

**Histon-Desacetylasen der Klasse II:  
Entdeckung, Klonierung und funktionelle  
Charakterisierung der enzymatischen  
Aktivität einer neuen Gruppe  
humaner HDACs**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von  
**Wolfgang Fischle**

Tag der mündlichen Prüfung:

20. Februar 2002

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. U. Weber

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Rupp

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter am Physiologisch-chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und unter der Anleitung von Prof. Dr. E. Verdin am Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California, San Francisco, USA durchgeführt. Sie wurde durch ein Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds (Stuttgart) gefördert.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung, seine Betreuung, motivierende Unterstützung und die Vertretung der Arbeit innerhalb der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. E. Verdin und dem Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California, San Francisco, USA für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit und für die intensive und anregende Betreuung der am Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California, San Francisco durchgeführten Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. U. Weber danke ich für die Übernahme des Mitberichts.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds (Stuttgart) danke ich für das gewährte Stipendium.

Ich danke Herrn Dr. Franck Dequiedt (Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California, San Francisco, USA) für seine Hilfe bei der Untersuchung rekombinanter HDAC-Proteine, Herrn Dr. Michael Hendzel (Cross Cancer Institute, University of Alberta, Canada) für die Immunfluoreszenzuntersuchungen der HDACs der Klasse II, Herrn Dr. Stephane Emiliani (Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California, San Francisco, USA) für seine Hilfe bei der Etablierung des enzymatischen HDAC-Aktivitätstests und Herrn Jerry Garnica für seine Unterstützung bei der Durchführung der Expressionsstudien (Northern Blots, Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California, San Francisco, USA).

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Franck Dequiedt (Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California, San Francisco, USA) für sein Interesse und seine stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Allen meinen Kollegen in der Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts und am Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California, San Francisco, USA gilt mein Dank für die Unterstützung dieser Arbeit. Den Herren John Carroll and Stephen Gonzales danke ich für die unerlässliche Hilfe bei der Erstellung zahlreicher Abbildungen und Graphiken.

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite	
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Chromatin und Transkription in Eukaryonten	1
1.2	Posttranslationale Modifizierung von Chromatin	6
1.3	Acetylierung und Desacetylierung von Histonen	9
1.4	Bedeutung von Histon-Desacetylasen in der transkriptionellen Regulation	13
1.5	HDACs in Hefe und höheren Organismen	16
1.6	Enzymatische Aktivität von HDACs	18
1.7	Strategien zur Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung von HDACs in höheren Eukaryonten	19
1.8	Zielsetzung der Arbeit	21
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
2.1	Material	23
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Allgemeine Materialien	24
2.1.3	Chemikalien	25
2.1.4	Radiochemikalien	26
2.1.5	Molekularbiologische Reagenzien	26
2.1.6	Zellkulturmedien, -reagenzien und -materialien	28
2.1.7	Bakterienstämme	28
2.1.8	Zelllinien	28
2.1.9	Antiseren	29
2.1.9.1	Primäre Antiseren für Western Blotting und Immunpräzipitation	29
2.1.9.2	Sekundäre Antikörper für Western Blotting	31
2.1.9.3	Sekundäre Antikörper zur Immunfluoreszenz	31
2.1.10	Agarosegelelektrophorese	31
2.1.11	Northern Blotting	32
2.1.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32

2.1.12.1	Färbung der Gele	33
2.1.13	Western Blotting	34
2.1.14	Transfektion	34
2.1.15	Radiomarkierung von Zellen	34
2.1.16	Gesamtzellextrakte	35
2.1.17	Kern- und Zytoplasmaextrakte	35
2.1.18	Aufreinigung von IgG	36
2.1.19	Immunpräzipitation	37
2.1.20	GST-Fusionsproteine	37
2.1.21	Herstellung eines <sup>3</sup> H-markierten, peracetylierten H4-Peptidfragments	38
2.1.22	Enzymatischer Aktivitätstest	38
2.1.23	Gelfiltration	39
2.2	Methoden	39
2.2.1	Klonierungen	39
2.2.1.1	Allgemeine Klonierungstechniken	39
2.2.1.2	Klonierung von Expressionskonstrukten mit C-terminalen FLAG- oder HA-Epitopen	40
2.2.1.3	Klonierung von Expressionskonstrukten mit N-terminaler GST	42
2.2.1.4	Verschiedene Konstrukte	42
2.2.1.5	HDAC4-Konstrukte	44
2.2.1.6	Punkt-Mutagenese	45
2.2.1.7	HDAC5-Konstrukte	46
2.2.1.8	HDAC6-Konstrukte	47
2.2.1.9	HDAC7-Konstrukte	48
2.2.1.10	N-CoR-Konstrukte	49
2.2.2	Northern Blotting	50
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
2.2.3.1	Färbung der Gele	51
2.2.3.2	Trocknung der Gele	52
2.2.3.3	Fluorographie	52
2.2.4	Western Blotting	52
2.2.5	Zellkultur	53
2.2.6	Transfektion	53

