Ferner zeigten zusätzliche Kontrollen, dass das eingesetzte Snail kein HDAC1 vorgebunden hatte (siehe Abb. 14, Spuren 1 und 2). Diese Experimente zeigen, dass Snail und HDAC1 in Zellkernen des *Drosophila* Embryos assoziieren können.

Um die Hypothese einer Assoziation von Snail und HDAC1 im Zellkern von *Drosophila* belegen zu können, wurde ein Antikörper gegen Snail in Kaninchen etabliert (*anti*-Snail AK, siehe 2.2.). Der *anti*-Snail AK wurde in Immunopräzipitationsexperimenten (IP) mit embryonalem *Drosophila* Kernxtrakt eingesetzt, als Kontrolle diente ein GST-AK (siehe 2.4.2.3.). Die Kopräzipitation von Snail (siehe Abb. 15, Spur 6) und HDAC1 (siehe Abb. 15, Spur 2) durch den *anti*-Snail AK deutet auf eine Assoziation der beiden Proteine im Kernextrakt hin. Die Abwesenheit von Snail (siehe Abb. 15, Spur 5) und HDAC1 (siehe Abb. 15, Spur 1) im Präzipitat der *anti*-GST-IP zeigten, dass es sich dabei um eine spezifische Interaktion handelte. CtBP scheint nicht Bestandteil der Snail-HDAC1 Interaktion zu sein, da der *anti*-Snail AK kein CtBP kopräzipitierte (siehe Abb. 15, Spuren 1-8). Die Abwesenheit von CtBP im Präzipitat der *anti*-Snail-IP ist nicht auf einen systematischen Fehler zurückzuführen, da der *anti*-CtBP AK das zur Kontrolle auf das SDS-Gel aufgetragene rek. CtBP selbst in geringen Mengen detektierte (siehe Abb. 15, Spur 9)



Abb. 18 Snail interagiert mit CtBP und HDAC1

Zusammenfassend zeigen die Experimente 2.4.2., dass Snail und HDAC1 im Zellkern von *Drosophila* Embryonen assoziiert vorliegen und dass CtBP unter den getesteten Bedingungen nicht an dieser Assoziation beteiligt war. Die Abwesenheit von CtBP in einem nativen, aus embryonalem Kernextrakt gereinigtem Snail-HDAC1-Komplex überrascht aus mehreren Gründen: Erstens wurde in Experiment 2.3. eine Interaktion zwischen Snail und CtBP gezeigt, zweitens ist CtBP sowohl für die korrekte Funktionsweise von Snail bei der Etablierung der Mesoderm/Neuroektoderm Grenze im frühen *Drosophila* Embryo als auch während der Entwicklung des Nervensystems im späten Embryo essentiell (Nibu *et al.*, 1998b, Ashraf & Ip, 2001). Noch überraschender machen dieses Resultat die Tatsachen, dass humanes CtBP und HDAC1 interagieren und dass CtBP-vermittelte Repression unter bestimmten Umständen HDAC-abhängig ist (Sundqvist *et al.*, 1998, Criqui-Filipe *et al.*, 1999). Möglicherweise reprimiert Snail Transkription unter bestimmten Umständen durch verschiedene Mechanismen, vermittelt durch einen Snail-CtBP- oder Snail-HDAC1-Komplex. Dazu müssten die Interaktionen der Proteine jedoch regulierbar sein.

### 3.4. Regulierte Snail / CtBP Interaktion

Rek. Snail rekrutiert CtBP (siehe Abb. 10 und 11) und HDAC1 (siehe Abb. 13 und 14), während endogenes Snail in embryonalem 0-12 Stunden Kernextrakt nur mit HDAC1 interagiert, nicht jedoch mit CtBP assoziiert vorliegt (siehe Abb. 15). Offensichtlich gibt es Bedingungen, unter denen Snail mit CtBP assoziiert, unter anderen jedoch mit HDAC1. Das unterschiedliche Bindungsverhalten könnte im Ursprung des eingesetzten Snail Proteins liegen. Das rek. Protein wurde aus Sf9-Zellen gewonnen, während das endogene Protein aus Kernextrakt isoliert wurde, der aus etwa zwölf Stunden alten Drospohila Embryonen gewonnen wurde. Somit unterlag das endogene Protein im Gegensatz zum rek. allen entwicklungsspezifischen Einflüssen, die z. B. postranslationale Modifikationen von Snail bewirken können. Eine solche Modifikation könnte die Interaktion zwischen Snail und CtBP bzw. HDAC1 regulieren. Hinweise auf einen möglichen Mechanismus ergaben sich anhand von Studien der Interaktion des adenoviralen Proteins E1A mit CtBP (Zhang et al., 2000). Die Interaktion von CtBP mit einer ganzen Reihe von Repressoren wird durch das konservierte Motiv P-DLS vermittelt (Schaeper et al., 1995, Nibu et al., 1998a und b). Studien der Gruppe um Richard H. Goodman zeigten eine Abhängigkeit der Interaktion zwischen CtBP und E1A von dem Acetylierungsstatus eines dem CtBP-Bindungsmotiv benachbarten Lysinrestes in vitro. Eine Acetylierung von E1A durch die in vivo assoziierten Histon-Acetylasen (HATs) CBP (CREB binding protein) /p300 oder P/CAF an dem betreffenden Lysinrest führte zu einer signifikant verminderten Bindung von CtBP (Zhang et al., 2000). Weitere Untersuchungen zeigten einen ähnlichen Mechanismus für die Regulation der Interaktion des nuklear Hormon Rezeptor-Interagierenden-Proteins RIP140 mit CtBP. RIP140 assoziiert Liganden-abhängig mit einer Reihe von nuklearen Hormon-Rezeptoren und reprimiert deren Aktivität CtBP-abhängig (Cavailles *et al.*, 1995, Treuter *et al.*, 1998, Miyata *et al.*, 1998, Subramaniam *et al.*, 1999, Lee & Wei, 1999, Vo *et al.*, 2001). *In vitro* führte eine Acetylierung eines dem CtBP-Bindungsmotiv benachbarten Lysinrestes durch CBP/p300 zu einer reduzierten Bindung zwischen RIP140 und CtBP. Die Substitution des betreffenden Lysinrestes in einen Glutaminrest reduzierte ebenfalls die Bindung zwischen den beiden Proteinen und resultierte in einem weitgehenden Verlust der repressiven Aktivität in humanen Zellen (Vo *et al.*, 2001). Genau wie acetyliertes Lysin ist Glutamin bei neutralem pH ungeladen und könnte dieses somit imitieren. Ein Sequenzvergleich von E1A, RIP140 und anderen CtBP-bindenden Proteinen zeigte, dass der betreffende Lysinrest konserviert ist (Zhang *et al.*, 2000).

E1A	Ρ	L	D	LS	С	κ	R	Ρ	R I	Ρ
RIP140	Ρ	I	D	LS	С	ĸ	н	G	ΤE	Е
dSnail	Ρ	Q	D	LS	L	ĸ	R	G	RI	D
dKnirps	Ρ	М	D	LS	Μ	ĸ	Т	S	RS	S
xFOG	Ρ	I	D	LS	Κ	κ	Ρ	R	L١	V

**Abb. 19 Sequenzvergleich des CtBP-Bindungsmotivs in Repressoren.** Verändert nach Zhang *et al.*, 2000; d: *Drosophila*, x: *Xenopus*. Dunkelgrau unterlegt ist die Konsensussequenz des CtBP-Interaktionsmotivs. Die weiß unterlegten Lysinreste repräsentieren im Falle von E1A und RIP140 die durch CBP/p300 bzw. P/CAF acetylierten Lysinreste und im Falle von dSnail, dKnirps und xFOG putative Ziele für Acetylierung durch Acetyltransferasen.

Möglicherweise stellt die Regulation der Bindung von CtBP an E1A und RIP140 durch Acetylierung des dem P-DLS Motiv benachbarten konservierten Lysinrestes einen Mechanismus dar, der auch für Snail zutrifft.

Bei einer Suche nach CtBP-interagierenden Proteinen wurden in einem 'yeast two-hybrid screen' 41 Klone aus einer embryonalen Maus cDNA Bibliothek identifiziert. 68% der Klone enthielten Sequenzen, die der CtBP-Bindungskonsensussequenz P-DLS stark ähnelten. Von diesen enthielten 75% einen flankierenden Lysin- oder Argininrest (Vo *et al.*, 2001). Snail passt gleich zweifach in dieses Muster, da seine beiden CtBP-Bindungskonsensussequenzen einmal von einem Lysinrest und einmal von einem Argininrest flankiert sind (Boulay *et al.*, 1987).

dSnail	41	Ρ	Q	D	L	S	L	κ	R	G	R	D	51
dSnail ′	186	Ρ	Е	D	L	S	V	R	Ν	D	Т	Ρ	196

Abb. 20 Sequenzvergleich der beiden CtBP-Bindungsmotive in Drosophila Snail. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen 41-51 und 186-196 von Drosophila Snail (GenBank NCBI: gi|7287906)

Die beiden CtBP-Bindungsmotive in Snail stimmen im Bereich der Konsensussequenzen überein, unterscheiden sich jedoch durch einen flankierenden Lysin- bzw. Argininrest (Abb. 20). Die Position des weiß unterlegten Lysin- bzw. Argininrestes stimmen mit der im Falle von E1A und RIP140 für die Regulation der Bindung von CtBP kritischen Position überein (siehe Abb. 19, weisse Box). Die Gruppe um Ronald M. Evans konnte zeigen, dass die Methylierung eines einzelnen Argininrestes in CBP/p300 durch die Proteinmethyltransferase CARM 1 die Interaktion zwischen CBP/p300 und CREB (cAMP response element binding protein) inhibierte und damit CREB-abhängige Aktivierung verhinderte (Xu et al., 2001). Möglicherweise ist die Interaktion zwischen Snail und CtBP zweifach reguliert. Der dem ersten CtBP-Bindungsmotiv benachbarte (NH2-terminal orientiert) konservierte Lysinrest könnte als Substrat für eine HAT, der dem zweiten CtBP-Bindungsmotiv (COOH-terminal orientiert) benachbarte konservierte Argininrest als Substrat für eine Proteinmethyltransferase dienen. Eine Substitution des kritischen Lysinrestes in E1A (siehe Abb. 19, weisse Box) durch Arginin führt zu einer verstärkten Bindung von CtBP in vitro und in Zellkultur (Zhang et al., 2000). Möglicherweise ist das durch die positive Ladung von Arginin zu erklären, die einen nicht acetylierten Lysinrest imitiert.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgendes vorläufiges Modell ableiten: Das P-DLS-K Motiv in Snail repräsentiert die primäre Interaktionsplattform für CtBP mit einem putativen "molekularen Schalter" in Form eines benachbarten Lysinrestes. Ist der Lysinrest nicht acetyliert, steht der Schalter auf "Interaktion" und CtBP assoziiert mit Snail. Die Tendenz von CtBP, Homodimere zu bilden (Turner & Crossley, 1998), führt zur Rekrutierung eines weiteren CtBP-Moleküls an das zweite, nicht regulative CtBP-Bindungsmotiv P-DLS-R in Snail. Alternativ ist auch denkbar, dass die Interaktion von CtBP mit dem P-DLS-R Motiv durch Methylierung des in dem Motiv enthaltenen Argininrestes reguliert wird. Der so gebildete Snail-CtBP-Komplex kann dann über einen bis dato unbekannten CtBP-vermittelten Mechanismus Genaktivität reprimieren. Eine entwicklungsspezifische Rekrutierung oder Aktivierung einer bereits assoziierten Acetylase im Komplex führt zu einer Modifikation des im P-DLS-K positionierten Lysinrestes, hebt die Interaktion zwischen Snail und CtBP auf und ermöglicht die Interaktion zwischen Snail und HDAC1. Sinngemäß ist ein ähnlicher Vorgang auch für das zweite CtBP-Bindungsmotiv in Snail durch Methylierung des Argininrestes denkbar.

## 3.5. Snail-CtBP versus Snail-HDAC1

Die hypothetische Möglichkeit der Regulation der Assoziation von Snail und CtBP und die Entdeckung der Interaktion von Snail und HDAC1 in vivo unter Ausschluss von CtBP (siehe 2.4.2.3.) eröffnet die Möglichkeit einer Koexistenz zweier differenter Snail-Komplexe: Snail-CtBP und Snail-HDAC1. Ob eine solche Koexistenz von biologischer Relevanz sein könnte soll im folgenden diskutiert werden. Das Expressionsmuster von Snail während der Drosophila Entwicklung ist sehr dynamisch. Anfänglich als Mesoderm/Neuroektoderm-Grenze determinierendes Protein identifiziert, scheint heute klar zu sein, dass die Funktionen von Snail vielfältiger sind (Boulay et al., 1987, Kosman et al., 1991). Im Laufe der Drosophila Entwicklung wird Snail in allen drei Keimblättern exprimiert (Alberga et al., 1991). Wahrscheinlich durch CtBP-abhängige Repression Neuroektoderm-spezifischer Gene wie rhomboid, lethal of scute und single-minded in der eigenen ventralen Expressionsdomäne etabliert Snail die Mesoderm/Neuroektoderm-Grenze im frühen Embryo (Kosman et al., 1991, Kasai et al., 1992, Nibu et al., 1998a und b, siehe auch 1.6.1.). Im späten Embryo kontrolliert Snail zusammen mit den Genprodukten der verwandten Gene escargot und worniu die Entwicklung des zentralen Nervensystems durch Regulation der Asymmetrie und der Zellteilung der Neuroblasten (Ashraf et al., 1999). Mutationen in den beiden CtBP-Bindungsmotiven von Snail verhindern eine korrekte Funktionsweise des Proteins während der Entwicklung des Nervensystems und weisen somit auch hier auf einen CtBP-abhängigen Snail Mechanismus hin (Ashraf & Ip, 2001). Somit scheint die repressive Funktion von Snail sowohl während der Etablierung des Mesoderms im frühen Embryo als auch während der Entwicklung des zentralen Nervensystems im späten Embryo durch CtBP vermittelt zu werden. Das schließt die Beteiligung des in 3.3. diskutierten Snail-HDAC1-Komplexes ohne CtBP an diesen Vorgängen aus. Eigene Experimente mit mutanten Drosophila Embryonen mit stark reduzierter Dosis an maternalem und zygotischem HDAC1 bestätigten diese

Annahme. In diesen HDAC1-defizienten Embryonen konnte keine Derepression des neuroektodermalen Gens *rhomboid* beobachtet werden, wie das in Snail Nullmutanten oder CtBP Keimbahnklonen der Fall ist (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen reduzieren sich jedoch auf ausgewählte Zielgene von Snail. Möglicherweise ist der Funktionsmechanismus von Snail promotorabhängig und Snail reguliert die Repression bisher unbekannter Zielgene durch einen CtBP-unabhängigen Mechanismus.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Entdeckung eines snail Allels, das die Entwicklung des Mesoderms von der Zellinvagination während der Gastrulation entkoppelt (Hemavathy et al., 1997). Die hohe Konzentration von Snail in den Kernen invaginierender Zellen in der Ventralfurche und Untersuchungen der morphogenetischen Bewegungen während der Drospophila Entwicklung lassen eine Funktion von Snail während der Gastrulation vermuten (Leptin & Grunewald, 1990, Alberga et al., 1991). Im genetischen Hintergrund eines starken snail Allels kommt es zur Derepression neuroektodermaler Gene in der ventralen Region des Drosophila Embryos und zur gleichzeitigen Inhibition der Zellinvagination während der Gastrulation (Simpson, 1983, Nüsslein-Volhhard et al., 1984). Das snail Allel sna<sup>V2</sup> dagegen zeigt einen Übergangsphänotyp (Hemavathy et al., 1997). In homozygoten *sna<sup>V2</sup>* Embryonen kommt es zwar zur Expansion der neuroektodermalen Gene rhomboid und sinlge-minded in die Snail-Expressiondomäne, die Ventralfurche bildet sich jedoch aus und die Invaginantion läuft zwar zeitverzögert, aber annähernd normal ab . Die Differenzierung der invaginierten Zellen in mesodermales Gewebe ist allerdings unterbunden (Hemavathy et al., 1997). Eine Schlussfolgerung der Autoren war ein Modell, in dem Snail eine bivalente Aufgabe zukommt. Die Repression neuroektodermaler Gene durch Snail in der eigenen Expressionsdomäne etabliert die Mesoderm/Neuroektoderm-Grenze, während die Regulation eines uncharakterisierten "Gastrulations-Gensatzes" in den invaginierenden Zellen die Zellbewegungen während der Gastrulation steuert. Somit ist es denkbar, dass die Snail-HDAC1 Interaktion an der Regulation der Expression des "Gastrulations-Gensatzes" beteiligt ist. Die zelltypspezifische Interaktion von Snail mit CtBP oder HDAC1 könnte zur gleichen Zeit in verschiedenen Zellen unterschiedliche genetische Programme starten, die zu unterschiedlichen Zellschicksalen führen. Da es derzeit keine Beweise für die Beteiligung von HDAC1 an den Gastrulationsvorgängen gibt, sollen diese Ausführungen nur als Beispiel für ein mögliches Aktionsfeld des putativen Snail-HDAC1-Komplexes dienen.