2.2.6.1	Calciumphosphatmethode	53
2.2.6.2	Lipofektion	54
2.2.6.3	Etablierung konstitutiv-exprimierender Zelllinien	54
2.2.7	Gewinnung von Zellextrakten	55
2.2.7.1	Radiomarkierung von Zellen	55
2.2.7.2	Gesamtzellextrakte	55
2.2.7.3	Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten	55
2.2.8	Transkription und Translation im Retikulozytenlysats	56
2.2.9	GST-Fusionsproteine	57
2.2.9.1	Expression und Aufreinigung	57
2.2.9.2	Bindung rekombinanter, radiomarkierter Proteine	58
2.2.9.3	Bindung zellulärer Proteine	58
2.2.10	Gewinnung und Aufreinigung von Antisera	58
2.2.10.1	Gewinnung von <i>anti</i> -HDAC4- und <i>anti</i> -HDAC7-spezifischen Antisera	58
2.2.10.2	Eliminierung unspezifischer Fraktionen	59
2.2.10.3	Aufreinigung der IgG-Fraktion von Antisera	59
2.2.11	Immunpräzipitation	60
2.2.12	Immunfluoreszenz	60
2.2.13	Enzymatischer Nachweis auf Histon-Desacetylaseaktivität	61
2.2.13.1	Herstellung des Substrats	61
2.2.13.2	Enzymatischer HDAC-Aktivitätstest	62
2.2.14	Gelfiltration über Superose 6	62
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>64</b>
3.1	Klonierung einer neuen Klasse humaner HDACs	64
3.1.1	Identifizierung von humanen Faktoren mit Homologie zu yHDA1	64
3.1.2	Klonierung von humanen Proteinen mit Homologie zu yHDA1	66
3.1.2.1	HDAC4	66
3.1.2.2	HDAC5	67
3.1.2.3	HDAC6	69
3.1.2.4	HDAC7	71
3.1.3	Sequenzanalyse humaner Proteine mit Homologie zu yHDA1	72

3.2	Untersuchung der Expression von HDAC4 und HDAC7 in unterschiedlichen Geweben	75
3.3	Immunfluoreszenzuntersuchungen von HDACs der Klasse II	77
3.3.1	Subzelluläre Lokalisation von HDAC7	77
3.3.2	Feinanalyse der Verteilung von HDAC4 und HDAC7 im Zellkern	79
3.4	Enzymatische Aktivität der HDACs der Klasse II	81
3.4.1	Gewinnung von spezifischen <i>Anti</i> -HDAC4- und <i>Anti</i> -HDAC7-Antisera	81
3.4.2	Herstellung eines Substrats zur Etablierung eines enzymatischen HDAC-Aktivitätstests	82
3.4.3	Nachweis der enzymatischen Aktivität von HDAC7	84
3.4.4	Nachweis der enzymatischen Aktivität von HDAC4	85
3.4.5	Enzymatischer Aktivitätsvergleich von HDACs der Klasse II mit HDACs der Klasse I	85
3.5	Bestimmung der HDAC-Domäne in HDACs der Klasse II	87
3.5.1	Bestimmung der HDAC-Domäne in HDAC4	87
3.5.2	Bestimmung der HDAC-Domäne in HDAC7	88
3.6	Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von HDACs der Klasse II mit einer HDAC-Domäne	90
3.6.1	Untersuchung der enzymatischen Aktivität rekombinanter HDAC4- und HDAC7-Proteine	90
3.6.2	Nachweis der spezifischen Interaktion von rekombinanten GST-HDAC4- und GST-HDAC7-Fusionsproteinen mit HDAC3	92
3.6.3	Nachweis der spezifischen Interaktion endogener HDAC4- und HDAC3-Proteine	93
3.6.4	Nachweis der spezifischen Interaktion von konstitutiv überexprimiertem HDAC4-FLAG mit HDAC3	93
3.6.5	Nachweis der spezifischen Interaktion von transient überexprimiertem HDAC7-FLAG mit HDAC3	94
3.6.6	Untersuchung der Interaktion bei gleichzeitiger transienter Überexpression von HDAC4 und HDAC3	95
3.6.7	Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Colokalisation von HDAC4 und HDAC7 mit HDAC3 im Zellkern	96

3.6.8	Untersuchung der Interaktion der HDACs der Klasse II, HDAC5 und HDAC6, mit HDAC3	99
3.6.9	Nachweis der spezifischen Bindung von HDAC3 an die C-terminale HDAC-Domäne aller HDACs der Klasse II mit nur einer HDAC-Domäne	101
3.6.10	Detaillierte Untersuchung von HDAC4-Mutanten	102
3.6.10.1	Untersuchung von HDAC4-Deletionsmutanten	102
3.6.10.2	Untersuchung von rekombinanten HDAC4-Deletionsmutanten	103
3.6.10.3	Untersuchung von HDAC4-Punktmutanten	104
3.6.11	Bindungsstudien rekombinanter HDAC4- und HDAC7-Proteine mit rekombiantem HDAC3	106
3.6.12	Identifizierung zellulärer Faktoren, die die Bindung von HDAC4 und HDAC7 mit HDAC3 vermitteln	107
3.6.12.1	Affinitätschromatographische Identifizierung von Proteinen, die HDAC4 und HDAC3 spezifisch binden	107
3.6.12.2	Immunchemische Identifizierung der gleichzeitig von HDAC4 und HDAC3 gebundenen hochmolekularen Faktoren	109
3.6.13	Untersuchung der Bindung von SMRT und N-CoR an HDAC7	111
3.6.14	Bestimmung der HDAC4- und HDAC3-Bindungsdomänen in N-CoR	111
3.6.15	Identifizierung der HDAC7-bindenden Domänen in N-CoR	113
3.6.16	Untersuchung der Bindung von HDAC7-Deletionsmutanten an N-CoR und SMRT	114
3.6.17	Untersuchung der Bindung von HDAC4-Punktmutanten an N-CoR	115
3.6.18	Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von HDAC4 in Abwesenheit von HDAC3	116
3.6.18.1	HDAC3-Immundepletion	117
3.6.18.2	Depletion von HDAC3 mit GST-HDAC4	119
3.6.19	Affinitätsaufreinigung von HDAC4	120
3.6.19.1	Affinitätsaufreinigung von enzymatisch inaktivem überexprimiertem HDAC4-FLAG	120
3.6.19.2	Affinitätsaufreinigung von enzymatisch inaktivem endogenem HDAC4	122



3.6.20	Chromatographische Auftrennung aktiver und inaktiver HDAC4-Komplexe	123
3.6.21	Nachweis enzymatisch aktiver HDAC4-HDAC3-SMRT/N-CoR-Komplexe	124
3.6.22	Nachweis der Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von HDAC4 und HDAC7 von denselben Cofaktoren	126
3.6.23	Untersuchung der gegenseitigen Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der HDAC4- und HDAC7-Komplexe	127
3.7	Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität einer HDAC der Klasse II mit zwei HDAC-Domänen, HDAC6	128
3.7.1	Untersuchung der enzymatischen Aktivität der HDAC-Domänen in HDAC6	129
3.7.2	Untersuchung der enzymatischen Aktivität rekombinanter HDAC6-Proteinfragmente	130
3.7.3	Bindungsstudien der isolierten HDAC-Domänen von HDAC6	131
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>133</b>
4.1	Eine neue Klasse humaner HDACs, HDACs der Klasse II	134
4.2	Enzymatische Aktivität der HDACs der Klasse II	136
4.3	Corepressorkomplexe und HDAC-Aktivität	141
4.4	HDACs und HDAC-Aktivität	144
4.5	Ausblick	146
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>148</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>154</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

$\alpha$	<i>anti-</i>
aa	Aminosäuren (“ <i>amino acids</i> ”)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAC	künstliches Chromosom in Bakterien (“ <i>bacterial artificial chromosome</i> ”)
BGH	Rinderwachstumshormon (“ <i>bovine growth hormone</i> ”)
bp	Basenpaare
BOP	Benzotriazolyl-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat
BSA	Rinderserumalbumin (“ <i>bovine serum albumin</i> ”)
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Zählungen pro Minute (“ <i>counts per minute</i> ”)
DMEM	Dulbecco’s modifiziertes Eagle Medium (“ <i>Dulbecco’s modified Eagle Medium</i> ”)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	foetales Kälberserum
FPLC	Protein-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (“ <i>fast protein liquid chromatography</i> ”)
GSH	Glutathion (reduziert)
GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	Histon-Acetyltransferase
HBS	HEPES-gepufferte Kochsalzlösung (“ <i>HEPES buffered saline</i> “)
HDAC	Histon-Desacetylase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N’-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (“ <i>high pressure liquid chromatography</i> ”)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani

LPLC	Niederdruckflüssigkeits-Chromatographie (“ <i>low pressure liquid chromatography</i> ”)
NMR	Kernspinresonanz (“ <i>nuclear magnetic resonance</i> ”)
Nonidet® P40	4-Nonylphenolpolyethylenglykol
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	Leserahmen (“ <i>open reading frame</i> ”)
<i>ori</i>	Replikationsursprung (“ <i>origin of replication</i> ”)
pA	Polyadenylierungssignal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	periphere Leukozyten (“ <i>peripheral blood leucocytes</i> ”)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (“ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
PCR	Polymerasekettenreaktion (“ <i>polymerase chain reaction</i> ”)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RD	Repressordomäne
RP	Umkehrphase (“ <i>reversed phase</i> ”)
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodekylsulfat (“ <i>sodium dodecyl sulfate</i> ”)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (“ <i>Tris buffered saline</i> ”)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure (“ <i>trifluoro acetic acid</i> ”)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton® X-100	Oktylphenolpoly(ethylenglykolether) <sub>x</sub>
TSA	Trichostatin A
Tween® 20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
UTR	nicht-translatierte Region (“ <i>untranslated region</i> ”)