Neben einer möglichen Koexistenz eines Snail-CtBP- und Snail-HDAC1-Komplexes zu gleicher Zeit in verschiedenen Zellen, ist auch eine temporäre Abfolge der Funktion des Snail-CtBP- bzw. des Snail-HDAC1-Komplexes in einer Zelle denkbar. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus liefert der Drosophila Repressor Runt. Runt ist an der Musterbildung des Drosophila Embryos beteiligt, indem er mitverantwortlich ist für die Ausbildung der Asymmetrie der vierzehn Parasegmente. Ektopische Expression von Runt reprimiert die Aktivierung des Segmentpolaritätsgens engrailed in den ungeraden Parasegmenten und ist lethal (Manoukian & Krause, 1993). In einem genetischen Screen wurden vier Gene identifiziert, die den lethalen Phänotyp, verursacht durch ektopische Runt Expression, supprimierten: tramtrack, groucho, CtBP und hdac1 (Wheeler et al., 2002). tramtrack codiert für einen Zinkfinger-Repressor, die anderen drei Gene für bekannte Korepressoren. Eine reduzierte maternale Dosis jedes der vier Gene führte zur Wiederherstellung der durch Runt reprimierten Expression von engrailed (Wheeler et al., 2002). Bemerkenswert war die Zeitverschiebung der Wiederherstellung der engrailed Expression zwischen den verschiedenen Genen. Während eine reduzierte tramtrack-Dosis zu einer Wiederherstellung der ungeraden engrailed-Streifen im Blastodermstadium führte, erfolgte diese im Falle von groucho, CtBP und hdac1, erst während der Keimbahnstreckung, also erst nach der Gastrulation (Wheeler et al., 2002). In Embryonen, die von weiblichen HDAC1 Keimbahnklonen abstammten, also eine stark reduzierte Konzentration maternalen HDAC1 besaßen, reprimierte ektopisches Runt die Expression von engrailed im frühen Gastrulastadium, die Repression konnte jedoch nicht wie in WT-Embryonen bis in spätere Stadien erhalten werden (Wheeler et al., 2002). Aus diesen und weiteren Ergebnissen resultierte ein Zwei-Stufen-Modell für Runt-vermittelte Repression (Wheeler et al., 2002). Verantwortlich für die Initiation der Repression von engrailed im Blastoderm Stadium durch Runt ist dabei die Interaktion von Runt mit Tramtrack, direkt oder indirekt. Die Stabilisierung und Erhaltung der Repression durch die Gastrulation hindurch ist dann abhängig von CtBP, Groucho und HDAC1, wobei die Aktivität von HDAC1 den Zugang von Aktivatoren und/oder der generellen RNA-Pol. II Transkriptionsmaschinerie zum Promotorbereich dauerhaft unterbindet (Wheeler et al., 2002).

Ein solches Modell ist auch für Snail während der Etablierung der Mesoderm/Neuroektoderm-Grenze denkbar. Hierbei initiiert ein Snail-CtBP-Komplex die Repression neuroektodermaler Gene wie z.B. *rhomboid, single-minded* und *lehtal of scute* im ventralen Bereich des frühen *Drosophila* Embryos durch einen unbekannten Mechanismus. Zeitabhängig ändert sich die Komposition des Snail-Komplexes von einem Snail-CtBP- zu einem Snail-HDAC1-Komplex. Letzterer etabliert durch Deacetylierung von Histonen dauerhaft einen repressiven Chromatinstatus im Bereich der regulatorischen Sequenzen der neuroektodermalen Zielgene von Snail und determiniert somit ein mesodermales Schicksal dieser Zellen.

## 3.6. Der Korepressor CtBP und seine Beziehung zu HDAC1

Die Proteine der CtBP-Familie sind von den Invertebraten bis hin zum Menschen hochkonserviert. Genetische und biochemische Studien mit CtBP-homologen Proteinen aus *Drosophila, Xenopus* und verschiedenen Säugern identifizierten CtBP als transkriptionellen Korepressor, der Funktionsmechanismus blieb jedoch unbekannt (Chinnadurai, 2002). Einen Hinweis auf einen möglichen Mechanismus gab die Assoziation von humanem CtBP mit HDAC1 *in vitro* und *in vivo* (Sundqvist *et al.*, 1998).

Sollte diese Interaktion auch in *Drosophila* nachzuweisen sein, so würde eine Assoziation zwischen Snail und CtBP (siehe 2.3.), zwischen Snail und HDAC1 (siehe 2.4.) und zwischen CtBP und HDAC1 (siehe 2.5.) existieren. Eine solche Konstellation würde eine Hypothese über einen trimeren funktionellen Snail-CtBP-HDAC1-Komplex provozieren. Dieser ist mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit jedoch nur schwer in Einklang zu bringen. Um diesen Widerspruch zu klären, wurde untersucht, ob CtBP und HDAC1 in *Drosophila* assoziieren.

Dazu wurde rek. immobilisiertes CtBP (siehe Abb. 5) mit embryonalem *Drosophila* Kernextrakt inkubiert und kopräzipitiertes endogenes HDAC1 durch Western-Blot Analyse detektiert (siehe 2.5.). Das Kopräzipitationsexperiment zeigte eine spezifische Interaktion zwischen rek. CtBP und endogenem HDAC1 (siehe Abb. 16). Somit scheint jedes der drei Proteine Snail, CtBP und HDAC1 mit dem anderen zu interagieren, ohne dass jedoch ein trimerer Komplex gebildet wird. HDAC1 liegt also in mindestens zwei unterschiedlichen Komplexen vor, einmal Snail- und einmal CtBP-assoziiert.



Abb. 21 Snail interagiert mit CtBP und HDAC1, CtBP interagiert mit HDAC1.

Im Kontext der diskutierten Ergebnisse überrascht die Assoziation zwischen CtBP und HDAC1. Zum einen, weil Snail-assoziiertes endogenes HDAC1 nicht mit CtBP assoziiert vorliegt (siehe Abb. 15) und zum anderen weisen genetische Studien auf einen HDAC1unabhängigen CtBP-vermittelten Repressionsmechanismus in *Drosophila* hin (Mannervik & Levine, 1999). Um eine funktionelle Unterscheidung der beiden putativen HDAC1-Komplexe treffen zu können, wurde sowohl Snail- als auch CtBP-assoziiertes HDAC1 auf seine HDAC-Aktivität hin untersucht.

Dazu wurde immbolisiertes Snail und CtBP mit Kernextrakt inkubiert und die rekrutierte HDAC-Aktivität im HDAC-Assay quantifiziert (siehe 2.6.). Snail rekrutierte hierbei signifikante Mengen an HDAC-Aktivität, während das bei CtBP nicht der Fall war (siehe Abb. 17). Das bedeutet, dass sowohl Snail (siehe Abb. 13, 14 und 15) als auch CtBP (siehe Abb. 16) mit HDAC1 interagieren, aber nur Snail mit HDAC-Aktivität assoziiert (siehe Abb. 17). Zwei mögliche Szenarien können dieses Resultat erklären. Erstens: Snail und CtBP interagieren mit HDAC1, diese ist jedoch in beiden Fällen inaktiv. Nur Snail ist mit einer zweiten, nicht charakterisierten HDAC assoziiert, die Aktivität vermittelt. Dagegen spricht, dass ausser HDAC1 die in Drosophila charakterisierten HDACs als potentiell Snailassoziierte HDAC-Aktivitäten ausgeschlossen werden konnten (siehe 3.3.). Zweitens: Komplex-assoziierte HDAC1 unterliegt regulatorischen Einflüssen und ist im Falle von Snail-HDAC1 aktiv und im Falle von CtBP-HDAC1 inaktiv. Die putative Dehydrogenase-Aktivität von CtBP wurde schon als regulatorisches Ereignis zur Reduzierung von HDAC-Aktivität vorgeschlagen (Phippen et al., 2000). Da endogenes Snail zwar mit HDAC1, nicht jedoch mit dem CtBP-HDAC1 Kompex assoziiert, scheint die Assoziation von HDAC1 und CtBP die Interaktion mit Snail zu inhibieren.

Somit scheint das "Dreiecksverhältnis" zwischen dem Zinkfingertyp Repressor Snail und den beiden Korepressoren CtBP und HDAC1 komplizierten regulatorischen Einflüssen zu unterliegen. In embryonalem 0-12 h Stunden *Drosophila* Kernextrakt konnte in dieser Arbeit eine physikalische Assoziation zwischen Snail und HDAC1, zwischen Snail und CtBP und zwischen CtBP und HDAC1 gezeigt werden, ohne dass dabei ein trimerer Komplex gebildet wurde (siehe Abb. 10, 11, 13, 14, 15 und 16). Da Snail sowohl mit CtBP als auch mit HDAC1 assozieren kann, müssen diese Interaktionen reguliert sein (siehe 3.4.). Auch die Bindung zwischen CtBP und HDAC1 muss reguliert sein, da endogenes Snail mit HDAC1 assoziierte, ohne dass CtBP in diesem Komplex nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 15). Denkbar

ist auch eine konzentrationsabhängige Interaktion der Proteine, wenn die Konzentrationen der einzelnen Faktoren in verschiedenen Zellen unterschiedlich sind. Dagegen spricht zwar die ubiquitäre Expression von CtBP und HDAC1, Daten die Proteinkonzentration betreffend sind jedoch nicht bekannt. Weiterhin muss die Aktivität von HDAC1 regulatorischen Einflüssen unterliegen, da Snail-assoziierte HDAC1 aktiv, CtBP-assoziierte HDAC1 jedoch inaktiv ist (siehe Abb. 17).

Basierend auf den Resultaten dieser Arbeit und der diskutierten Punkte kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Snail zeitabhängig oder zelltypspezifisch verschiedene Multiproteinkomplexe rekrutiert, um die Expression seiner Zielgene zu reprimieren.

### 3.7. Modelle der Snail-vermittelten transkript. Repression

Die Charakterisierung der regulatorischen Sequenz, des "Neuroektoderm-Elements" (NEE), des Neuroektoderm-determinierenden Gens *rhomboid* führte zur Entwicklung mehrerer Modelle der Snail-vermittelten Repression (siehe 3.7.1.). Die Entdeckung eines nativen Snail-HDAC1-Komplex unter Ausschluss von CtBP in dieser Arbeit fordert eine Neuinterpretation oder Erweiterung dieser klassischen Modelle (siehe 3.7.2.).

#### 3.7.1. Klassische Modelle

Die klassischen Modelle der Snail-vemittelten Repression beruhen vor allem auf Studien mit dem am bestuntersuchtesten Zielgen von Snail, *rhomboid* (Mayer & Nüsslein-Volhard, 1988, Bier *et al.*, 1990). Snail reprimiert *rhomboid* Expression in seiner eigenen ventralen Expressionsdomäne und beschränkt diese somit auf zwei laterale Streifen (Kosman *et al.*, 1991). Die dafür verantwortliche regulatorische DNA-Sequenz ist eine 300 Bp-Region, das NEE im 'Enhancer' von *rhombid* (Ip *et al.*, 1992b).



**Abb. 22 Aktivator- und Repressor-Bindungsstellen im NEE des** *rho* **'Enhancers'.** Verändert nach lp *et al.*, (1992b). Die horizontale Linie repräsentiert das NEE von –2 kBp bis –1,7 kBp relativ zum Transkriptionsstart. Kreise, Ovale und Rechtecke repräsentieren hochaffine Bindungsstellen für: Dorsal (d), Snail (s), Twist (t) und bHLH-Proteine (bHLH)

Zusammen mit Dorsal aktivieren 'basische Helix-Loop-Helix' (bHLH) Proteine, z.B. Twist, die Expression von rhomboid in ventrolateralen und ventralen Bereichen des frühen Drosophila Embryos (Ip et al., 1992b). Eine Inaktivierung der Snail Bindungsmotive s1, s3 und s4 (Abb. 22) führte zu einer ventralen Expression von rhomboid, ähnlich derjenigen, die in sna <sup>-</sup> Mutanten beobachtet wurde (Kosman et al., 1991, Ip et al., 1992b). Diese Untersuchungen zeigten, dass ein komplexes Wechselspiel zwischen Aktivatoren und Repressoren die räumlichen Grenzen der rhomboid Expression und anderer Gene im Drosophila Embryo etablieren. Die Anordnung der Aktivator- und Repressor-DNA-Bindungsstellen lässt verschiedene Mechanismen zu, wie Snail die Expression seiner Zielgene reprimiert. Ein Überlappen der Bindungsstellen t2 für den Aktivator Twist und s4 für den Repressor Snail lassen einen Mechanismus vermuten, bei dem die beiden Proteine kompetetiv an die DNA-Bindungsstellen binden (Abb. 22, Ip et al., 1992b, Gray & Levine, 1996a). Ein möglicher "Quenching"-Mechanismus ergibt sich aufgrund der direkten Nachbarschaft des DNA-gebundenen Repressors Snail und der Aktivatoren Dorsal und Twist an den DNA-Bindungsstellen s3 und d2, s4 und t1und s4 und d3. Hierbei inhibieren lokale Protein/Protein Interaktionen zwischen DNA-gebundenen Repressoren und Aktivatoren die Aktivität der Aktivatoren (Abb. 22, Ip et al., 1992b, Gray & Levine, 1996a). Isolierte Repressor DNA-Bindungsstellen im rhomboid 'Enhancer' eröffnen die Möglichkeit eines "direkten" Repressionsmechanismusses. Dabei inhibiert der DNA-gebundene Repressor direkt die Aktivität der generellen RNA-Pol. II Transkriptionsmschinerie (Gray & Levine, 1996a). Der derzeitige Stand der Forschung lässt eine Beteiligung von CtBP an den Snailvermittelten Vorgängen am NEE vermuten (Nibu et al., 1998a und b, siehe auch 1.6.1.).

### 3.7.2. Alternatives Modell

Wie in 3.4. diskutiert, bietet sich eine regulierte Assoziation zwischen Snail und CtBP durch Acetylierung eines Lysinrestes im CtBP-Bindungsmotiv von Snail an. Auslösender Faktor ist dabei die Acetylierung des "molekularen Schalters" in Snail durch eine entwicklungsstadienspezifisch- (zeitabhängig) oder zelltypspezifisch exprimierte Acetylase (siehe 3.5.). Die "Betätigung" des "molekularen Schalters" führt zu einer Veränderung der Komposition des Snail-Komplexes von Snail-CtBP zu Snail-HDAC1.



Abb. 23 Alternatives Modell zur Snail-vermittelten Repression: (A) Snail-CtBP-Komplex gebunden an das hypothetische Gen ABC. X, Y und Z repräsentieren beispielhaft uncharakterisierte Proteine.
(B) Snail-HDAC1-Komplex gebunden an das hypothetische Gen ABC. V und W repräsentieren beispielhaft uncharakterisierte Proteine.
Abb. 23A zeigt eine mögliche Situation an einem beliebigen Gen im Drosophila Embryo. CtBP bindet an sein nicht acetyliertes NH<sub>2</sub>-terminal orientiertes Bindungsmotiv in Snail. Durch die Tendenz, Homodimere zu bilden, wird ein zweites CtBP-Molekül an das COOHterminal orientierte CtBP-Bindungsmotiv rekrutiert. U. U. beeinflusst eine Methylierung des Argininrestes im zweiten CtBP-Bindungsmotiv die Bindung des CtBP-Moleküls (siehe 3.4.). Der Mechanismus, durch den CtBP Repression vermittelt, ist unbekannt. Möglich ist z. B. eine intrinsische enzymatische Aktivität von CtBP, welche die Aktivität der generellen RNA-Pol. II Transkritpionsmaschinerie inhibiert. Denkbar ist auch die Rekrutierung Chromatinmodifizierender Enzyme, die Einfluss auf die Zugänglichkeit der regulatorischen Sequenzen für Aktivatoren nehmen (Abb. 23A, dargestellt durch X, Y und Z). Vorstellbar ist auch, dass CtBP oder weitere rekrutierte Proteine benachbarte DNA-gebundene Aktivatoren kontaktieren und somit deren Funktion inhibieren. Abb. 23B zeigt eine mögliche Situation nach der putativen Acetylierung des "ersten" CtBP-Bindungsmotivs in Snail. Die Affinität von CtBP zu seinem "ersten" Bindungsmotiv in Snail wird stark geschwächt, wodurch beide CtBP-Moleküle von Snail dissoziieren. Dies ermöglicht die Bindung von HDAC1, welches u. U. weitere Proteine rekrutiert (siehe Abb. 23B, repräsentiert durch V und W). HDAC1 vermittelt dann Repression durch Kondensation der Chromatinstruktur (siehe 1.1.) oder durch chemische Modifikation der generellen RNA-Pol. II Transkriptionsmaschinerie. Die in 23A und 23B dargestellten Situationen könnten sequenziell in einer Zelle oder zur gleichen Zeit in verschiedenen Zellen stattfinden.

## 3.8. Perspektiven

Die Idee zur Regulation der differenziellen Bindung von CtBP und HDAC1 an Snail ist rein hypothetisch und basiert auf der Homologie eines konservierten Lysinrestes im CtBP-Bindungsmotiv zwischen dem adenoviralen Protein E1A und Snail (siehe Abb. 19). Im Fall von E1A verhindert die Acetylierung dieses Lysinrestes die Bindung von CtBP (Zhang *et al.*, 2000). Um einen solchen regulatorischen Vorgang auch für Snail zeigen zu können, muss überprüft werden, ob Snail für enzymatische Acetylierung zugänglich ist und ob diese Acetylierung die Bindung zu CtBP beeinflusst. Erste eigene Experimente mit der humanen nukleären Acetylase CBP, die den kritischen Lysinrest in E1A acetyliert, verliefen erfolglos. Studien anderer Gruppen zeigten jedoch, dass für die Acetylierung des CtBP-Bindungsmotivs

Diskussion

in verschiedenen Proteinen spezifische Acetylasen benötigt wurden (Zhang *et al.* 2000, Vo *et al.*, 2001). Alternativ könnte Snail chemisch acetyliert werden, um den Einfluss der Modifikation auf die CtBP Bindung zu überprüfen. Weiterhin muss untersucht werden, ob Snail *in vivo* acetyliert vorliegt. Da die kommerziell erhältlichen *anti*-Acetyl-Lysin Antikörper ihr Antigen im Kontext einer beliebigen Aminosäurekette nur ungenügend detektieren, ist hierzu die Etablierung eines Antikörpers notwendig, der gegen das acetylierte CtBP-Bindungsmotiv in Snail gerichtet ist. X-ChiP (*in vivo* formaldehyde-crosslinked chromatin immunoprecipitation) Experimente mit *anti*-Snail Antikörpern könnten neue regulatorische DNA-Zielsequenzen von Snail identifizieren. Anschließend könnte untersucht werden, ob die Snail-abhängige Regulation dieser Gene HDAC1-vermittelt ist. Somit könnte die Hypothese eines Snail-regulierten "Gastrulationsgensatzes" bestätigt oder widerlegt werden und eine Unterscheidung zwischen zelltypspezifschem oder zeitabhängigem Auftreten des Snail-CtBP- bzw. Snail-HDAC1-Komplexes getroffen werden.