# 1 EINLEITUNG

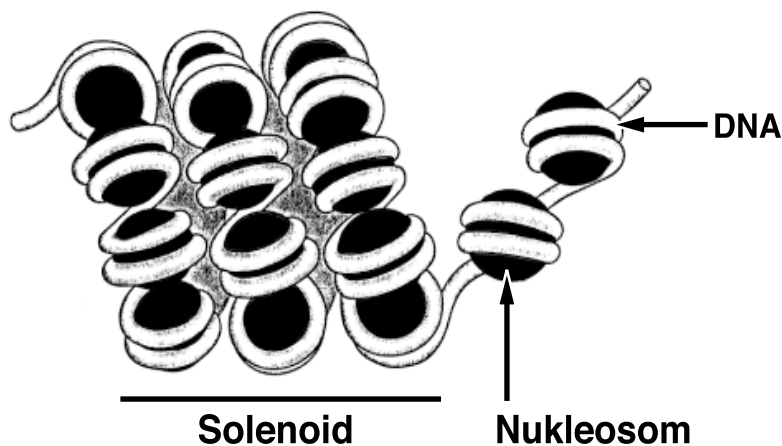
Im Zellkern eukaryontischer Zellen liegt DNA nicht alleine sondern in Form von Chromatin, dicht gepackt mit Proteinen, vor allem basischen Histonen, vor (van Holde, 1988; Wolffe, 1998b; Kornberg und Lorch, 1999). Diese Komplexierung schränkt die Verfügbarkeit der DNA für fundamentale zelluläre Vorgänge wie Replikation und Transkription stark ein. Chromatin ist jedoch nicht nur ein statisches, inaktives Schutzgerüst für die in DNA gespeicherte genetische Information, sondern spielt vielmehr eine aktive und dynamische Rolle bei der Regulation essentieller Abläufe im Zellkern (Struhl, 1998). So wurde bereits vor mehr als 30 Jahren erkannt, daß in eukaryontischen Zellen, die eine hohe generelle Transkriptionsrate aufweisen, Histone überwiegend acetyliert vorliegen. Dies führte frühzeitig zur Annahme, daß die Expression von Genen in Eukaryonten unter anderem über die posttranslationale Modifizierung von Histonen gesteuert wird (Allfrey et al., 1964; Pogo et al., 1966). Während der letzten Jahre wurde diese Hypothese vor allem durch die Klonierung und Untersuchung einer Vielzahl von Proteinen und enzymatischen Aktivitäten untermauert, die durch Veränderung der lokalen Chromatinstruktur zur Aktivierung und Repression der meisten Gene beitragen (Workman und Kingston, 1998). Zudem wird mehr und mehr deutlich, daß Veränderungen der Chromatinstruktur eine wichtige Rolle bei der Entstehung und malignen Transformation einer Vielzahl von Tumoren spielen (Fenrick und Hiebert, 1998; Archer und Hodin, 1999; Marks et al., 2000).

## 1.1 Chromatin und Transkription in Eukaryonten

Die DNA eukaryontischer Chromosome liegt nicht nackt vor. Sie ist fest mit einer Gruppe relativ kleiner basischer Proteine, den Histonen (Molekulargewicht 11-21 kDa), verbunden. Der Nukleoproteinkomplex aus DNA, Histonen und Nicht-Histonproteinen wird als Chromatin bezeichnet (Abbildung 1). Verschiedene Beobachtungen führten zur Etablierung des Begriffs Nukleosom als funktionelle, sich wiederholende Einheit des Chromatins: (a) dekondensiertes Chromatin zeigt im Elektronenmikroskop und bei Röntgenbeugung eine Perlenkettenstruktur (*“beads on a string”*; Olins und Olins, 1974; Olins et al., 1975; Oudet et al., 1975); (b) nach

Verdau mit endogenen und exogenen Nukleasen wird eine 200 bp-Leiter an DNA-Fragmenten beobachtet (Hewish und Burgoyne, 1973; Noll, 1974); (c) Ultrazentrifugationsstudien ergeben eine Größe des Nukleoproteinkomplexes von 11,5S (Sahasrabudde und Van Holde, 1974).