## 4. Material und Methoden

## 4.1. Analyse von DNA

#### 4.1.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Nukleinsäuren absorbieren Licht im UV-Bereich. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm, das von RNA und Proteinen (aromatische Aminosäurereste) bei 280 nm. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung wurde die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm, zur Bestimmung des Grades der Verunreinigung mit RNA und Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm im Spektralphotometer (Amersham) gemessen. Der Quotient der OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ist ein Indikator für den Reinheitsgrad der DNA und liegt bei "reinen" Lösungen zwischen 1,8-2,0. Die Messung fand in einer 100  $\mu$ l Quarzküvette (Hellma) mit einer Schichtdicke von 10 mm statt. Für die Berechnung der DNA-Konzentration wurde folgende konventionelle Maßeinheit angewendet: Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht einer Konzentration von 50  $\mu$ g doppelsträngiger DNA/ml.

#### 4.1.2. Agarosegelelektrophorese von DNA

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats im neutralen pH-Bereich negativ geladen. Die Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld ist infolge des konstanten Ladungs-Masse-Verhältnisses der Nukleinsäuren umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts und darüber hinaus abhängig von der Topologie der Moleküle. Die siebartige Matrix von Agarosegelen erlaubt eine Auftrennung von Nukleinsäuren von 50 Bp bis mehrere 1000 Bp (Sambrook *et al.*, 1989).

Zur Auftrennung wurden 1% ige Agarosegele eingesetzt. Die entsprechende Menge Agarose (Agarose Electrophoresis Grade, Invitrogen) wurde in 1 x TBE (90 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA) durch Erwärmen gelöst und nach Zugabe von Ethidiumbromid (1  $\mu$ g/ml) in "Gelschlitten" gegossen, die mit Gelkämmen versehen wurden. Für analytische Gele wurden "Gelschlitten" der Größe 6 cm x 9 cm (Breite x Länge), für präparative Gele solche der Größe 12 cm x 14 cm (Breite x Länge) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10 x Probenpuffer (1 x TBE; 50% Glycerol; 0,25% Orange G (Fluka)) versetzt, in die Geltaschen eingefüllt und elektrophoretisch aufgetrennt. Bei analytischen Gelen wurden 1 µg DNA in 20 µl Probenvolumen, bei präparativen Gelen 5 bis 15 µg DNA in 50 µl Probenvolumen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker wurde "GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder" (MBI) verwendet. Die DNA wurde mit Hilfe eines UV-Illuminators sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

#### 4.1.3. Automatische Sequenzierung von DNA

DNA Sequenzierungen wurden in unserem Auftrag von der Firma TopLab durchgeführt.

## 4.2. Isolierung und Reinigung von DNA

#### 4.2.1. Ethanol-Präzipitation

Bei der Zugabe von Ethanol zu einer DNA Lösung kommt es in Gegenwart hoher Konzentrationen monovalenter Kationen zur Aggregation und zur nachfolgenden Präzipitation von DNA (Ibelgaufts, 1993).

Zur Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen wurden diese mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumina 100% eiskaltem Ethanol versetzt. Anschließend wurde die Lösung mind. 20 Min bei 0 bis –80°C inkubiert. Die DNA wurde daraufhin durch Zentrifugation (13.000 UpM; 20 Min, 4°C) der Lösung präzipitiert, das Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen und durch erneute Zentrifugation (13000 UpM; 5 Min; 4°C) repräzipitiert. Nachfolgend wurde das Präzipitat im "Vakuum-Konzentrator" (Bachofer) getrocknet und in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris (pH 8,5) resuspendiert.

#### 4.2.2. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das Quiaex II-Kit (Quiagen) verwendet. Es basiert auf einer reversiblen, pH-abhängigen Interaktion von DNA mit einer Glasmatrix (Boyle & Lew, 1995). Im niederen pH-Bereich bindet die DNA an die Glasmatrix und kann nach beliebigen Waschschritten durch Erhöhung des pH-Wertes von der Silikamatrix eluiert werden. Die Isolierung erfolgte genau nach Angaben des Herstellers.

#### 4.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli

#### 4.2.3.1. Schnellmethode zur Reinigung von Plasmid-DNA (Miniprep)

1,5 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie aus einer Ligation (siehe 4.3.3.) angeimpft und ü. N. bei 37°C auf einem Drehrad wachsen gelassen. Die ü.-N.-Kultur wurde durch Zentrifugation (3.000 UpM; 5 Min) pelletiert und nachfolgend in 200 µl Lyse-Puffer (250 µg/ml Lysozym (Sigma); 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 65 mM EDTA (pH 8); 0,4% Triton X-100; 2,5 M LiCl) resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz für 90 Sek bei 100°C gekocht und unmittelbar nachfolgend kurz auf Eis abgekühlt. Durch Zentrifugation des Ansatzes (13.000 UpM; 8 Min) wurden chromosomale DNA und denaturierte Proteine präzipitiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol zum Probenansatz gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (13.000 UpM; 20 Min) präzipitiert, anschließend mit 70% Ethanol gewaschen und durch erneute Zentrifugation (13.000 UpM; 5 Min) repräzipitiert. Das Pellet wurde im "Vakuum-Konzentrator" (Bachhofer) getrocknet, anschließend in 20 µl 10 mM Tris (pH 8,5) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 4.2.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßtsab (Maxiprep)

Die präparative Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde unter Verwendung des Quiagen Plasmids Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die dem Kit zugrunde liegende Technik nutzt das unterschiedliche physikalische Verhalten chromosomaler bakterieller DNA und Plasmid-DNA im pH-Bereich von 12-12,5 (Birnboim & Doly, 1979). Die Bakterien einer LB-Übernachtkultur wurden abzentrifugiert und in Lysepuffer

resuspendiert. Die anschließende Zugabe von NaOH-SDS Puffer führt zu einer pH-Änderung in den basischen Bereich, wodurch die chromosomale DNA denaturiert wird, während die Anwesenheit von SDS zur Denaturierung von Proteinen führt. Plasmid-DNA denaturiert nicht, verliert aber ihren superhelikalen "Twist", d. h. ihre dreidimensionale Struktur. Anschließend erfolgte die Neutralisation des Gemisches durch die Zugabe von 3 M Kaliumacetat und eine Inkubation für 20 Min auf Eis. Während dieser Zeit fallen die Proteine aus, da ihnen durch die hohe Salzkonzentration die Hydrathüllen entzogen werden. Die Plasmide nehmen ihre superhelikale Struktur wieder an, während die chromosomale DNA weitgehend denaturiert bleibt. Anschließend wurde das denaturierte Material durch Zentrifugation aus der plasmidhaltigen Lösung entfernt, und die Plasmide aus der wässrigen Phase mit Hilfe einer Silikamatrix gebunden. Die Plasmide wurden dann nach einer Folge von Waschschritten durch Erhöhung der Salzkonzentration wieder eluiert und durch Zugabe von Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde das getrocknete DNA-Pellet in 200-500  $\mu$ l 10 mM Tris (pH 8,5) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

## 4.3. Modifikation und Rekombination von DNA

#### 4.3.1. Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Typ II-Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die spezifische DNA Sequenzen erkennen und schneiden. Dabei entstehen glatte (blunt ends) oder 5'- bzw. 3'- überhängende (sticky ends) Enden.

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in Volumina von 20  $\mu$ l oder 50  $\mu$ l unter Verwendung der von den Herstellern (New England Biolabs) empfohlenen Reaktionspuffer und angegebenen Temperatur. In der Regel wurden DNA Mengen zwischen 1  $\mu$ g und 15  $\mu$ g verdaut. Die Reaktionsdauer betrug standardmäßig 1 h, die einzige Ausnahme bildete der Verdau von PCR-Fragmenten (siehe 4.3.4.). Da die hier eingesetzten DNA-Mengen sehr groß waren, wurden diese Verdaue über Nacht inkubiert. Die eingesetzte Enzymmenge variierte zwischen 10-50 Einheiten im Reaktionsansatz. Bei partiellen Verdauen wurden Enzymmengen zwischen 1-20 Einheiten eingesetzt und verschiedene Reaktionszeiten von 2 Min bis 1 h getestet. Nicht hitzestabile Restriktionsenzyme wurden, sollten sie negativen Einfluss auf eine Folgereaktion haben, durch Inkubation bei erhöhter Temperatur nach Herstellerangaben inaktiviert. Hitzestabile Restriktionsenzyme wurden durch Agarosegelelektrophorese und anschließende Isolierung der DNA aus dem Gel entfernt (siehe 4.2.2.).

## 4.3.2. Dephosphorylierung der 5´ Enden linearisierter Vektoren

Bei der Ligation von linearen Vektoren und DNA-Fragmenten sind sowohl intra- als auch intermolekulare Reaktionen möglich. Die Abspaltung durch Hydrolisierung des 5'-Phosphat-Restes der Vektor-DNA durch das Enzym alkalische Phosphatase verhindert die Religation linearisierter Vektoren und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit des Einbaus von Fremd-DNA-Fragmenten.

Plasmidvektoren wurden zunächst durch Verdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert. Zur Dephosphorylierung wurde der Restriktionsansatz mit 1/10 Volumen 10 x Dephosphorylierungspuffer (Roche) versetzt und nach Zugabe von 1 Einheit "Shrimp alkalischer Phosphatase" (Roche) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde die alkalische Phosphatase durch Inkubation für 15 Min bei 65°C inaktiviert. Die Effizienz der Dephosphorylierung wurde durch Ligation des Vektors ohne Zugabe von Fremd-DNA kontrolliert.

#### 4.3.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Für den Einbau von Fremd-DNA in einen linearisierten Vektor wurde das rekombinante Enzym DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet. Die "T4 DNA-Ligase" katalysiert die Verknüpfung von freien 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Gruppen doppelsträngiger DNA. Der Einbau von DNA-Fragmenten in Vektoren kann über "sticky end"- oder über "blunt end"-Ligation erfolgen (siehe 4.3.1.). Bei der "blunt end" Ligation können der Vektor und das zu inserierende DNA-Fragment mit zwei unterschiedlichen "blunt end"-Restriktionsenzymen geschnitten worden sein, da in Hinsicht auf die Ligationsreaktion alle "blunt ends" gleich sind. Im Falle der "sticky end"-Ligation müssen die überhängenden Enden des Vektors und des DNA-Fragments zueinander komplementär sein.

Ligationen wurden mit Hilfe des "Quick Ligation Kit" (New England Biolab) durchgeführt. Dabei wurden 200 ng Gesamt-DNA-Menge in einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu$ l eingesetzt. Das molare Verhältnis von Vektor:DNA-Fragment betrug 2:1. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l "Quick T4 DNA-Ligase" wurde der Ansatz für 20 Min – 1 h bei RT inkubiert. Alle eingesetzten Vektoren wurden grundsätzlich dephosphoryliert (siehe 4.3.2.). Nach erfolgter Ligation wurden die Konstrukte in entsprechende *E. coli* Zellen transformiert und zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien auf ampicillinhaltige LB-Platten ausplattiert.

#### 4.3.4. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Anreicherung von DNA-Fragmenten definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von DNA-Molekülen. Man nutzt hierzu die Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einen DNA Einzelstrang zu einem Dopplestrang aufpolymerisieren zu können, sofern ihnen ein kurzer, dopplesträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. In dieser Arbeit wurde die PCR in zwei verschiedenen Strategien eingesetzt. Zum einen wurde die PCR dazu verwendet, bereits klonierte Gene mit neuen Restriktionsschnittstellen zu versehen. Da die Primer Bestandteile des späteren Amplifikationsprodukts sind, können modifizierte Primer dazu verwendet werden, spezifische Schnittstellen für Restriktionsenzyme im 5'- und 3'-Bereich des Gens zu platzieren und somit weitere Klonierungsschritte zu vereinfachen. Weiterhin wurde die PCR dazu eingesetzt, Gene aus einem cDNA-Pool von etwa 0-12 h alten *Drosophila* Embryonen zu amplifizieren (siehe 4.3.5.2.2.).

#### 4.3.5. Expressionskonstrukte

#### 4.3.5.1. Bakterielle Expressionskonstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein Snail (Boulay *et al.*, 1987) und Fragmente davon in einem bakteriellen System exprimiert. Als Expressionsvektoren kamen dabei die Vektoren pET-23a(+)/GST (Novagen, modifiziert FG Dobberstein) und pET19b (Novagen) zum Einsatz. Bei dem Vektor pET-23a(+)/GST handelt es sich um ein Derivat des Vektors pET-23a(+) (Novagen). Das COOH-terminale Histidin-Epitop des Original-Vektors wurde durch ein GST-Epitop ersetzt (FG Dobberstein). Somit wurde Snail als Fusionsprotein mit COOHterminalem GST-Epitop exprimiert. Bei dem Vektor pET19b handelt es sich um einen Vektor, der das gewünschte Protein als Fusionsprotein mit einem NH<sub>2</sub>-terminalen Histidin-Epitop exprimiert. In beiden Vektoren ist die Expression des Gens von Interesse, abhängig von der Polymerase des Bakteriophagen T7 (T7-Polymerase). Die Expression wird durch Zugabe des Induktors Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert.

#### 4.3.5.1.1. pET-23a(+)/GST-snail

Mit Hilfe der PCR (siehe 4.3.4.) wurde die *snail*-cDNA (Boulay *et al.*, 1987) aus dem Vektor pAR-*snail* amplifiziert und durch die Verwendung modifizierter Primer mit einer NdeI- (5<sup>'</sup>) und einer EcoRI- (3<sup>'</sup>) Restriktionsschnittstelle fusioniert. Das aus der Reaktion resultierende DNA-Fragment (ca. 1.200 Bp) wurde durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.1.2.) und aus dem Gel extrahiert (siehe 4.2.2.). Das Fragment wurde ü. N. mit den Restriktionsenzymen NdeI und EcoRI verdaut (4.3.1.), anschließend wieder durch Agarosegelelektrophorese (siehe 4.1.2.) gereinigt und extrahiert (siehe 4.2.2.). Der Vektor pET-23a(+)/GST wurde durch Verdau mit den Restriktionsenzymen NdeI (5<sup>'</sup>) und EcoRI (3<sup>'</sup>) linearisiert (siehe 4.3.1.) und anschließend die 5<sup>'</sup>-Enden durch Verwendung von alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (siehe 4.3.2.). In den linearisierten Vektor wurde die NdeI/EcoRI geschnittene *snail*-cDNA unter Verwendung von T4-Ligase inseriert (siehe 4.3.3.).

Primer mit NdeI-Schnittstelle:

#### 5' CATGCCATGGCG CATATG GCCGCCAACTACAAAAGC 3'

Primer mit EcoRI-Schnittstelle

#### 5' G GAATTC CGCAATAGTGATGGTGCAGTTGGAGCTGGAG 3'

#### 4.3.5.1.2. pET19b-snail-1/253

Als Ursprungsvektor wurde der Vektor pET-FLAG-snail eingesetzt. Er enthält die snailcDNA mit einer NH<sub>2</sub>-terminalen FLAG-Fusion. Das acht Aminosäuren umfassende FLAG-Epitop kann mit dem Restriktionsenzym NdeI von der FLAG-snail-cDNA getrennt werden. pET-FLAG-snail wurde die FLAG-snail-cDNA Aus dem Vektor mit den Restriktionsenzymen NcoI (5') und EcoRI (3') ausgeschnitten (ca.1.800 Bp) und die Restriktionsenzyme in dem Reaktionsansatz hitzeinaktiviert (siehe 4.3.1.). Das 5'-NcoI-EcoRI-3'-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym RsaI verdaut, wodurch ein 5'-NcoI-RsaI-3'-Fragment entstand (ca. 800 Bp). Der Vektor pTßSTOP (Derivat von pGEM4, Promega) wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und HincII linearisiert (siehe 4.3.1.) und die 5'-Enden des Vektors unter Verwendung von alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (4.3.2.). In den linearisierten Vektor wurde die FLAG-snail-cDNA unter Verwendung von

T4-DNA-Ligase inseriert (siehe 4.3.3.). Durch die Fusion der beiden "blunt ends" am 3´-Ende des Fragments entstand ein Stop-Codon bei Aminosäure #253 des Snail-Proteins (*snail*-1/253). Aus dem so entstandenen Vektor pTβSTOP-FLAG-*snail* wurde die *snail*-1/253cDNA mit den Restriktionsenzymen NdeI (5´) und BamHI (3´) ausgeschnitten. Da BamHI eine Schnittstelle im gewünschten Fragment besitzt, wurde der Verdau partiell durchgeführt (siehe 4.3.1.). Der NdeI-Restriktionsschnitt trennte das FLAG-Epitop von der *snail*-1/253 cDNA. Der pET19b Vektor wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI linearisiert (siehe 4.3.1.) und die 5´-Enden durch Verwendung von alkalischer Phosphatase (siehe 4.3.2.) dephosphoryliert. In den linearisierten pET19b Vektor wurde die *snail*-1/253cDNA unter Verwendung von T4-DNA-Ligase inseriert (siehe 4.3.3.).

#### 4.3.5.2. Baculovirus Expressionskonstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die rekombinanten Proteine Snail (Boulay *et al.*, 1987), CtBP (Schaeper *et al*, 1995) und HDAC1 (RPD3, Taunton *et al.*, 1996) mit Hilfe des Baculovirus-Systems exprimiert. Als Baculovirus Expressionsvektor wurde pVL1392HAX (modifizierter pVL1392, Pharmingen, Ruppert S., Berkeley) eingesetzt.

#### 4.3.5.2.1. pVL1392-FLAG-snail (vorher pSVL-FLAG-snail)

siehe Diplomarbeit Belz, T., 1998

#### 4.3.5.2.2. pVL1392-FLAG-CtBP

CtBP wurde aus einem cDNA-Pool von etwa 0-12 h alten *Drosophila* Embryonen mit spezifischen Primern so amplifiziert, dass am 5'-Ende eine NdeI- und am 3'-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle fusioniert wurde (siehe 4.3.4.),. Das aus der Reaktion resultierende DNA-Fragment (ca. 1.200 Bp) wurde durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.1.2.) und aus dem Gel extrahiert (siehe 4.2.2.). Das Fragment wurde ü. N. mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI verdaut (4.3.1.), anschließend wieder durch Agarosegelelektrophorese (siehe 4.1.2.) gereinigt und aus dem Gel extrahiert (siehe 4.2.2.). Aus dem Vektor pVL1392-FLAG-*hunchback* (Beurang, P.) wurde *hunchback* mit den Restriktionsenzymen NdeI (5') und BamHI (3') ausgeschnitten und die 5'-Enden durch Verwendung von alkalischer Phosphatase (siehe 4.3.2.) dephosphoryliert. In den linearisierten

pVL1392-FLAG Vektor wurde *CtBP* unter Verwendung der T4-Ligase inseriert (siehe 4.3.3.).

Primer mit NdeI-Schnittstelle:

5´	GGAATTC CATATG GACAAAAATCTGATGATGCC	3′
Prim	er mit BamHI-Schnittstelle:	
5´	AAATGATATCAAATCAAGAAAAGTAGTAA <b>GGATCC</b> CG	3′

#### 4.3.5.2.3. HDAC1-His/C

Die Expression von *Drosophila hdac1* erfolgte unter Verwendung eines bereitgestellten Baculoviruses der HDAC1 als Fusionsprotein mit COOH-terminalem Histidin-Epitop exprimierte (Huang & Kadonaga, 2001).

## 4.4. DNA-Transfer in *E. coli* Bakterien

#### 4.4.1. Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

Zum Einsatz kam eine modifizierte Methode nach Okayama (Inoue *et al.*, 1990). 250 ml LB-Medium (20 g/L LB Broth, Amersham) wurden mit 5 ml einer Ü.-N.-Kultur des *E. coli* Stammes XL1-Blue (Stratagene) angeimpft, bei 18°C bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,6 wachsen gelassen (etwa 31 h) und anschließend für 10 Min auf Eis gekühlt. Dann wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (ca. 3.000 x g; 10 Min; 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 80 ml eiskaltem "Tbjap" (Pipes 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 15 mM; KCl 250 mM; einstellen mit KOH auf pH 6,7 dann 55 mM MnCl<sub>2</sub>; steril filtrieren!) durch schwenken resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 Min auf Eis gekühlt und erneut zentrifugiert (ca. 3.000 x g; 10 Min; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und nach Resuspendierung des Pellets in 18,6 ml eiskaltem "Tbjap" 1,4 ml DMSO (Endkonz. 7%) zugegeben. Die Suspension wurde für 10 Min auf Eis gekühlt, anschließend in Krytoröhrchen alliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur weitern Verwendung wurden die kompetenten Bakterien bei  $-80^{\circ}$ C gelagert. Alle verwendeten Materialien und Lösungen sollten vorgekühlt sein und alle Arbeitsschritte auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt werden.

#### 4.4.2. Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide tragen als Selektionsmarker das Antibiotikaresistenzgen *amp*. Es codiert für das Enzym  $\beta$ -Lactamase und erlaubt es den Bakterien, in Ampicillin-haltigen Medien zu wachsen.

100 µl kompetente Bakterien (siehe 4.4.1.) wurden mit 0,1-1 µg DNA oder 10 µl Ligationsansatz (siehe 4.3.3.) versetzt und 20 Min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 2 Min bei 42°C und nachfolgend kurz auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden 0,7 ml LB-Medium zugegeben und die Suspension 45 Min bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (600 x g; 5 Min) und der Überstand bis auf einen kleinen Rest (ca. 50 µl) abgenommen. Das Pellet wurde in dem verbleibenden Medium resuspendiert und zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien auf ampicillinhaltige LB-Platten (200 µg/ml Ampicillin, LB Agar, Amersham) ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert. Die ampicillinresistenten Kolonien wurden zum Animpfen von "Miniprep-Kulturen" (siehe 4.2.3.1.) oder "Maxiprep-Kulturen" (siehe 4.2.3.2.) eingesetzt.

## 4.5. Protein-Analytik

#### 4.5.1. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

von Proteinen nach ihrem Molekluargewicht erfolgte Die Auftrennung durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit einem SDS/Tris/Glycin-Puffersystem (25 mM Tris; 1.920 mM Glycin; 0,1% SDS) nach Laemmli (1970). Zur Auftrennung der Proteine wurde eine polymerisierte Acrylamid/Bisacrylamid-Matrix (AA/BAA; 37,5:1) eingesetzt. Die Porengröße und damit die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in einem elektrischen Feld kann durch Variation der AA/BAA-Konzentration variiert werden. Je nach Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine wurden 10-12,5% ige Polyacrylamidgele verwendet. Zuerst wurde das Trenngel (10-12,5% AA/BAA; 375 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,1% SDS; 0,1% TEMED; 0,6% APS) zwischen zwei Glasplatten mit Abstandshalter (13,3 cm x 8,7 cm, Bio-Rad) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol mit Wasser entfernt, das Sammelgel (4,2% AA/BAA; 125 mM Tris-HCl (pH 6,8); 0,1% SDS; 0,1% TEMED; 0,6% APS) auf das Trenngel gegossen und sofort ein Kamm in die Lösung

Material und Methoden

geschoben. Die Proben wurden 1:1 mit einem 2 x Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% Glycerol; 5%  $\beta$ -Mercptoethanol; 3% SDS; 1 Spatelspitze Bromphenolblau, filtrieren) versetzt, 5 Min bei 100°C inkubiert, zentrifugiert (16.000 x g; 5 Min) und der Überstand auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 100 V gestartet und nach Einlaufen der Proben in das Trenngel auf 200 V erhöht. Als Referenz wurde ein Standard-Protein Molekluargewichtsmarker mit auf das Gel aufgetragen (Prestained Protein Marker, New England Biolabs). Durch das Kochen der Proben in Probenpuffer wird die dreidimensionale Struktur der Proteine zerstört. Durch das Anlagern des negativ geladenen SDS an die Proteine in einem konstanten Gewichtsverhältnis, bewegen sich diese in einem elektrischen Feld entsprechend ihrem Molekluargewicht zur Anode hin.

#### 4.5.2. Zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der zweidimensionalen SDS-PAGE (2D-PAGE) werden die Proteine nach zwei unterschiedlichen Parametern aufgetrennt, ihrem isoelektrischen Punkt und ihrem Molekulargewicht. Der Vorteil dieser Methode liegt in der reproduzierbaren Darstellung komplexer Proteingemische.

Zur isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurden vorgefertigte Gelstreifen mit einem immobilisierten pH Gradient von pH 3-10 (Immobiline Dry Strip (pH 3-10); 18 cm; Amersham) eingesetzt. Die Gelstreifen lagen in dehydrierter Form vor, der Probenauftrag erfolgte durch Einquellen der Probe in die Gelstreifen. Dazu wurden 250 µl mit Kernextrakt oder Puffer inkubierte Snail-Beads (siehe 4.7.2.) 2 h mit Lyse-Puffer (9 M Urea; 2% CHAPS) inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Rehydrierungspuffer (IPG-Puffer (pH 3-10), Amersham) auf 350 µl aufgefüllt. Zusammen mit der Probenlösung wurden die Gelstreifen in einer speziellen "Rehydrierungskammer" ü. N. inkubiert. Dabei wurde die Probenlösung vollständig von den Gelstreifen aufgenommen, die Proteine waren gleichmäßig über den Proteingradienten verteilt. In der folgenden Fokussierung wurde der gequollene Gelstreifen einem elektrischen Feld ausgesetzt, das saure Ende zur Anode gerichtet (IPGphor IEF System, Amersham). Die Proteine orientieren sich im elektrischen Feld so, dass sie sich an dem Punkt im Gelstreifen fokussieren, an dem der pH-Wert ihrem pI-Punkt entspricht. Da die Beschleunigung, die die Proteine bei Anlegen der Spannug erfahren umso größer ist, je weiter sie von ihrem pI entfernt sind, wurde die Spannung, um Aggregation der Proteine zu vermeiden, langsam erhöht:

30 V	5 h
60 V	5 h
200 V	2 h
500 V	2 h
1.000 V	2 h
Erhöhung von 1.000 V auf 8.	000 V 2 h
8.000 V	6 h

Nach der IEF wurde der Gelstreifen 10 Min in Aquillibrierungspuffer + 1% DTT (Trenngelpuffer; 6M Urea; 30% Gylcerin; 2% SDS) und anschließend 10 Min in Aquillibrierungspuffer +4,6% Jodazetamid auf einem Schüttler inkubiert. Die Auftrennung in der zweiten Dimension nach Molekluargewicht entspricht im Wesentlichen dem Protokoll für die eindimensionale SDS-PAGE (siehe 4.5.1.). Zuerst wurde das Trenngel (10% AA/BAA; 375 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,1% SDS; 0,1% TEMED; 0,6% APS) zwischen zwei Glasplatten mit Abstandshalter (18 cm x 17 cm) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol mit Wasser entfernt, der gequollene Gelstreifen waagerecht auf das Trenngel gelegt und mit 1% iger Agaroselösung eingegossen. Zum Auftrag eines Molekulargewichtsmarkers wurde mit Hilfe eines Abstandhalters eine Tasche in der Agaroseschicht geschaffen. Das Gel wurde mit 150 V gestartet und nach Einlaufen der Probe in das Trenngel wurde auf 250 V erhöht.

#### 4.5.3. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (siehe 4.5.1.) im SDS-Gel sichtbar zu machen, wurden die Gele für 1 h mit einer Coomassie-Färbelösung (0,25% Brilliant Blue R250 (Serva); 45% Methanol; 10% Essigsäure) inkubiert. Anschließend wurde das Gel durch Inkubation mit Entfärbelösung (45% Methanol; 10% Essigsäure) so lange entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Gelhintergrund abhoben. Das gefärbte Gel wurde zur Dokumentation in nassem Zustand digitalisiert.

## 4.5.4. Färbung von SDS-Gelen mit "kolloidalem" Coomassie

Nach Angaben des Herstellers ist die Färbung mit 'Colloidal Blue Stain Kit' (Novex) etwa fünfmal sensitiver als die herkömmliche Coomassie-Färbung (siehe 4.5.3.). Die Gele wurden gemäß des empfohlenen Protokolls für SDS-Gele, die unter Verwendung des Tris/Glycin Puffersystems gelaufen sind, gefärbt.

## 4.5.5. Western-Blot Analyse

Bei dem hier angewendeten Verfahren werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (siehe 4.5.1.) aus einem SDS-Gel durch eine angelegte Spannung (Protein-SDS-Komplexe wandern zur Anode) auf eine Nitrocellulose- (Optitran BA-S 85 Reinforced NC, Schleicher & Schuell) oder PVDF-Membran (Westran PVDF, Schleicher & Schuell), abhängig vom verwendeten Antikörper, übertragen. Das ursprüngliche im Gel enthaltene Trennmuster bleibt auf der Membran erhalten. Durch Einsatz bestimmter Antikörper können einzelne Proteinbanden spezifischen Proteinen zugeordnet werden. Vor dem Transfer wurden sowohl das Gel als auch die Membran 10 Min in Transferpuffer (SDS-PAGE-Laufpuffer ohne SDS; 20% Methanol; 0,01% SDS) äquilibriert. PVDF-Membranen müssen vor der Äquillibrierung mit Methanol benetzt werden. Der Transfer selbst erfolgte im Nassverfahren (Mini Trans-Blot Transfer Cell, Bio-Rad) mit 300 mA für die verwendeten Mini-Gele (6 x 8 cm) für 60-90 Min. Nach dem Transfer folgte die Immunodetektion, wobei in dieser Arbeit zwei Methoden angewendet wurden: die ECL-Plus Detektion (siehe 4.5.5.1.) und die alkalische Phosphatase (AP) Detektion (siehe 4.5.5.2.). Die beiden Methoden unterscheiden sich durch das zur Detektion verwendete Enzym.

Erst-Antikörper, eingesetzte Verdünnung:

- anti-Snail aus Kaninchen (siehe 2.2.), 1:40.000
- anti-Glutathion-S-Transferase aus Kaninchen (Sigma), 1:5.000
- anti-polyHistidin aus Maus (Sigma), 1:2.000
- anti-FLAG M2 aus Maus (Sigma), 1:2.000
- anti-CtBP aus Ratte (M. Levine), 1:40.000
- anti-HDAC1 aus Kaninchen (B. Turner), 1:2.000

#### 4.5.5.1. ECL-Plus Immunodetektion

Für die ECL-Plus Detektion wurde das "ECL-Plus Western Blotting Detection System" (Amersham) eingesetzt, das nach Herstellerangaben bis zu 200 x sensitiver als herkömmliche Detektionsverfahren ist. Das System basiert auf der enzymatischen Umsetzung eines Substrats (Lumigen PS-3) zu einem Ester, der mit Wasserstoffperoxid zu einem chemilumineszenten Produkt reagiert. Als Enzym wurde an *anti*-Maus, *anti*-Kaninchen und *anti*-Ratte Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (engl. 'horseradish peroxidase', HRP) eingesetzt.

Die Membranen wurden für 1 h mit Blocklösung (TBST: 20 mM Tris-Base; pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,1% Tween20 und 5% Skim-Milk-Powder) bei RT inkubiert, 3 x mit TBST gespült und 2 x 10 Min mit TBST auf einem Schüttler gewaschen. Alternativ wurde mit der Blocklösung ü. N. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x mit TBST gespült und 1 h bei RT mit dem Erst-AK inkubiert. Nachfolgend wurde die Memban 3 x mit TBST gespült und 2 x 10 Min mit TBST auf einem Schüttler gewaschen. Daraufhin wurde die Membran 1 h mit dem HRP-gekoppelten Zweit-Antikörper bei RT inkubiert, wieder 3 x mit TBST gespült und 2 x 10 Min mit TBST auf einem Schüttler gewaschen. Danach folgte eine fünfminütige Inkubuation mit der ECL-Plus Detektionslösung (Detektionslösung A:B, 40:1). Die Membran wurde für eine Zeitdauer von 0,5 Sek - 5 Min auf einem Film (X-OMAT AR, Kodak) exponiert. Der Film wurde in einem Hyperprocessor (Amersham) entwickelt und zur Dokumentation digitalisiert.

Zweit-Antikörper, alle 1:5.000 verdünnt eingesetzt:

- Peroxisdase labelled anti-rabbit antibody (Amersham)
- Peroxisdase labelled anti-mouse antibody (Amersham)

-anti-rat Ig Horseradish Peroxidase linked whole antibody (Amersham)

#### 4.5.5.2. Alkalische Phosphatase Immunodetektion

Die alkalische Phosphatase Detektion beruht auf der enzymatischen Umsetzung der chromogenen Substrate 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazolium (NBT) durch die alkalische Phosphatase zu blauem Indigo bzw. purpurfarbenem Diformazan. Beide Reaktionsprodukte heben sich farblich von der Membran ab. Die alkalische Phosphatase wurde an *anti*-Maus und *anti*-Kaninchen AK gekoppelt eingesetzt. Mit der Ausnahme der Verwendung eines unterschiedlichen Zweit-Antikörpers und der damit unterschiedlichen Detektion gleichen sich die Protokolle der HRP- und der alkalischen Phosphatase Immunodetektion in Bezug auf Inkubationszeiten, Temperaturen und Puffer (siehe 4.5.5.1.). Die Detektion erfolgte durch Inkubation der Membran mit 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP in AP-Puffer (20 mM Tris-Base; (pH 9,5); 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>). Die Reaktion wurde nach ausreichender Intensität der Signale mit Wasser gestoppt und die Membran zur Dokumentation digitalisiert.

Zweit-Antikörper, alle 1:5.000 verdünnt eingesetzt: - *Anti*-Mouse IgG AP (H&L) Conjugate (Promega) - *Anti*-Rabbit IgG AP (Fc) Conjugate (Promega)

#### 4.5.6. Identifikation von Proteinen durch Massenspektroskopie

Proteine wurden in unserem Auftrag von der zentralen Einheit für Biomolekulare Chemie des ZMBH's durch Massenspektroskopie identifiziert.

## 4.6. Expression und Reinigung von Proteinen

#### 4.6.1. Proteinexpression in und Proteinreinigung aus E. coli

Zur bakteriellen Expression kam der *E. coli* Stamm "BL21-Codon Plus RP" (Stratagene) in Kombination mit dem "pET" Expressionsystem der Firma Novagen zum Einsatz.