Jedes Nukleosom besteht aus einem sogenannten Nukleosomkern (“Core”). Dabei sind 146 bp DNA in 1,65 Windungen einer linksgängigen Helix um ein Oktamer der sogenannten “Core”-Histonproteine, H2A, H2B, H3 und H4, gewunden (Abbildung 2; van Holde, 1988; Wolffe, 1998b; Kornberg und Lorch, 1999). Die stabile Bildung eines Nukleosom-“Core”-Komplexes ist von der Heterodimerisierung H3 mit H4 sowie der anschließenden Dimerisierung von H3 zum (H3-H4)<sub>2</sub>-Tetramer abhängig. Im zentralen Histonoktamer sind (H2A-H2B)-Dimere auf jeder Seite des zentralen (H3-H4)<sub>2</sub>-Tetramers gebunden. So entsteht ein linksgängiger superhelikaler Kern, auf den die DNA gewickelt ist (Klug et al., 1980; Arents et al., 1991; Luger et al., 1997b). Einzelne Nukleosom-“Core”-Komplexe sind über “Linker”-DNA-Einhei-

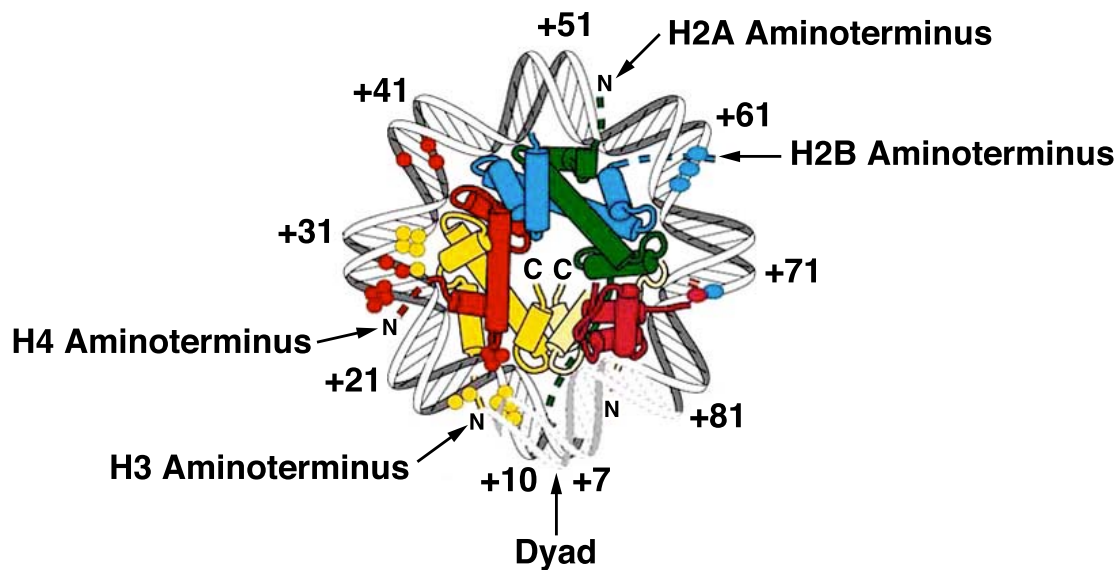


**Abbildung 1. Schematische Darstellung der Packung von DNA in Chromatin im eukaryontischen Zellkern.** Eine 30 nm-Faser (sog. Solenoid) als übergeordnete Struktur einzelner Nukleosome ist gezeigt (Finch und Klug, 1976). Jedes Nukleosom besteht

(a) aus einem sogenannten Nukleosom-“Core”, entsprechend 146 bp an DNA, die in 1,65 Windungen einer linksgängigen Helix um ein Histonoktamer gewunden sind, (b) dem “Linker”-Histon H1 (in der Abbildung der Übersicht wegen weggelassen) und (c) der “Linker”-DNA zwischen den Nukleosom-“Core”-Komplexen. Einheiten, die aus dem Nukleosom-“Core”, dem “Linker”-Histon H1 und 168 bp an DNA (entsprechend dem Nukleosom-“Core” und 22 bp, an die vorwiegend H1 gebunden ist) bestehen, werden auch als Chromatosome bezeichnet (Simpson et al., 1978). Lineare Anordnungen von Nukleosomen (sogenannte “Perlenkette”, 10 nm-Faser, “beads on a string”) werden nur bei unphysiologisch niedriger Ionenstärke beobachtet. Unter physiologischen Bedingungen bilden sich spontan und selbständig Strukturen höherer Ordnung, sogenannte Chromatinfasern. Individuelle Chromatinfasern können direkt zur basalen Matrix der Chromosome kondensieren (Wolffe, 1998b).

ten unterschiedlicher Länge miteinander verbunden. An diese binden Histone vom H1-Typ, die an der Kompaktierung des Chromatins zu Strukturen höherer Ordnung beteiligt sind (Abbildung 1; Carruthers et al., 1998). Während “Core”-Histone essentielle Komponenten des Chromatins und der Bildung von Chromatin darstellen, sind “Linker”-Histone nicht essentiell (Dasso et al., 1994). Sie sind unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zu den “Core”-Histonen auch weniger stark an Chromatin gebunden.

Die C-terminalen Domänen aller “Core”-Histone besitzen eine ähnlich kompakte und äußerst stabile Tertiärstruktur (Abbildung 2). Eine zentrale längere  $\alpha$ -Helix wird auf beiden Seiten von kürzeren Helices und Schleifen, die mit der DNA interagieren, flankiert (Histonfaltungsmotif oder “*handshake motif*”; Arents et al., 1991). 1/4 der Aminosäuren der “Core”-Histone liegen außerhalb der Histonfaltungsdomänen. Diese Regionen entsprechend den 15-30 Aminosäuren am N-Terminus aller “Core”-Histone sowie dem C-Terminus von H2A sind gegenüber proteolytischem



**Abbildung 2. Struktureller Aufbau eines Nukleosoms.** Ansicht eines Nukleosoms entlang der superhelicalen Achse entsprechend der röntgenkristallographischen Analyse eines Nukleosom-“Core”-Komplexes (Luger et al., 1997a). Das Histonoktamer im Nukleosom-“Core”-Komplex besteht aus einem zentralen (H3-H4)<sub>2</sub>-Tetramer, an das auf beiden Seiten entlang der superhelicalen Achse in versetzter Anordnung (H2A-H2B)-Dimere gebunden sind. Die Austrittspositionen der N-terminalen Extensionen der proximalen “Core”-Histone aus dem “Core”-Komplex sind soweit festgelegt indiziert. Die distalen “Core”-Histone sind teilweise verdeckt.  $\alpha$ -helicale Sekundärstrukturen sind als Zylinder dargestellt. Die sogenannte Dyaden-Symmetrieachse ist angedeutet.

Verdau sehr sensitiv (*“histone tails”*; Bohm und Crane-Robinson, 1984). Obwohl proteolytische Entfernung dieser Domänen die Konformation individueller Nukleosomen nur unwesentlich beeinflusst (Ausio et al., 1989) und diese Regionen für die Bildung von Nukleosomen und deren Positionierung entbehrlich sind (Dong und van Holde, 1991; Hayes et al., 1991), vermitteln sie kritische Kontakte zwischen einzelnen Nukleosomen und sind für die Entsehung höher geordneter Strukturen von essentieller Bedeutung (Garcia-Ramirez et al., 1992; Garcia-Ramirez et al., 1995; Tse und Hansen, 1997; Tse et al., 1998). In der röntgenkristallographischen Analyse eines einzelnen Nukleosom-“Core“-Komplexes konnten die Positionen dieser N- und C-terminalen Domänen nicht aufgelöst werden (Luger et al., 1997b). Ebenso zeigen diese in NMR-Untersuchungen eine wenig geordnete Struktur (Smith und Rill, 1989). Es gilt jedoch als gesichert, daß die N-terminalen Regionen der Histone aus dem Nukleosom-“Core“ herausragen. Somit stehen diese an der Oberfläche der Nukleosome sowohl für den Kontakt mit benachbarter DNA als auch für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen zur Verfügung. Derartige internukleosomale DNA-Histon-Kontakte konnten unter verschiedenen Bedingungen nachgewiesen werden (Cary et al., 1982; Pruss und Wolffe, 1993; Lee und Hayes, 1997). Die Primärstruktur gerade dieser N-terminalen Regionen der “Core“-Histone ist evolutionell extrem konserviert (van Holde, 1988).

Nukleosomen sind von bemerkenswerter Stabilität und Anordnungen von Nukleosomen assoziieren unter physiologischen Bedingungen selbständig zu stabilen Strukturen höherer Ordnung (Abbildung 1). Diese erreichen im Zellkern eine Konzentration von über 50 mg/ml (van Holde, 1988; Wolffe, 1998b). Trotz der hohen Stabilität und des enormen Komplexierungsgrades laufen metabolische Prozesse der DNA innerhalb der Zelle äußerst effizient ab. Chromatinfasern sind im Zellkern in getrennten funktionellen Bereichen angeordnet und transkriptionell aktive Gene werden in chromosomalen Domänen, die durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Verdau mit DNase I gekennzeichnet sind, gefunden (Wolffe, 1998b; Kornberg und Lorch, 1999; Zlatanova et al., 1999). Diese Regionen entsprechen weitgehend dem über die Färbbarkeit der DNA mit bestimmten Farbstoffen definierten Begriff des Euchromatins (van Holde, 1989; Kornberg und Lorch, 1999). Heterochromatin ist hingegen an transkriptionell inaktiven Sequenzen angereichert. Während das transkriptionelle Potential ganzer Domänen über sogenannte Insulatoren und Locus-

kontrollregionen gesteuert wird (Bell und Felsenfeld, 1999; Grosveld, 1999), zeigen lediglich “Enhancer”- und Promoterregionen gegenüber dem Verdau mit *Micrococcus*-Nuklease hypersensitive Bereiche von wenigen hundert Basenpaaren (Varshavsky et al., 1979; Wu, 1980; Almer und Horz, 1986). Es wird angenommen, daß die lokale Chromatinstruktur derartiger “hypersensitiver” Regionen frei von Nukleosomen ist und daß dort sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren an die sonst nackte DNA gebunden sind.