#### 4.6.1.1. Snail-GST/C

Der Vektor pET-23a(+)/GST-*snail* (siehe 4.3.5.1.1.) wurde in den *E. coli* Stamm BL21-Codon Plus (DE3) RP transformiert (siehe 4.4.2.) und eine 20 ml LB Ü.-N.-Kultur angeimpft. Mit dieser wurde eine 1 L LB-Kultur angeimpft, welche auf einem Schüttler bei 18°C zu einer OD<sub>600</sub>=0,6 wachsen gelassen wurde. Die Kultur wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und weitere 4 h bei 18°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (3000 x g, 10 Min) pelletiert und in 50 ml PBS (7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,5) resuspendiert. Die Suspension wurde mit 2 mg/ml Lysozym (Merck) versetzt und 45 Min bei 4°C gerührt. Anschließend wurde die Suspension sonifiziert (12 x 5 Sek; 60% Intensität; Branson Digital Sonifier 450-D) und zentrifugiert (ca. 45.000 x g; 20 Min). Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter filtriert und das Filtrat auf eine GST-Affinitätssäule (GST-Trap 1 ml, Amersham) mit Hilfe eines Chromatographie-Systems (ÄKTA FPLC, Amersham) bei 4°C aufgetragen. Nicht gebundene Proteine wurden mit PBS weggewaschen, gebundene Proteine anschließend mit Elutionspuffer (50 mM Tris (pH 8); 10 mM red. Glutathion (Sigma); 2 mM DTT (Amersham); 0,1% Triton X100 (Merck)) von der Säule in 200 µl Fraktionen eluiert. Die Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe 4.5.1.), das Gel Coomassie gefärbt (siehe 4.5.3.) und die Snail-GST/C-positiven Fraktionen vereinigt. Die Proteinlösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 4.6.1.2. His-Snail-1/253

Der Vektor pET19b-snail-1/253 (siehe 4.3.5.1.2) wurde in den E. coli Stamm BL21-Codon Plus (DE3) RP transformiert (siehe 4.4.2.) und eine LB-Über-Nacht-Kultur angeimpft. Mit dieser wurde ein 6 L LB-Kultur 1:50 angeimpft und diese bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,6 wachsen gelassen. Dann wurde die Kultur mit 1 mM IPTG induziert und weitere 2 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (3000 x g; 10 Min) und in 90 ml Denaturierungspuffer (50 mM Tris (pH 8); 6 M Guanidin-hydrochlorid; 200 mM NaCl; 5 mM Imidazol) resuspendiert. Die Suspension wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend zentrifugiert (ca 45.000 x g; 20 Min). Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter filtriert und auf eine 25 ml Ni<sup>2+</sup>-Chelating-Säule (Chelating Sepharose Fast Flow, Amersham) mit Hilfe eines Chromatographiesystems (ÄKTA FPLC, Amersham) bei 4°C aufgetragen. Nicht gebundene Proteine wurden mit Denaturierungspuffer weggewaschen und gebundene Proteine mit stufenförmig steigender Imidazolkonzentration (100 mM; 200 mM; 250 mM; 300 mM; 500 mM; 1000 mM) in 10 ml Fraktionen eluiert. Die Fraktionen #15-19 (siehe Abb. 8A) wurden gepoolt und gegen 4 L Dialysepuffer (100 mM Tris (pH 8); 1 M Arginin (Applichem); 50 mM NaCl; 1,5 mM EDTA; 10 mM DTT (Amersham)) ü. N. bei 4°C dialysiert. Die Verlustmenge wurde mit Dialysepuffer ersetzt (wichtig!). Anschließend wurde die Proteinlösung für mehrere Stunden bei 4°C gegen 5 L Auftragspuffer (25 mM Hepes (pH 8); 10% Glycerol; 0,5 M NaCl; 10 mM DTT (Amersham)) dialysiert. Die Proteinlösung wurde mit Hilfe eines Chromatographiesystems bei 4°C auf eine Anionentauschersäule (Hi-Trap Sepharose Q 5 ml, Amersham) aufgetragen und nicht gebundene Proteine mit Auftragspuffer weggewaschen. Gebundene Proteine wurden mit Elutionspuffer (25 mM Hepes (pH 8); 1 M NaCl, 10% Glycerol) in 10 ml eluiert. Anschließend erfolgte ein Pufferwechsel unter Verwendung einer Entsalzungsäule (HiPrep 26/10 Desalting Column, Amersham) in Kopplungpuffer (50 mM Tris (pH 8,5); 5 mM EDTA). Das so gereinigte Protein wurde zur Immunisierung von Kaninchen (siehe 4.10.1.) und zur Reinigung des *anti*-Snail AK aus dem Kanichenserum (siehe 4.10.2.) eingesetzt.

#### 4.6.2. Proteinexpression in und Proteinreinigung aus Sf9-Zellen

Baculoviren sind eine Gruppe von großen, doppelsträngigen DNA-Viren, die diverse Insekten als natürliche Wirte haben. In Zellkultur können verschiedene Zellinien als Wirte dienen, wobei im Rahmen dieser Arbeit mit *Sf9*-Zellen gearbeitet wurde, einer Zellinie des Lepidoptera *Spodoptera frugiperda*. Zur Herstellung rekombinanter Baculoviren wurden eine lineare Baculovirus-DNA mit einer lethalen Deleteion und ein komplementierender Transfervektor, der das zu exprimirende Gen unter der Kontrolle eines Viruspromotors trug, in die Insektenzelle kotransfiziert. Dort kommt es zur Rekombination der beiden DNAs, zur Bildung vermehrungsfähiger Baculoviren und zur Expression des Proteins von Interesse.

#### 4.6.2.1. Primär-Transfektion

Die *Sf9*-Zellen wurden in Suspension als "Spinner-Kultur" in serumhaltigem Medium kultiviert (SF900 II-Medium; 1% Pluronic F-68; 1% L-Glutamin 200 mM; 1% Penicillin-Streptomycin; 10% Foetal Bovine Serum; Gibco). Zur Primärtransfektion wurden 1 x  $10^6$  *Sf9*-Zellen in einer Kavität einer 6-Kavitäten Zellkulturplatte ausgesäät. Lösung A (175 ng Baculo Gold-DNA (Pharmingen); 1,3-1,5 µg Transferplasmid-DANN; 33 µl Medium serumfrei (SF900 II-Medium; 1% Pluronic F-68; 1% L-Glutamin 200 mM; 1% Penicillin-Streptomycin, Gibco)) und Lösung B (10 µl Lipofectin Reagent; 23 µl SF900 II-Medium serumfrei, Gibco) wurden gemischt und 15 Min bei RT inkubiert. Die mittlerweile abgesetzten *Sf9*-Zellen in der 6-Kavitäten Zellkulturplatte wurden 3 x mit serumfreien SF900 II-Medium gewaschen. Anschließend wurden 440 µl serumfreies Medium zu Mischung AB und die komplette Mischung auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit der Mischung 15 h auf einer Wippe bei RT inkubiert. Danach wurde die Transfektionslösung wieder abgenommen, die Zellen 1 x

mit serumhaltigem Medium gewaschen und mit 2 ml serumhaltigem Medium für 5 Tage bei 27°C inkubiert. Dann wurde der virenhaltige Überstand abgenommen, zentrifugiert (ca. 220 x g; 5 Min; 4°C) und der klare Überstand bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

#### 4.6.2.2. Amplifikation des rekombinanten Viruses

Zur Amplifikation der Baculoviren wurden 7,5-10 x  $10^6$  *Sf*9-Zellen aus einer "Spinner Kultur" mit etwa 8 x  $10^5$  - 1,5 x  $10^6$  Zellen/ml auf einer 10 cm Ø Zellkultur-Platte ausgesäät. Nach Absetzen der Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 2,5 ml serumhaltiges Medium und 1 ml des Virenüberstandes der Primär-Transfektion (siehe 4.6.2.1.) ersetzt. Die Platte wurde für 1 h langsam bei RT gewippt. Danach wurden 10 ml serumhaltiges Medium zugesetzt und die Platte 5 Tage stehend bei 27°C inkubiert. Dann wurde der virenhaltige Überstand abgenommen, zentrifugiert (ca. 800 x g; 5 Min; 4°C) und der klare Überstand bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

#### 4.6.2.3. Reamplifikation des rekombinanten Viruses

 $20 \ge 10^6 Sf$ 9-Zellen wurden aus einer "Spinner Kultur" mit etwa  $8 \ge 10^5 - 1.5 \ge 10^6$  Zellen/ml auf einer 15 cm  $\emptyset$  Zellkultur-Platte ausgesäät. Nach dem Absetzen der Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 5 ml serumhaltiges Medium und 50–200 µl des virenhaltigen Überstandes der Amplifikation (siehe 4.6.2.2.) ersetzt. Die Platte wurde dann für 1 h langsam bei RT gewippt. Nachfolgend wurden 15 ml serumhaltiges Medium zugegeben und der Ansatz 5 Tage stehend bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde der virenhaltige Überstand abgenommen, zentrifugiert (ca. 800  $\ge$  g; 5 Min; 4°C) und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

#### 4.6.2.4. Expression rekombinanter Proteine in Sf9-Zellen

Je nach benötigter Menge kann das Protein in Monolayer-Kultur in Zellkulturschalen oder in Suspension in einer "Schüttelkultur" exprimiert werden.

#### 4.6.2.4.1. Monolayer-Kultur

20 x  $10^6$  *Sf9*-Zellen wurden aus einer "Spinner Kultur" mit etwa 8 x  $10^5$  - 1,5 x  $10^6$  Zellen/ml auf einer 15 cm  $\emptyset$  Zellkultur-Platte ausgesäät. Nach dem Absetzen der Zellen wurde das Medium abgenommen, durch 5 ml serumhaltiges Medium und 400-1000 µl des virenhaltigen Überstandes der Reamplifikation (siehe 4.6.2.3.) ersetzt und die Platte für 1 h bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurden 15 ml serumhaltiges Medium zugegeben und 2 Tage stehend bei 27°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit einem "Teigschaber" vom Plattenboden gelöst und durch Zentrifugation (ca. 800 x g; 10 Min; 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Puffer aufgenommen. Die Menge und die Zusammensetzung des Resuspendierungspuffer hing von der Art des exprimierten Proteins und damit von der Reinigungsstrategie ab (siehe 4.6.2.5.).

#### 4.6.2.4.2. "Schüttelkultur"

Da die Gewinnung großer Proteinmengen aus der Monolayer-Kultur (siehe 4.6.2.4.1.) sehr zeitaufwendig und kostenintensiv ist, wurden größere Mengen Protein aus "Schüttelkulturen" gewonnen.

Dazu wurden etwa 200 ml *Sf*9-Zellen aus der "Spinner-Kultur" mit etwa 1,5-2 x  $10^{6}$ -Zellen in einen sterilen 5 L Erlenmeyerkolben überführt und 200 ml serumhaltiges Medium zugegeben. Der Suspension wurden 400–1000 µl Virenüberstand/ml Suspension (siehe 4.6.2.3.) zugesetzt und die Suspension 2 Tage bei 27°C auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (ca. 800 x g; 10 Min; 4°C) pelletiert und in Puffer resuspendiert. Die Menge und die Zusammensetzung des Resuspendierungspuffer hing von der Art des exprimierten Proteins und damit von der Reinigungsstrategie ab (siehe 4.6.2.5.).

Mit dem Baculovirussystem wurden folgende Proteine exprimiert:

- FLAG-Snail (siehe 4.3.5.2.1.)
- FLAG-CtBP (siehe 4.3.5.2.2.)
- HDAC1-His/C (siehe 4.3.5.2.3.)

# 4.6.2.5. Aufschluss von Sf9-Zellen und Reinigung der in Sf9-Zellen exprimierten Proteine

Die in dieser Arbeit aus *Sf*9-Zellen gewonnen rekombinanten Proteine wurden entweder als FLAG- oder als Histidin-Fusionsproteine exprimiert und somit durch unterschiedliche Strategien gereinigt.

#### 4.6.2.5.1. FLAG-Snail und FLAG-CtBP

Zur Reinigung der FLAG-Fusionsproteine wurde eine FLAG-Affinitätsmatrix eingesetzt (*Anti*-FLAG M2-Agarose, Sigma), welche das FLAG-Epitop unabhängig von seiner Lokalisation im Protein bindet.

Das Pellet der FLAG-Snail bzw. FLAG-CtBP exprimierenden Zellen (siehe 4.6.2.4.) wurde in 0,5 M NaCl-HEMG 0,1% NP40 (HEMG: 25 mM Hepes (pH 7,6); 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM EDTA; 10% Glycerol) resuspendiert. Für "Monolayer-Kulturen" (siehe 4.6.2.4.1.) wurden 1 ml Puffer/Platte, für "Schüttelkulturen" (siehe 4.6.2.4.2.) 1 ml Puffer/1,2 x 10<sup>7</sup> Zellen eingesetzt. Die Suspension wurde 2 x in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei RT aufgetaut. Anschließend wurde die Suspension sonifiziert (6 x 5 Sek; 60% Intensität) und dann zentrifugiert (ca. 45.000 x g; 20 Min; 4°C). Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter filtriert, 0,2 mM PMSF zugesetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die FLAG-Beads wurden vor der Verwendung 1 x mit 1 M NaCl-HEMG 0,1% NP40 gewaschen. Je 100 µl der FLAG-Matrix wurden mit 10 ml Sf9-Ganzzellextrakt, der rekombinantes FLAG-Fusionsprotein beinhaltete, ü. N. oder mindestens 4 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert . Als spätere Kontrolle wurden je 100 µl FLAG-Matrix mit 10 ml Wildtyp Sf9-Ganzzellextrakt inkubiert. Die mit FLAG-Fusionsproteinen beladenen Beads (FLAG-Snail-Beads, FLAG-CtBP-Beads) oder mit Sf9-Ganzzellextrakt inkubierten Beads (WT-Beads) wurden 1 x mit stringentem Waschpuffer (HEMG; 1 M NaCl; 1% CHAPS; 1% NP40) gespült sowie 1 x 10 Min mit stringentem Waschpuffer und 3 x 10 Min mit weniger stringentem Waschpuffer (HEMG; 0,8 M NaCl; 0,1% NP40) auf einem Drehrad gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Beads durch Zentrifugation (ca. 220 x g; 3 Min) pelletiert. Abschließend wurden die beladenen Beads mit 0,5 M NaCl-HEMG 0,1% NP40 gespült. Wurden die Proteine in den Experimenten in immobilisierter Form eingesetzt, so wurden sie in einer 1:1 Mischung von Beads und 0,5 M NaCl-HEMG 0,1% NP40 bei 4°C maximal 2 Tage gelagert. Wurde das Protein in nicht immobilisierter Form benötigt, so wurde es unter Verwendung eines Peptides, das dem Antigen des *anti*-FLAG M2 Antikörpers entspricht, von den Beads eluiert. Dazu wurden die Beads 1:1 mit Elutionspuffer (HEMG; 0,2 M NaCl; 1 mg/ml FLAG-Peptid; 0,1% NP40) ü. N. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Beads durch Zentrifugation (16.000 x g; 20 Min) pelletiert, der Überstand abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert. Zur Analyse durch SDS-PAGE (siehe 4.5.1.) wurden je 1-5 µl beladene Beads oder eluiertes Protein auf das SDS-Gel aufgetragen.

#### 4.6.2.5.2. HDAC1-His/C

Eine Wiederholung von Histidinresten in einem Protein bindet konformationsunabhängig zweiwertige Kationen wie z. B. Ni<sup>2+</sup>. Dies macht man sich bei der Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen zunutze, indem man Ni<sup>2+</sup>-beladene Materialien zur Affinitätsreinigung einsetzt.

Das Pellet von etwa 5,5 x  $10^8$  HDAC1-His/C exprimierenden *Sf9*-Zellen (siehe 4.6.2.4.) wurde in 55 ml Histidin-Bindungs Puffer (20 mM Tris (pH 7,9); 0,5 M NaCl; 5 mM Imidazol) resuspendiert. Die Suspension wurde 2 x in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgetaut und anschließend sonifiziert (6 x 5 Sek; 60% Intensität). Das Lysat wurde zentrifugiert (45.000 x g; 20 Min, 4°C) und der Überstand durch einen 0,45 µm Filter filtiert. Der Überstand wurde unter Verwendung eines Chromatographiesystems (ÄKTA FPLC, Amersham) auf eine mit Ni<sup>2+</sup>-gesättigte Chelating-Säule (HiTrap Chelating HP 1 ml, Amersham) aufgetragen. Nicht gebundene Proteine wurden weggewaschen und gebundene Proteine mit Elutionspuffer (20 mM Tris (pH 7,9); 0,5 M NaCl; 1 M Imidazol) in 1 ml Fraktionen eluiert. Je 5 µl der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (siehe 4.5.1.) und anschließende Coomassie-Färbung (siehe 4.5.3.) analysiert.

## 4.7. Protein/Protein Interaktionsstudien

In dieser Arbeit kamen verschiedene Strategien zur Untersuchung von Protein/Protein Interaktionen zum Einsatz. Es wurden Interaktionen zwischen isolierten rekombinanten Proteinen (siehe 4.7.1.) oder zwischen rekombinanten und endogenen Proteinen untersucht (4.7.2.). Weiterhin wurden Immunopräzipitationsexperimente mit einem *anti*-Snail AK und embryonalem *Drosophila* Kernextrakt durchgeführt (4.7.3.).

#### 4.7.1. Kopräzipitation von rek. HDAC1 mit rek. Snail

Snail wurde für dieses Experiment als COOH-terminales GST-Fusionsprotein (Snail-GST/C) in Bakterien exprimiert und aus diesen gereinigt (siehe 4.6.1.1.), während HDAC1 als COOH-terminales Histidin Fusionsprotein in *Sf9*-Zellen exprimiert und aus diesen gereinigt wurde (siehe 4.6.2.5.2.).

Je 2 µg HDAC1-His/C wurden mit je 1 µg Snail-GST/C oder GST in 1 ml Bindungspuffer (PBS (pH 7,5); 0,1% Triton X100; 2 mM DTT) ü. N. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden je 10 µl Glutathion Sepharose (Glutathione Sepharose 4B, Amersham) zugegeben und 1 h bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Die Glutathion Sepharose wurde dann durch Zentrifugation (ca. 800 x g; 3 Min) pelletiert und 3 x 10 Min mit Bindungspuffer gewaschen. Danach wurde der Überstand mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle (0,4 x 20 mm) vollständig abgenommen, 30 µl 2 x SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% Glycerol; 5% β-Mercaptoethanol; 3% SDS; 1 Spatelspitze Bromphenolblau, filtrieren) zugegeben und der Ansatz 5 Min bei 100°C inkubiert. Die Glutathion Sepharose und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (16.000 x g; 5 Min) pelletiert und je 10 µl Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe 4.5.1.). Die Auswertung erfolgte durch Western-Blot Analyse (siehe 4.5.5.) mit Hilfe von *anti*-GST-(siehe Abb. 13A) und *anti*-Histidin- (siehe Abb. 13B) Antikörpern.

#### 4.7.2. Kopräzipitation von endogenen Faktoren aus Kernextrakt

Zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Snail und CtBP (siehe 2.3.) bzw. HDAC1 (siehe 2.4.2.2.) und zwischen CtBP und HDAC1 (siehe 2.5.) wurde auf FLAG-Beads (*Anti-*FLAG M2-Agarose, Sigma) immobilisiertes FLAG-Snail bzw. FLAG-CtBP mit 12 h *Drosophila* Kernextrakt inkubiert und die kopräzipitierten Proteine durch Western-Blot Analyse untersucht.

Als "Köderproteine" wurde in *Sf*9-Zellen exprimiertes FLAG-Snail bzw. FLAG-CtBP auf einer FLAG-Matrix immobilisiert (siehe 4.6.2.5.1.). Standardmäßig wurden 100 µl der beladenen Beads bzw. 100 µl WT-Beads als Kontrolle (siehe 4.6.2.5.1.) mit 2 ml (1:5 verd. mit 0,1 M NaCl-HEMG) Kernextrakt von etwa 12 h alten *Drosophila* Embryonen bei 4°C ü. N. auf einem Drehrad inkubiert. Zur massenspektroskopischen Identifikation von endogenen Snail-assoziierten Faktoren (siehe Abb. 11) wurden 250 µl beladene Snail-Beads mit 7,5 ml Kernextrakt oder Puffer (0,1 M NaCl-HEMG) inkubiert. Anschließend wurden die

Beads 1 x mit Waschpuffer (0,2 M NaCl-HEMG, 0.1% NP40) gespült und 3 x 10 Min mit Waschpuffer bei 4°C auf einem Drehrad gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Beads durch Zentrifugation (ca. 800 g; 3 Min; 4°C) pelletiert. Anschließend wurde der Überstand mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle (0,4 x 20 mm) vollständig entfernt und 100  $\mu$ l 2 x SDS Puffer zugegeben (Probenvorbereitung zur massenspektroskopischen Untersuchung siehe 4.5.2.). Der Ansatz wurde für 5 Min bei 100°C inkubiert und die Beads und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (16.000 x g; 5 Min). Von dem Überstand wurden je 10  $\mu$ l auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe 4.5.1.) und anschließend durch Western-Blot Analyse (siehe 4.5.5.) mit Hilfe von *anti*-CtBP (siehe Abb. 10) und *anti*-HDAC1 (siehe Abb. 14 und 16) Antikörpern untersucht.

#### 4.7.3. Immunopräzipitation eines nativen Snail-Komplexes

Um die Zusammensetzung eines putativen nativen Snail-HDAC1-Komplexes studieren zu können, wurde ein Snail spezifischer Antikörper generiert (siehe 4.10.) mit dem Immunopräzipitationsexperimente mit embryonalem *Drosophila* Kernextrakt durchgeführt wurden.

Dazu wurden gleiche Mengen (etwa 50 µg schwere Kette pro AK) des anti-Snail-(siehe 4.10.) und eines anti-GST Antikörpers zur Kontrolle (Sigma) mit je 2,6 ml (1:5 mit 0,1 M NaCl-HEMG) embryonalem Kernextrakt ü. N. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden 140 µl Protein A Sepharose (Protein A Sepharose 4 Fast Flow, Amersham) zugegeben und weitere 4 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurden die beladenen Protein A-Beads 2 x 10 Min mit Waschpuffer (0,2 M NaCl-HEMG ohne NP40 !) bei 4°C auf einem Drehrad gewaschen. Daraufhin wurden die Beads in Mobicols (MoBiTec) überführt und assoziierte Proteine mit je 100 µl Elutionspuffer (50 mM Tris (pH 7,6) mit steigender MgCl<sub>2</sub> Konzentration (0,5 M; 1,0 M; 1,5 M; 2,0 M) eluiert. Dazu wurden die Beads durch Zentrifugation (ca. 300 x g; 5 Sek) getrocknet, die Mobicols verschlossen, 100 µl Elutionspuffer mit 50 mM MgCl<sub>2</sub> auf die Beads gegeben und die Beads etwas gelockert. Es folgte eine 10 Min Inkubation bei RT, der sich eine erneute Zentrifugation anschloss. Das Zentrifugat wurde in einem Reaktionsgefäß gesammelt, den Beads wieder 100 µl Elutionspuffer mit der nächsthöheren MgCl<sub>2</sub>-Konzentzration zugegeben und wieder 10 Min inkubiert. Dieser Zyklus wurde wiederholt bis die Beads mit der höchsten MgCl<sub>2</sub>-Konzentration inkubiert worden waren. Die in den Zentrifugaten enthaltenen Proteine wurden

durch Isopropanolfällung präzipitiert. Dazu wurden je 100  $\mu$ l Zentrifugat mit 1 ml Isopropanol versetzt, stark geschüttelt und der Ansatz ü. N. bei RT inkubiert. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation (16.000 x g; 20 Min; RT) pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet für ca. 1 h bei RT trocknen gelassen. Das Pellet wurde in 40  $\mu$ l 2 x SDS Probenpuffer aufgenommen, für 5 Min bei 100°C inkubiert und dann zentrifugiert (16.000 x g; 5 Min). Für die spätere Western-Blot Analyse (siehe 4.5.5.) mit verschiedenen Antikörpern wurden 10  $\mu$ l des Überstandes für die Analyse mit dem *anti*-Snail, 15  $\mu$ l für die Analyse mit dem *anti*- HDAC1 und 13  $\mu$ l für die Analyse mit dem *anti*-CtBP Antikörper auf das SDS-Gel aufgetragen (siehe 4.5.1., siehe Abb. 15).

## 4.8. Histon-Deacetylase-Assay

Als Substrat für den HDAC-Assay wurde ein mit <sup>3</sup>H-markierten Acetylgruppen acetyliertes H4 Peptid (Rinder Histon AS 1-24) eingesetzt (Belz, 1998). Der HDAC-Assay basiert auf der enzymatischen Freisetzung <sup>3</sup>H-markierter Acetylreste vom H4-Peptid durch Histon-Deacetylase-Aktivität. Die freigesetzten Acetylreste wurden aus dem Ansatz extrahiert und die <sup>3</sup>H-Aktivität im Szintillationszähler quantifiziert.

#### 4.8.1. Snail- bzw. CtBP assoziierte HDAC-Aktivität

Je 10 µl beladene FLAG-Snail- bzw. FLAG-CtBP-Beads (siehe 4.6.2.5.1.) wurden mit 200 µl Kernextrakt (1:5 verd. mit 0,1 M NaCl-HEMG) oder Puffer (0,1M NaCl-HEMG) ü. N. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Beads 1 x mit Waschpuffer (0,2 M NaCl-HEMG; 0,1% NP40) gespült, 3 x 10 Min mit Waschpuffer bei 4°C auf einem Drehrad gewaschen und 1 x mit HDAC-Reaktionspuffer (0,1 M NaCl-HEMG ohne NP40 !) gespült. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle (0,4 x 20 mm) abgenommen, 50 µl HDAC-Reaktionspuffer und H4-Peptid (80.000-385.000 DPM) zugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 30°C auf einem Eppendorfschüttler wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopplösung (1 M HCl; 0,16 M Essigsäure) gestoppt. Durch Zugabe von 600 µl Ethylacetat und kräftigem Schütteln (2 x 30 Sek) wurden die freigesetzten Acetylreste in der organischen Phase gelöst. Durch Zentrifugation (16.000 x g; 2 Min) wurden die Phasen getrennt, 500 µl der oberen organischen Phase abgenommen, mit

4 ml Szinitillationscocktail (Rotiszint eco plus, ROTH) versetzt und die <sup>3</sup>H-Aktivität im Szinitillationszähler quantifiziert. Jede Probe wurde dabei 2 x 2 Min vermessen.

#### 4.8.2. Intrinsische HDAC-Aktivität von rek. CtBP und HDAC1

Je 5 µg HDAC1-His/C (siehe Abb. 7 und 4.6.2.5.2.) bzw. 0,5 µg FLAG-CtBP (siehe Abb. 12 und 4.6.2.5.1.) wurden in 200 µl HDAC-Reaktionspuffer (0,1 M NaCl-HEMG) mit H4-Peptid (50.000 bzw. 80.000 DPM) in An- oder Abwesenheit von Trichostatin A (40 nM, TSA) oder NAD (1 mM) für 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Stopplösung (1 M HCl, 0,16 M Essigsäure) gestoppt. Die weiteren Schritte waren mit den in 4.8.1. aufgeführten identisch.

## 4.9. Herstellung von Drosophila Kernextrakt

#### 4.9.1. Zubereitung von Apfelsaft-Agarplatten

200 g Agar (Agar Agar Serva Kobe I, in Streifen) wurden zusammen mit 165 g Zucker und 9 g Nipagin (gelöst in 150 ml 95%igem Ethanol, Methyl-4-hydroxybenzoat Natriumsalz, Bender&Hobein) in 3 L Wasser und 2 L Apfelsaft aufgekocht. Anschließend wurde der Apfelsaftagar in Schalen gegossen und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die Apfelsaft-Agarplatten mit etwas frischer Hefe bestrichen.

#### 4.9.2. Sammeln und Dechorionisieren von Drosophila Embryonen

Embryonen wurden in 28 cm x 28 cm x 56 cm großen Flugkäfigen gesammelt, die ca. 200 ml Fliegen enthielten und zur Eiablage mit Apfelsaftagarplatten (20 cm x 30 cm) bestückt waren. Für die Herstellung embryonaler Kernextrakte wurden 0-12 h alte Embryonengelege gesammelt.

Die Embryonen wurden mit Wasser von den Apfelsaft-Agarplatten gespült, durch zwei Siebe mit 1 mm Maschenweite von Hefe und toten Fliegen getrennt und in einem Sieb mit der Machenweite 100 µm gesammelt. Nach dem Waschen wurden die Embryonen durch dreiminütige Inkubation in Dechorionisierungslösung (3% Natrium-Hypochlorid) dechorionisiert, mit Waschlösung (0,7% NaCl (w/v); 0,04% Triton X-100) und anschließend

mit Wasser gewaschen. Nach Entfernen überschüssigen Wassers mit Hilfe von Papiertüchern wurde das Gewicht der Embryonen bestimmt.

#### 4.9.3. Kernextrakt Präparation

Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt, alle benutzten Lösungen und Gerätschaften waren auf 4°C vorgekühlt.

Die Embryonen wurden mit 3 ml Homogenisierungspuffer (15 mM Hepes (pH 7,6); 10 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM EDTA; 0,5mM EGTA; 350 mM Saccharose; 1 mM DTT; 1 mM Natrium-meta-bisulfit; 0,2 mM PMSF) versetzt und mit Hilfe von zwei Passagen durch einen automatischen Homogenisators (LSC Homogenizer LH22, Yamato Scientific Co. Ltd.) homogenisiert. Dabei bleiben die Zellkerne intakt. Das Homogenisat wurde durch ein Gewebe (Miracloth, Calbiochem) in ein GSA-Zentrifugengefäß (Sorvall) filtiriert, wobei das Gewebe anschließend noch einmal mit 2 ml Homogenisierungspuffer/g Embryonen gewaschen wurde. Das Endvolumen des Homogenisierungspuffer/g Embryonen sollte bei 5 ml/g Embryonen liegen. Die Kerne wurden durch Zentrifugation (8.000 UpM; 15 Min; 4°C, GSA-Rotor) pelletiert, der Überstand vorsichtig dekantiert und die Lipide an der Gefäßwand mit Hilfe von Papiertüchern entfernt. Die Zellkerne wurden in 1 ml Resuspendierungspuffer/g Embryonen (15 mM Hepes (pH 7,6); 110 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM EDTA; 2 mM DTT; 1 mM Natrium-meta-bisulfit; 0,2 mM PMSF) resuspendiert, mittels eines Pistills der Größe B homogenisiert und mit 1/10 Volumen 4 M Ammoniumsulfatlösung (pH 7, RT) versetzt. Die Suspension wurde 20 Min auf einem Drehrad bei 4°C rotiert und anschließend Kerntrümmer und chromosomale DNA durch Ultrazentrifugation (35.000 UpM (142.400 x g); 1 h; 4°C; 45 Ti-Rotor Sorvall) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und nach Volumenbestimmung über 15 Min mit 0,3 g/ml Überstand pulverisiertem Ammoniumsulfat bei 4°C unter ständigem Rühren versetzt. Nach erfolgter Zugabe wurde für mindestens weitere 15 Min gerührt. Das Ammoniumsulfat-Präzipitat wurde durch Zentrifugation (15.000 UpM; 10 Min; 4°C; SS34-Rotor Sorvall) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 0,1 ml/g Embryonen HEMG-Puffer (0,1 M NaCl-HEMG; 1,5 mM DTT; 0,5 mM Natrium-meta-bisulfit; 0,2 mM PMSF) resuspendiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (20.000 UpM; 20 Min; 4°C; SS34-Rotor Sorvall) entfernt. Der Überstand wurde so lange gegen Dialysepuffer (0,1 M NaCl-HEMG; 1,5 mM DTT; 0,5 mM Natrium-meta-bisulfit; 0,2 mM PMSF) dialysiert, bis er die gleiche Konduktivität wie 0,1 M NaCl-HEMG zeigte. Das Dialysat wurde anschließend noch einmal zentrifugiert (20.000 UpM; 20 Min; 4°C; SS34-Rotor Sorvall), der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

## 4.10. Herstellung eines Snail-spezifischen Antikörpers

Um untersuchen zu können, ob in *Drosophila* Kernextrakt *in vivo* ein nativer Snail-HDAC1-Komplex vorliegt (siehe 2.4.2.3.), wurde ein Snail-spezifischer Antikörper generiert.

#### 4.10.1. Immunisierung von Kaninchen

Dazu wurden zwei Kaninchen mit dem Snail-Fragment His-Snail-1/253 (siehe 4.6.1.2.) immunisiert. Zur Erstimmunisierung wurde eine 1:1 Mischung aus 300 µl Antigenlösung (ca. 600 µg His-Snail-1/253) und 300 µl Freund's Adjuvant komplett (Sigma) eingesetzt, zur Folgeimmuninisierung wurde ein milderes Adjuvant verwendet (Gerbu Adjuvant LQ). Die Immunisierung erfolgte nach folgendem Schema:

Tag Nr.	Menge Protein / Adjuvant
1	400µg + Freud´s Adj.
54	200µg + LQ Adj.
81	400µg + LQ Adj.
103	$140\mu g + LQ Adj.$
127	240µg + LQ Adj.
153	140µg + LQ Adj.
180	140µg + LQ Adj.

Im Laufe der Immunisierung wurde den Kaninchen regelmäßig Testblut entnommen und die Immunoreaktvität des Serums gegenüber FLAG-Snail (siehe 4.6.2.5.1.) mit Hilfe der Western-Blot Analyse (siehe 4.5.5.) untersucht. Nach 180 Tagen wurde das Kaninchen ausbluten gelassen, und das Blut für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der "Blutkuchen" von der Wandung des Gefäßes gelöst und das Blut ü. N. bei 4°C inkubiert, was zu einer Kontraktion des "Blutkuchens" führte. Dieser wurde entfernt und unlösliches Material durch Zentrifugation (10.000 X g; 10 Min; 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

#### 4.10.2. Reinigung des Snail-spezifischen Antikörpers

Der Snail-spezifische Antikörper (siehe 4.10.) wurde aus dem Kaninchenserum mit Hilfe des auch zur Immunisierung eingesetzten His-Snail-1/253 Antigens (siehe 4.6.1.2.) angereichert. Dazu wurde das His-Snail-1/253 Antigen auf einer Matrix immobilisiert, mit dem Kaninchenserum inkubiert und die spezifisch gebundenen Antikörper wieder eluiert

#### 4.10.2.1. Kopplung von His-Snail 1/253 an 'SulfoLink Coupling Gel'

Zur Isolierung Snail-spezifischer Antikörper aus Kaninchenserum wurde His-Snail-1/253 (siehe 4.6.1.2.) an 'SulfoLink Coupling Gel' (Pierce) gekoppelt. Diese Matrix bindet kovalent Thiolgruppen und immobilisiert und somit His-Snail-1/253 über einen der fünf im Protein enthaltenen Cysteinreste. Da für eine erfolgreiche Kopplung des Proteins die Cysteinreste reduziert sein müssen, wurde der Proteinlösung 2 mM DTT zugesetzt. 200 µl 'SulfoLink Coupling Gel' wurden mit 10 ml Kopplungspuffer (50 mM Tris (pH 8,5); 5 mM EDTA; 2 mM DTT) äquillibiriert und anschließend mit etwa 800µg His-Snail-1/253 in 14 ml Kopplungspuffer für 45 Min bei RT inkubiert. Im Weiteren erfolgte die Kopplung nach Herstellerangaben. Nach der Reaktion wurde die Kopplungseffizienz überprüft (siehe Abb. 9A).

#### 4.10.2.2. Anreicherung des Snail-spezifischen Antikörpers

Der Snail-spezifische Antikörper wurde aus Kaninchenserum durch Affinitätsreinigung angereichert. Dazu wurde das immobilisierte His-Snail-1/253 Antigen (siehe 4.10.2.1.) mit 5 ml Kaninchenserum (1:10 mit 10 mM Tris (pH 7,5)) ü. N. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Antikörper beladene Matrix durch Zentrifugation (ca. 220 x g; 3 Min) pelletiert und 1 x 10 Min mit 50 ml Waschpuffer I (10 mM Tris (pH 7,5)) und 1 x 10 Min mit Waschpuffer II (10 mM Tris (pH 7,5); 50 mM NaCl) auf dem Drehrad

inkubiert. Die gewaschene Matrix wurde in eine Säule überführt (Poly-Prep Column, BioRad) und assoziierte Antikörper mit 2 ml Elutionspuffer (100 mM Glycin (pH 2,5)) eluiert. Das Eluat wurde in ca. 170 µl Fraktionen gesammelt und sofort durch Zugabe von 10 µl Neutralisationspuffer (1 M Tris (pH 8)) neutralisiert. Je 5 µl der Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe 4.5.1.) und diese Coomassie gefärbt (siehe 4.5.3.). Die Fraktionen, welche Antikörper enthielten (siehe Abb. 9B) wurden vereinigt (ca. 1,5 ml) und ü. N. bei 4°C gegen 2 L Lagerungspuffer (PBS (pH 7,5); 0,05% Natriumazid) dialysiert. Der Antikörper wurde durch Western-Blot Analyse auf seine Funktionalität hin überprüft (siehe Abb. 9C). Bis zur weiteren Verwendung wurde der Antikörper bei 4°C gelagert.