Generell blockiert die Einbindung der DNA in Nukleosome und Chromatin die Initiation der Transkription (Knezetic und Luse, 1986; Lorch et al., 1987). Das Wickeln der DNA um Histonoktamere führt zu einer signifikanten sterischen Behinderung der Bindung von Transkriptions- und Initiationsfaktoren und deren Zugang zu entsprechenden Erkennungssequenzen. Transkriptionsfaktoren müssen sich der superhelikalen Biegung nukleosomaler DNA anpassen und die dem Histonoktamer zugewandten Nukleotide stehen nicht zur Bindung und Erkennung von Aktivatoren und Repressoren zur Verfügung. Tatsächlich ist die Bindungsaffinität der meisten Transkriptionsfaktoren um zwei bis drei Größenordnungen reduziert, wenn die jeweiligen Erkennungssequenzen nicht als nackte DNA sondern eingebettet in Chromatin vorliegen (Collingwood et al., 1999). So wird die von Nukleosom-freien Promotern mit TATA-Box-Sequenzen gemessene basale Transkription durch Chromatinisierung äußerst effizient inhibiert (Patterson und Simpson, 1994). Über den TATA-Boxen angeordnete Nukleosome müssen umstrukturiert werden, um ein effizientes Funktionieren des basalen Transkriptionsapparates zu ermöglichen. Spezialisierte Transkriptionsfaktoren wie der Glucocorticoidrezeptor (GR) und der Thyroidhormonrezeptor (TR) können jedoch an entsprechende Erkennungssequenzen binden, auch wenn diese in Chromatin eingebunden sind. Die Bindung derartiger Regulatoren innerhalb von Chromatin ermöglicht eine gezielte Steuerung der Transkription durch Rekrutierung enzymatischer Komplexe, die Chromatin posttranslational modifizieren und Histon-DNA-Wechselwirkungen beeinflussen (Workman und Kingston, 1998).

Genetische Studien in *Saccharomyces cerevisiae* bestätigen eine essentielle und spezifische Funktion der Histone bei der Kontrolle der Transkription vieler Gene (Grunstein, 1990; Grunstein, 1997a). So führt die Eliminierung der Nukleosome durch genetische Manipulation einzelner Histongene zu einer generellen Aktivierung



der Transkription aller normalerweise unter gleichen Bedingungen inaktiven Gene (Han und Grunstein, 1988). Für die Repression der basalen Transkription sind die N-Termini aller vier "Core"-Histone essentiell (Lenfant et al., 1996). Punktmutationen innerhalb der N-terminalen Domänen der "Core"-Histone, die die Basizität dieser Regionen verringern (beispielsweise Austausch von Lysin durch Glutamin), erlauben die Transkription von Genen unabhängig von spezifischen Coaktivatoren (Zhang et al., 1998a). Außerdem können Mutationen im Histonfaltungsmotif selbst zur Aktivierung reprimierter Gene führen (Kruger et al., 1995; Santisteban et al., 1997). Es wird deshalb angenommen, daß sowohl Wechselwirkungen der zentralen Oktamerregion ("*histone-fold*") mit der DNA innerhalb des Nukleosom-"Core"-Komplexes als auch Interaktionen der aus dem "Core" herausragenden N- und C-terminalen Domänen der "Core"-Histone entlang und außerhalb der Chromatinfaser zur transkriptionellen Repression beitragen (Kornberg und Lorch, 1999).

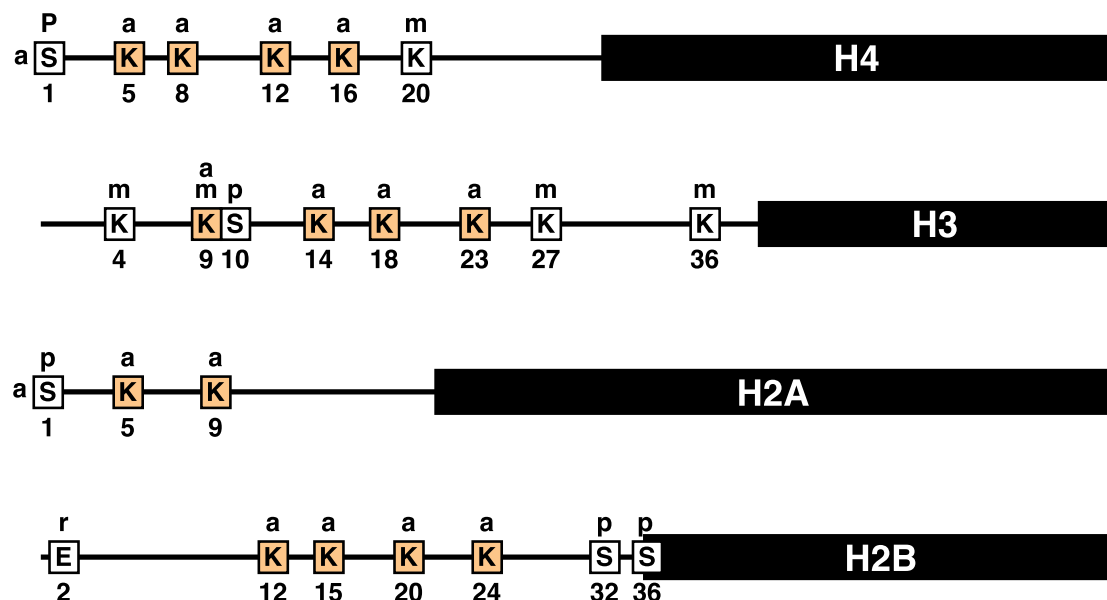
## **1.2 Posttranslationale Modifizierung von Chromatin**