## 4.11. Material

## 4.11.1. Laborausstattung

Analytische Waage	Sartorius analytic
Binokular	Stemi SV6, Zeiss
Chromatographiesysteme Computer Hardware	Äkta Purifier, Äkta FPLC, Amersham Pharm. Biotech Power Book G3, Apple Corp. Laser Drucker Optra S1855, Lexmark Laser Drucker Dokuprint N2125 Tintenstrahldrucker business inkiet 2250tn HP
Computer Software	Canvas 7.0, Deneba DNA Strider 1.3 Excel 2001, Microsoft Corp. Internet Explorer 5.1, Microsoft Corp. Lasergene Navigator, DNAStar Linoscan Linocolor Elite 6.0.1, Heidelberg Netscape Navigator 4.76, Netscape Corp. Photoshop 5.0, Adobe Word 2001, Microsoft Corp.
DNA-Gellaufkammern	ZMBH-Werkstatt
Drehrad	CMV, Irobel
Eisbäder Eismaschiene Filmentwickler	Neolab Scotsman B-550 Amersham Pharmacia Biotech
Fliegeninkubator	RUMED
Gel-Trockner	Drygel Sr., SE 1160
Heizblock	Eppendorf Thermomixer 5436 Dri Block DB3, und 2D

- Kühlzentrifugen Laborwippe Laborwaage Magnetrührer Mikro-Pipetten Mikrowellenherd Milli Q Wasser System pH-Meter Photokopierer Photometer Pipettierhilfe, elektr. Rotoren
- Schüttelinkubator Schüttler, horizontal SDS-PAGE Laufkammern *Sf9* Spinner Stickstoffbehälter Thermocycler Tiefkühlschränke
- Tischzentrifuge Transformatoren für Gelelektr. Ultraschallgerät Ultrazentrifuge Untertischzentrifuge Vakuumkonzentrator Vortex Wasserbäder Western-Blot Apparatuten

Sorvall RC 5B, RC 5C DuPont Laborwippe CAT ST5 Sartorius BP 2100 S Heidolph MR 3000 und 3001 P10, P20, P200, P1000 Gilson Pipetman Panasonic Millipore<sup>®</sup> Molsheim, France MP 220, Mettler Toledo Nashuatec D422 Ultrospect 3000, Amersham Pharmacia Biotech Accu-jet, Brand SS34, GS3, GSA DuPont FS7-4x1000y, PTI Ti45, Beckkmann Innova 4230, New Brunswick Scientific GFL 3005 Miniprotean II & III, Biorad Bellco glass Isotherm, KGW MJ Research Inc. PTC-1000 Liebherr comfort (-20°C) Tritec Hannover (-20°C) Heraeus HFU-86 450 (-85°C) Biofuge pico, Biofuge 15, Heraeus Instruments Biorad Power Pac 200 & 300 **Digital Branson 450D** Beckmann L8-70M Ultracentrifuge Heraeus Varifuge 3.0R Speed Vac Concentrator, Bachofer Heidolph REAX 2000 SUB 14, Grant Mini Trans-Blot Transfer Cell, Biorad **ZMBH-Werksatt** 

## 4.11.2. Verbrauchsmaterial

Autoradiographie Filmkassette	Suprema, Dr. Goos
Colloidal Coomasie	Novex, San Diego
Dialyse Membran	Regenerated Cellulose, Spectra PorMolecular porus membrane (6-8kDa), Spectrum
Einmalhandschuhe	Powder-Free Pehasoft, Hartmann; Nitrile N-Dex®, Best
Filter	0,2 und 0,45 µm, Cellulose Ester, Schleicher & Schuell
In vitro transcription/translation	TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems Kit, Promega
Küvetten	10 mm x 4 mm x 45 mm, Sarstedt
Maxi Kit	JETstar, Genomed
Papiertücher	KimWipes Lite 200, Kimberly Clark
Parafilm	American National Can.
Pasteur Pipetten	WU Mainz
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner
Petrischalen	Greiner
Reaktionsgefäße	0,5, 1,5 u. 2 ml, Sarstedt, Eppendorf
Silikonisierte Reaktionsgef.	1,5 ml, Biozym
Spritzen	1,0, 5,0, 10,0, u. 50,0 ml, Becton Dickinson
Spritzennadeln	0,4 x 20 mm, Braun

## 4.11.3. Chemikalien und Enzyme

#### 4.11.3.1. Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders bei den Methoden angegeben, durch die Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen.

## 4.11.3.2. Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden durch New England Biolabs bezogen, andere verwendete Enzyme sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

## 5. Abkürzungen

А	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5´-diphosphosphat
AK	Antikörper
amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
RAA	Bis-Acrylamid
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bn	Basennaare
bzw	beziehungsweise
02w.	centi
ca.	circa
CaCla	Calciumchlorid
cDNA	DNA-Konie eines RNA-Moleküls
°C	Grad Celsius
CHAPS	(3-[(3-Cholamidononyl)-Dimethylammonium]-1-Propansulfonat)CarHeeNaOrS
СООН	Carboxy
CTD	Carboxy-terminale Domäne
dh	das heißt
Da	Dalton
dHaO	Millipore"-Wasser
	Dimthylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribo-Nukleosidtrinhosphat
DPM	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
E coli	Escherichia coli
E. CON	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
EGTA	Ethylenglycol-bis (B-aminoethylether) N N N' N'-tetraessigsäure
c	Englon
C EtPr	Ethidiumhromid
ovtl	eventuell
Evu.	Forschungsgruppe
ru	Gramm oder Erdbeschleunigung
g CST	Clutathian S. Transformer
USI CTE	baseler Transkriptionsfelter
GIF	concernite Transkriptionstaktor
GTM h	Stunde
11 311	Tritium
п	THUUIII Wassar
	Wassel
П4 ПАТ	ΠISIOII Π 4 Histor A satultransforess
ПАI	Histon-Acetyltransierase

HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
HEMG	Hepes-EDTA-MgCl <sub>2</sub> -Glycerol Puffer
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettich
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-B-D-Thiogalaktopyranosid
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
КОН	Kaliumhydroxid
Konz.	Konzentration
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
m	Meter. Milli
U U	Mikro
M	Mol / Liter
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
Min	Minute
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
mRNA	messenger (Boten) RNA
n	nano
Na <sub>2</sub> CO <sub>2</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogennhosnhat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NC	Nitrocellulose
NH <sub>2</sub>	Amino
Ni <sup>2+</sup>	Nickelionen
NLS	Kernlokalisationssignal
NP 40	Nonidet P 40
OD	optische Dichte
D	Plasmid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
рН	negativer dekadischer Logarithmus der Wassestoffionenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
PIK	Präinitiationskomplex
Pipes	Piperazin-1,4-bis (2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pol.	Polymerase
PVDF	Polyvinylidene Difluorid
red.	reduziert

rek.	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Gel	SDS-Polyacrylamidgel
Sek	Sekunde
<i>Sf</i> 9	Spodoptera frugiperda
TAF	TBP-assoziierte Faktoren
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tweenzusatz
TEMED	N, N, N', N', - Triethylmethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
u. U.	unter Umständen
ü. N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
Х	-fach
## 6. Literatur

Adams, M.D., Celniker S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., *et al.* & Venter, J.C. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195

Akoulltchev, S., Mäkelä, T.P., Weinberg, R.A., Reinberg, D. (1995). Requirement for TFIIH kinase activity in transcription by RNA polymerase II. *Nature* **377**, 557-560

Alberga, A., Boulay, J.L., Kempe, E., Dennefeld, C., Haenlin, M. (1991). The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development* **111**, 983-992

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1997). Molekularbiologie der Zelle. VCH, 1. korrigierter Nachdruck

Albright, S.R. & Tjian, R. (2000). TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene* 242, 1-13

Allfrey, V.G., Faulkner, R., Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and their possible role in regulation of RNA Synthesis. *PNAS* **51**, 786-793

Arnosti, D.N., Gray, S., Barolo, S., Zhou, J., Levine, M. (1996). The gap protein knirps mediates both quenching and direct repression in the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* **15**, 3659-3666

Aronson, B.D., Fisher, A.L., Blechman, K., Caudy, M., Gergen, J.P. (1997). Grouchodependent and –independent repression activities of Runt domain proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5581-5587

Ashraf, S.I. & Ip, Y.T. (2001). The Snail protein family regulates neuroblast expression of inscuteable and string, genes involved in asymmetry and cell division in *Drosophila*. *Development* **128**, 4757-4767

Ashraf, S.I., Hu, X., Roote, J., Ip, Y.T. (1999). The mesoderm determinant snail collaborates with related zinc-finger proteins to control Drosophila neurogenesis. *EMBO J.* **18**, 6426-6438

Barlow, A.L., van Drunnen, C.M., Johnson, C.A., Tweedie, S., Bird, A., Turner, B.M. (2001). dSIR2 and HDAC6: two novel, inhibitor-resistent deacetylases in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Cell. Res.* **265**, 90-103

Barolo, S. & Levine, M. (1997). hairy mediates dominant repression in the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* **16**, 2883-2891

Belz (1998) Diplomarbeit. Untersuchungen zur Assoziation von Repressoren der Transkription aus *Drosophila melanogaster* mit Histon-Deacetylase-Aktivität. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Bernstein, B.E., Tong, J.K., Schreiber, S.L. (2000). Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *PNAS* **97**, 13708-13713

Bertos, N.R., Wang, A.H., Yang, X. (2001). Class II histone deacetylases: Structure, function, and regulation. *Biochem. Cell Biol.* **79**, 243-252

Bier, E., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1990). *Rhomboid*, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development* **4**, 190-203

Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523

Borrow, J., Stanton, V.P., Andresen, J.M., Becher, R., Behm, F.G., Chaganti, R.S., Civin, C.I., Disteche, C., Dube, I., Frischauf, A.M., Horsman, D., Mitelman, F., Volinia, S., Watmore, A.E., Housman, D.E. (1996). The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nature Gen.* **14**, 33-41

Boulay, J.L., Dennefeld, C., Alberga, A. (1987). The *Drosophila* developmental gene *snail* encodes a protein with nucleic acid bining fingers. *Nature* **330**, 395-398

Boyle, A. & Lew, A.M. (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet.* **11**, 8

Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D., Broach, J. R. (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes & Development* 7, 592-604

Burke, T.W., Kadonaga, J.T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by  $TTAF_{II}60$  of *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 3020-3031

Burley, S.K. & Roeder, R.G. (1996). Biochemistry and Structural Biology of Transcription Factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 769-799

Cai, H.N., Arnosti, D.N., Levine, M. (1996). Long-range repression in the Drosophila embryo. *PNAS* **93**, 9309-9314

Cai, Y., Chia, W., Yang, X. (2001). A familiy of Snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *EMBO J.* **20**, 1704-1714

Cavailles, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P.J., Parker. M.G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* **14**, 3741-3751

Chalkley, G.E. & Verrijzer, C.P. (1999). DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF<sub>II</sub>250-TAF<sub>II</sub>150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.* **18**, 4835-4845

Chen, G., Fernandez, J., Mische, S., Courey, A.J. (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor Groucho in *Drosophila* development. *Genes & Dev.* **13**, 2218-2230

Chi, T. & Carey, M. (1996). Assembly of the isomerized TFIIA-TFIID-TATA ternary complex is necessary and sufficient for gene activation. *Genes Dev.* **10**, 2540-2550

Chinnadurai, G. (2002). CtBP, an Unconventional Transcriptional Corepressor in Development and Oncogenesis. *Mol. Cell* **9**, 213-224

Choi, C.Y., Kim, Y.H., Kwon, H.J., Kim, Y. (1999). The homeodomain protein NK-3 recruits Groucho and a histone decatylase complex to repress transcription. *J. Biol. Chem.* **274**, 33194-33197

Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., Goodman, R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**, 855-859

Courey, A.J. & Jia, S. (2001). Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes & Dev.* **15**, 2786-2796

Criqui-Filipe, P., Ducret, C., Maira, S.M., Wasylyk, B. (1999). Net, a negative Rasswitchable TCF, contains a second inhibition domain, the CID, that mediates repression through interactions with CtBP and de-acetylation. *EMBO J.* **18**, 3392-3403

Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1994). Molekulare Zellbiologie. Berlin, New York, de Gruyter

Davies, A.H., Jowett, J.B., Jones, I.M. (1993). Recombinant baculovirus vectors expressing glutathione-S-transferase fusion proteins. *Biotechnology* **11**, 933-936

De Rubertis, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K., Spierer, P. (1996). The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature* **384**, 589-591

Dostanti, N., Lambert, P.F., Sousa, R., Ham, J., Howley, P.M., Yaniv, M. (1991). The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* **5**, 1657-1671

Driever, W. & Nüsslein-Volhard, C. (1989) The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **337**, 138-143

Dubnicoff, T., Valentine, S.A., Chen, G., Shi, T., Langyel, J.A., Paroush, Z., Courey, A.J. (1997). Conversion of Dorsal from an activator to a repressor by the global corepressor Groucho. *Genes Dev.* **11**, 2952-2957

Eckner, R., Ewen, M.E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J.A., Lawrence, J.B., Livingston, D.M. (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.* **8**, 869-884

Feaver, W.J., Gileadi, O., Li, Y., Kornberg, R.D. (1991). CTD Kinase Associated with Yeast RNA Polymerase II Initiation Factor b. *Cell* **67**, 1223-1230

Fischle, W., Kiermer, V., Dequiedt, F., Verdin, E. (2001). The emergin role of class II histone deacetylases. *Biochem. Cell Biol.* **79**, 337-348

Fuse, N., Hirose, S., Hayashi, S. (1996). Determination of wing cell fate by the escargot and snail genes in *Drosophila*. *Development* **122**, 1059-1067

Gaudreau, L., Adam, M., Ptashne, M. (1998). Activation of Transcription In Vitro by Recruitment of the Yeast RNA Polymerase II Holoenzyme. *Cell* **1**, 913-916

Gaul, U., Seifert, E., Schuh, R., Jäckle, H. (1987). Analysis of *Krüppel* protein distribution during early *Drosophila* development reveals posttranscriptional regulation. *Cell* **50**, 637-647

Gaul-Unnerstall, U. (1988). Untersuchungen zur Funktion und Regulation von Krüppel, einem Segmentierungsgen von Drosophila melanogaster. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Grau, Y., Carteret, C., Simpson, P. (1984). Mutations and chromosomal rearrangements affecting the expression of *snail*, a gene involved in embryonic patterning in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **108**, 247-360

Gray, S. & Levine, M. (1996a). Short-range transcriptional repressors mediate both quenching and direct repression within complex loci in *Drosophila*. *Genes & Development* **10**, 700-710

Gray, S. & Levine, M. (1996b). Transcriptional repression in development. *Curr. Opin. in Cell Biol.* **8**, 358-364

Gray, S., Szymanski, P., Levine, M. (1994). Short-range repression permits multiple enhancers to function autonomously within a complex promotor. *Genes Dev.* **8**, 1829-1838

Gromoller, A. & Lehming, N. (2000). Srb7p is a physical and physiological target of Tup1p. *EMBO J.*, **19**, 6845-6852

Grozinger, C.M. & Schreiber, S.L. (2000). Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *PNAS* **97**, 7835-7840

Grozinger, C.M., Hassig, C.A., Schreiber, S.L. (1999). Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *PNAS* **96**, 4868-4873

Grunstein, M. (1990a). Nucleosomes: regulators of transcription. TIG 6, 395-400

Grunstein, M. (1990b). Histone Function in Transcription. Annu. Rev. Cell Biol. 6, 643-678

Hansen, S.K. & Tjian, R. (1995). TAFs and TFIIA mediate differential utilization of the tandem *Adh* promoters. *Cell* **82**, 565-575

Hashimoto, C., Hudson, K.L., Anderson, K.V. (1988). The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral emryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-279

Hebbes, T.R., Thorne, A.W., Crane-Robinson. C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *The EMBO Journal* **7**, 1395-1402

Hemavathy, K., Meng, X., Ip, Y.T. (1997). Differential regulation of gastrulation and neuroectodermal gene expression by Snail in the *Drosophila* embryo. *Development* **124**, 3683-3691

Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? Genes & Development 7, 1291-1308

Hori, R. & Carey, M. (1994). The role of activators in assembly of RNA polymerase II transcription complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 236-244

Horikoshi, M., Carey, M.F., Kakidani, H. & Roeder, R.G. (1988). Mechanism of action of a yeast activator: direct effect of GAL4 derivatives on mammalian TFIID-promotor interactions. *Cell* **54**, 665-669

Horn, J.P. & Peterson, C.L. (2002). Chromatin Higher Order Folding: Wrapping up Transcription. *Sciene* 297, 1824-1827

Huang, X. & Kadonaga, J.T. (2001). Biochemical Analysis of Transcriptional Repression by *Drosophila* Histone Deacetylase 1. *JBC* **276**, 12497-1250

Humphrey, G.W., Wang, Y., Russanova, V.R., Hirai, T., Qin, J., Nakatani, Y., Howard, B.H. (2001). Stable Histone Deacetylase Complexes Distinguished by the Presence of SANT Domain Proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. *JBC* **276**, 6817-6824

Ibelgaufts, H. (1993). Gentechnologie von A bis Z. 1. korrigierter Nachdruck (VHC).

Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800

Imhof, A. & Wolffe, A.P. (1998). Transcription: Gene control by trageted histone acetylation. *Current Biology* **8**, 422-424

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28

Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Bier, E., Levine, M. (1992b). The *dorsal* gradient morphogen regulates stripes of *rhomboid* expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes & Dev.* **6**, 1728-1739

Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K., Levine, M. (1992a). *Dorsal-twist* interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes & Dev.* 6, 1518-1530

Jenuwein, T., Allis, C.D. (2001). Translating the Histone Code. Sciene 293, 1074-1080

Jiang, J., Cai, H., Zhou, Q., Levine, M. (1993). Conversion of a *dorsal*-dependent silencer into an enhancer: evidence for *dorsal* corepressor. *EMBO J.* **12**, 3201-3209

Johnson, A.D. (1995). The Price of Repression. Cell 81, 655-658

Johnson, C.A., Barlow, A.L., Turner, B.M. (1998). Molecular cloning of *Drosophila melanogaster* cDNAs that encode a novel histone deacetylase dHDAC3. *Gene* **221**, 127-134

Kaiser, K. & Meisterernst, M. (1996). The human general co-factors. TIBS 21 342-345

Kasai, Y., Nambu, J.R., Liebermann, P.M., Crews, S.T. (1992). Dorsal-ventral patterning in *Drosophila* : DNA binding of Snail protein to the single-minded gene. *PNAS* **89**, 3414-3418

Kaufmann, J., Ahrens, K., Koop, R., Smale S.T. & Müller, R. (1998). CIF150, a human cofactor for transcription factor IID-dependent initator function. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 233-239

Keaveney, M. & Struhl, K. (1998). Activator-Mediated Recruitment of the RNA Polymerase II Machinery Is the Predominant Mechanism for Transcriptional Activation in Yeast. *Mollecular Cell* **1**, 917-924

Kehle, J., Beuchle, D., Treuheit, S., Christen, B., Kennison, J.A., Bienz, M., Müller, J. (1998). dMi-2, a Hunchback-Interacting Protein That Functions in *Polycomb* Repression. *Science* **282**, 1897-1899

Khochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C., Seigneurin-Berny D. (2001). Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev.* **11**, 162-166

Kingston, R.E. & Green, M.R. (1994). Modeling eukaryotic transcriptional activation. *Curr. Biol.* **4**, 325-332

Knight, R. & Shimeld, S. (2001). Identification of conserved  $C_2H_2$  zinc-finger gene families in the *Bilaterialia*. *Genome Biol.* **2**, research 0016.1-0016.8

Knoepfler, P.S. & Eisenman, R.N. (1999). Sin Meets NuRD and Other tails of Repression. *Cell* 24, 447-450

Koipally, J. & Georgopoulos, K. (2000). Ikaros Interactions with CtBP Reveal a Repression Mechansim That Is Independent of Histone Deacetylase Activity. *JBC* **26**, 19595-19602

Kosman, D., Ip, Y.T., Levine, M., Arora, K. (1991). Establishment of the Mesoderm-Neuroectoderm Boundary in the *Drosophila* Embryo. *Science* **254**, 118-122

Kuo, M. & Allis, C.D. (1998). Roles of histone acetyltranferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* **20**, 615-626

Kutach, A.K., Kadonaga, J.T. (2000). The Downstream Promotor Element DPE Appears To Be as Widely Used as teh TATA Box in *Drosophila* Core Promoters. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4754-4764

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **277**, 680-685

Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D., & Ebright, R.H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* **12**, 34-44

Lee, C.H. & Wei, L.N. (1999). Characterization of receptor-interacting protein 140 in retinoid receptor activities. *JBC* **274**, 31320-31326

Lee, T.I. & Young, R.A. (2000). Transcription of Eukaryotic Protein-Coding Genes. Annu. Rev. Genet. **34**, 77-137

Leptin, M. & Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* **110**, 73-84

Leptin, M. (1991). Twist and Snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev.* **5**, 1568-1576

Lewin, B. (1997). Genes VI. Oxford, New York, Tokio, Oxford University Press

Lin, S.J., Defossez, P.A., Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **289**, 2126-2128

Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J., Reinberg, D. (1992). Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* **358**, 641-645

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature* **389**, 251-260

Maniatis, T., Goodbourn, S., Fischer, J.A. (1987). Regulation of Inducible and Tissue-Specific gene Expression. *Sciene* 236, 1237-1244

Mannervik, M., Levine, M. (1999). The Rpd3 histone deacetylase is required for segmentation of the *Drosophila* embryo. *PNAS* **96**, 6797-6801

Mannervik, M., Nibu, Y., Zhang, H., Levine, M. (1999). Transcriptional Coregulators in Development. *Science* 284, 606-609

Manoukian, A.S. & Krause, H.M. (1993). Control of segmental asymmetry in *Drosophila* embryos. *Development* **118**, 785-796

Maxon, M.E., Goodrich, J.A., Tjian, R. (1994). Transcripiton factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: a model for promotor clearance. *Genes & Development* **8**, 515-524

Mayer, U. & Nüsslein-Volhard, C. (1988). A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes & Development* **2**, 1496-1511

McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Olson, E.N. (2000). Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *PNAS* **97**, 14400-14405

Merrick, W.C. (1992). Mechanisms and regulation of eukaryotic protein snythesis. *Microbiol. Rev.* **56**, 291-315

Miyata, K.S., McCaw, S.E., Meertens, L.M., Patel, H.V., Rachubinski, R.A., Capone, J.P. (1998). Receptor-interacting protein 140 interacts with and inhibits transactivation by, peroxisome proliferator-activated receptor alpha and liver-X-receptor alpha. *Mol. Cell* **146**, 69-76

Müller, W.A. (1995). Entwicklungbiologie, UTB für Wissenschaft, Gustav Fischer Verlag, 1

Näär, A.M., Lemon & B.D., Tjian, R. (2001). Transcriptional Coactivator Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 475-501

Narlikar, G.J., Fan, H., Kingston, R.E. (2002). Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription. *Cell* **108**, 475-487

Neuwald, A.F. & Landsman, D. (1997). GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Biochem. Sci.* 22, 154-155

Nibu, Y., Zhang, H., Bajor, E., Barolo, S., Small, S., Levine, M. (1998b). dCtBP mediates transcriptional repression by Knirps, Krüppel and Snail in the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* **17**, 7009-7020

Nibu, Y., Zhang, H., Levine, M. (1998a). Interaction of Short-Range Repressors with *Drosophila* CtBP in the Embryo. *Science* **280**, 101-104

Nibu, Y., Zhang, H., Levine, M. (2001). Local action of long-range repressors in the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* **20**, 2246-2253

Nieto, M.A. (2002). The Snail Superfamily of Zinc-Finger Transcription Factors. *MCB* **3**, 155-166

Nüsslein-Volhard, C., Weischaus, E., Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I Zygotic loci on the second chromosome. *Wilheim Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**, 267-282

Oda, H., Tsukita, S., Takeichi, M. (1998). Dynamic Behavior of the Cadherin-Based Cell-Cell Adhesion Sytem during *Drosophila* Gastrulation. *Dev. Biol.* **203**, 435-450

Ogbourne, S. & Antalis, T.M. (1998). Trancriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.* **331**, 1-14

Ohkuma, Y., Hashimoto, S., Wang, C.K., Horikoshi, M., Roeder, R.G. (1995). Analysis of the Role of TFIIE in Basal Transcription and TFIIH-Mediated Carboxy-Terminal Domain Phosphorylation through Structure-Function Studies of TFIIE- $\alpha$ . *Molecular and Cellular Biology* **15**, 4856-4866

Ollo, R. & Maniatis, T. (1987). *Drosophila* Krüppel gene product in a baculovirus expression system is a nuclear phosphoprotein that binds to DNA. *PNAS* **84**, 5700-5704

Paroush, Z., Finley, R.L. Jr., Kidd, T., Wainwright, S.M., Ingham, P.W., Brent, R., Ish-Horowicz, D. (1994). Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* **79**, 805-815

Pennetta, G. & Pauli, D. (1998). The *Drosophila* Sin3 gene encodes a widely distributed transcripiton factor essential for embryonic viability. *Dev. Genes Evol.* **208**, 531-536

Peterson, C.L. (2002). HDAC's at Work: Everyone Doing Their Part. Mol. Cell 9, 921-929

Pham, A. & Sauer, F. (2000). Ubiquitin-Activating/Conjugating Activity of  $TAF_{II}250$ , a Mediator of Activation of Gene Expression in *Drosophila*. *Sciene* **289**, 2357-2360

Phippen, T.M., Sweigart, A.L., Moniwa, M., Krumm, A., Davie, J.R., Parkhurst, S.M. (2000). *Drosophila* C-terminal binding protein functions as a context-dependent transcriptional co-factor and interferes with both mad and groucho transcriptional repression. *JBC* **275**, 37628-37637

Pile, L.A. & Wassarman, D.A. (2000). Chromosomal localization links the SIN3-RPD3 complex to the regulation of chromatin condensation, histone acetylation and gene expression. *EMBO J.* **22**, 6131-6140

Pirrotta, V. (1998). Polycombing the Genome: PcG, trxG, and Chromatin Silencing. *Cell* **93**, 333-336

Poortinga, G., Watanabe, M., Parkhurst, S.M. (1998). *Drosophila* CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmenation and Hairy-mediated transcriptional repression. *EMBO J.* **17**, 2067-2078

Ptashne, M. & Gann, A.A.F. (1990). Activators and targets. Nature 346, 329-331

Pugh, B.F., & Tjian, R. (1992). Diverse transcriptional functions of the multisubunit eukaryotic TFIID complex. J. Biol. Chem. 267, 679-682

Rajavel, M., Lalo, D., Gross, J.W., Grubmeyer, C. (1998). Conversion of a cosubstrate to an inhibitor: phosphorylation mutants of nicotinic acid phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* **37**, 4181-4188

Razin, A. (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing – a three way connection. *EMBO J.* **17**, 4905-4908

Reifsnyder, C., Lowell, J., Clarke, A., Pillus, L. (1996). Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nature Gen.* **14**, 42-49

Roberts, G.E. & Green, M.R. (1994). Activator-induced conformational change in general transcription factor TFIIB. *Nature* **371**, 717-720

Roeder, R.G. (1996). Th role of general initition factors in transcription by RNA polymerase II. *TIBS* **21**, 327-335

Rosenberg, M.I. & Parkhurst, S.M. (2002). *Drosophila* Sir2 is required for Heterochromatic Silencing and by Euchromatic Hairy/E(Spl) bHLH Repressors in Segmentation and Sex Determination. *Cell* **109**, 447-458

Roth, S.Y., Denu, J.M., Allis, C.D. (2001). Histone Acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81-120

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (New Work: Cold Spring Harbor Press).

Schaeper U, Boyd, J.M., Verma, S., Uhlmann, E., Subramanian, T., Chinnadurai, G. (1995). Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *PNAS* **92**, 10467-10471

Sewalt, R.G.A.B., Marco, J.G., van der Vlag, J., Satijn, D.P.E., Otte, A.P. (1999). C-Terminal Binding Protein Is a Transcriptional Repressor That Interacts with a Specific Class of Vertebrate Polycomb Proteins. *MCB* **19**, 777-787

Shore, S. (2000). The Sir2 protein family: A novel deycetylase for gene silencing and more. *PNAS* **97**, 14030-14032

Simpson, P. (1983). Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos. *Genetics* **105**, 615-632

Smale, S.T. (1994). Core Promoter architecture for eukaryotic protein-coding genes. S. 63-80 in Conaway, R.C. & Conaway, J.W., Transcription: mechanisms and regulation. Raven press, Ltd., New York, N.Y.

Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40

Stein, D., Roth, S., Vogelsang, E., Nüsslein-Volhard, C. (1991). The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* **65**, 725-735

Strahl, B.D. & Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45

Subramaniam, N., Treuter, E., Okret, S. (1999). Receptor interacting protein RIP140 inhibits both positive and negative gene regulation by glucocorticoids. *JBC* **274**, 18121-18127

Summers, M.D. (1989). Recombinant proteins expressed by baculovirus vectors. In Notkins, A.L., & Oldstone, M.B.A. (1989). Concepts In Viral Pathogenesis, 77-86, Springer-Verlag, New York/Berlin

Sundqvist, A., Sollerbrandt, K., Svensson, C. (1998). The carboxy-terminal region of adenovirus E1A activates transcription through targeting of a C-terminal binding proteinhistone deacetylase complex. *FEBS* **429**, 183-188

Svejstrup, J.Q., Vichi, P., Egly, J. (1996). The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH. *TIBS* **21**, 346-350

Takami, Y. & Nakayama, T. (2000). N-terminal region, C-terminal region, nuclear export signal, and deacetylation activity of histone deacetylase-3 are essential for the viability of the DT40 chicken B cell line. *JBC* **275**, 16191-16201

Taunton, J., Hassig, C.A., Schreiber, S.L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408-411

Thomas, J.O. (1984). The higher order structure of chromatin and histone H1. J. Cell Sci. Suppl. 1, 1-20

Tjian, R. & Maniatis, T. (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* **77**, 5-8

Towle, H.C., Tsai, M.J., Hirose, M., Tsai, S.Y., Schwartz, R.J., Parker, M.G., O'Malley, B.W., (1976). Regulation of transcription of the eukaryotic genome. *Symp. Soc. Dev. Biol.* **34**, 107-136

Treuter, E., Albrektsen, T., Johansson, L., Leers, J., Gustafsson, J.A. (1998). A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol. Endocrinol.* **12**, 864-881

Turner, J. & Crossley, M. (1998). Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Krüppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. *EMBO J.* **17**, 5129-5140

Turner, J. & Crossley, M. (2001). The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors. *BioEssays* 23, 683-690

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhnag, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M. *et al.* & Zhu, X. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**, 1304-1351

Verrijzer, C.P., Chen, J.L., Yokomori, K. & Tjian, R. (1995). Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell* **81**, 11155-1125

Verrijzer, C.P., Yokomori, K., Chen, J.L. & Tjian, R. (1994). *Drosophila* TAFII150: similarity to yeast gene *TSM-1* and specific binding to core promoter DNA. *Science* **264**, 933-941

Vo, N., Fjeld, C., Goodman, R.H. (2001) Acetylation of nuclear hormone receptor-interacting protein RIP140 regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *MCB* **21**, 6181-6188

Wade, P.A., Gegonne, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubury, F., Wolffe, A.P. (1999). Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nature Genetics* **23**, 62-66

Wassarman, D.A. & Sauer, F. (2001). TAF $_{II}$ 250: a transcriptional toolbox. *Journal of Cell Science* **114**, 2895-2902

Wheeler, J.C., Vander Zwan, C., Xu, X., Swantek, D., Tracey, W.D., Gergen, J.P. (2002). Distinct *in vivo* requirements for establishment versus maintenance of transcriptional repression. *Nature Genet.* **32**, 206-210

Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B.M., Montminy, M., Evans, R.M. (2001). A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* **294**, 2507-2511

You, A., Tong, J.K., Grozinger, C.M., Schreiber, S.L. (2001). CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex. *PNAS* **98**, 1454-1458

Zawel, L. & Reinberg, D. (1993). Initiation of Transcription by RNA Polymerase II: A Multistep Process. *PNAS* **44**, 67-108

Zhang, Q., Yao, H., Vo, N., Goodman, R.H. (2000). Acetylation of adenovirus E1A regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *PNAS* **97**, 14323-14328

## 7. Zusammenfassung

Die DNA eukaryotischer Organsimen assoziiert im Zellkern mit Histonen und weiteren Proteinen zu Chromatin. Die nukleosomalen Histone, verantwortlich für die Kondensation der DNA in Nukleosomen, enthalten in ihren NH2-terminalen Domänen hochkonservierte Lysinreste, die unter anderem von Histon-Acetyltransferasen (HAT) bzw. Histon-Deacetylasen (HDAC) reversibel modifiziert werden. Histon-Acetylierung destabilisiert vermutlich die Chromatinstruktur und ermöglicht so, dass Transkriptionsfaktoren und/oder die generelle RNA-Polymerase II Transkriptionsmaschinerie an Zielgene binden und deren Expression aktivieren können. Im Gegensatz dazu bewirkt Histon-Deacetylierung Chromatinkondensation und somit Transkriptionsrepression. Die "Histon-Code" Hypothese postuliert, dass spezifische Histonmodifikationsmuster mit der Ausführung bestimmter DNAabhängiger Prozesse wie z.B. Transkritpionsaktivierung oder -repression korrelieren. Die funktionelle Verknüpfung von Histon-Acetylierung bzw. -Deacetylierung mit Transkriptionsregulation basiert auf der Assoziation der HATs und HDACs, die als Koaktivatoren und Korepressoren wirken, mit Aktivatoren bzw. Repressoren.

Drosophila Repressoren sind unter anderem für die Regulation der Genexpression während der Körpermusterbildung und der Bildung der Primärgewebe essentiell. Der Zinkfinger Repressor Snail etabliert die Grenze zwischen prospektivem Mesoderm und Neuroektoderm im frühen Embryo. Während Studien, die sowohl eine physikalische als auch genetische Interaktion zwischen Snail und dem Korepressor CtBP zeigten, auf einen CtBPvermittelten Mechanismus deuten, zeigten eigene Studien eine Assoziation von Snail mit HDAC-Aktivität und lassen somit vermuten, dass HDAC-Aktivität and der Snail-vermittelten Transkriptionsrepression beteiligt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion des Repressors Snail mit HDAC-Aktivität funktional charakterisiert. Mit Hilfe von Kopräzipitationsexperimenten unter Verwendung von rekombinantem Snail und embryonalem Drosophila Kernextrakt konnte die Assoziation von Snail mit CtBP oder HDAC1 gezeigt werden. Ein für die vorliegende Arbeit in Kaninchen etablierter anti-Snail Antikörper immunopräzipitierte einen nativen Snail-HDAC1-Komplex aus Kernextrakt, der kein CtBP enthält. Diese Experimente deuten an, dass Snail zwei unterschiedliche Korepressorkomplexe rekrutiert. Weitere Protein/Protein Interaktionsstudien zeigten eine Assoziation von CtBP und HDAC1 im frühen Drosophila Embryo. Da endogenes Snail mit HDAC1 interagiert, nicht jedoch mit dem CtBP-HDAC1-Komplex, scheint die Assoziation von HDAC1 und CtBP die Interaktion zu Snail zu inhibieren. Um die beiden putativen HDAC1 Komplexe, Snail-HDAC1 und CtBP-HDAC1, funktional zu charakterisieren, wurden sie auf ihre HDAC-Aktivität hin untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass die mit Snail assoziierte HDAC aktiv ist, während die mit CtBP-assoziierte HDAC inaktiv ist. Diese Experimente deuten an, dass CtBP die Aktivität assoziierter HDAC(s) inhibiert. Möglich ist auch, dass HDAC1 in beiden Komplexen inaktiv ist, aber Snail mit einer zweiten, nicht charakterisierten, aktiven HDAC assoziiert ist. Dagegen spricht, dass Snail ausser mit HDAC1 mit keiner weiteren bekannten Drosophila HDAC-Aktivität interagiert. Die Resultate dieser Arbeit lassen vermuten, dass Snailabhängige Repression der Transkription durch mindestens zwei funktionell unterschiedliche Korepressor-Komplexe, Snail-CtBP- und Snail-HDAC1, vermittelt wird, die möglicherweise entwicklungsstadium-, gen- oder zelltypspezifisch rekrutiert werden, um die Transkription zu reprimieren.