Der generell repressive Effekt, den Chromatin auf die Transkription von Genen ausübt, wird durch eine regulierte, lokale Veränderung der Chromatinstruktur modifiziert. Sogenannte ATP-abhängige Chromatin-"Remodeling"-Komplexe wirken dabei der Repression, die durch DNA-Histon-Wechselwirkungen innerhalb der Nukleosom-"Core"-Komplexe vermittelt werden, entgegen. Die Kondensation der Chromatinfaser und die Wechselwirkung benachbarter Nukleosome wird hingegen über die posttranslationale Modifizierung der "Core"-Histone gesteuert (Workman und Kingston, 1998; Kornberg und Lorch, 1999; Wolffe und Hayes, 1999).

Genetische und biochemische Studien führten zur Identifizierung einer Reihe von Proteinkomplexen, die in der Lage sind die Struktur des Chromatins und der Nukleosome unter Verbrauch von ATP zu verändern. Derartige Komplexe (die sogenannten SWI/SNF-, NURF-, RSC-, CHRAC- und ACF-Komplexe) spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Transkription. Sie ermöglichen den Zugang der Transkriptionsmaschinerie zu Genen, die in Chromatin eingebettet sind (Kingston et al., 1996), und sind in der Lage, die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder den Zugang von Restriktionsenzymen zu nukleosomaler DNA zu erhöhen (Wu, 1997;

Kingston und Narlikar, 1999; Peterson und Workman, 2000). Obwohl die exakten Funktionsweisen derartiger Komplexe noch nicht völlig aufgeklärt sind, steht fest, daß sie die Verfügbarkeit der DNA unter Hydrolyse von ATP erhöhen, ohne wirklich Histone zu entfernen. Mechanismen, die die Mobilität von einzelnen Nukleosomen entlang der DNA erhöhen oder die Histonoktamere zwischen unterschiedlichen DNA-Strängen oder verschiedenen Positionen auf einunddemselben Strang austauschen, werden diskutiert (Kornberg und Lorch, 1999; Peterson und Workman, 2000; Wu und Grunstein, 2000).

Nicht zuletzt aufgrund der hohen relativen Häufigkeit von Histonproteinen in eukaryontischen Zellen wurden kovalente posttranslationale Modifikationen der Histone bereits frühzeitig beschrieben (Allfrey et al., 1964; Pogo et al., 1966). Die N-terminalen Regionen der "Core"-Histone unterliegen der Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, und ADP-Ribosylierung (Abbildung 3; van Holde, 1988; Wolffe, 1998b). Zunächst wurden diese Modifikationen lediglich indirekt mit unterschiedlichen physiologischen Vorgängen wie Transkriptionsaktivität, Etablierung des Chromatins, Reparatur der DNA und Rekombination von Genen in Verbindung ge-



**Abbildung 3. Posttranslationale Modifizierung der N-terminalen Region der "Core"-Histone.** Die wenig strukturierten N-terminalen Regionen der Core Histone sind ausgedehnt und in Proportion zur Größe der  $\alpha$ -helikalen C-terminalen Domänen dargestellt (symbolisiert durch Balken). Die Position posttranslational modifizierter Aminosäuren in den jeweiligen "Core"-Histonen ist indiziert: (a) Acetylierung, (m) Methylierung, (p) Phosphorylierung, (r) ADP-Ribosylierung.

bracht (Loidl, 1988; Ausio, 1992; Bradbury, 1992; Loidl, 1994; Davie, 1998; Mizzen und Allis, 1998). Erst in den letzten Jahren gelang es vor allem durch die Charakterisierung der beteiligten enzymatischen Aktivitäten und der Entwicklung hochspezifischer Antisera, direkte kausale Zusammenhänge zwischen den spezifischen Modifizierungen einzelner Aminosäuren der "Core"-Histone und entsprechenden molekularen Mechanismen in der Zelle herzustellen (Spencer und Davie, 1999; Turner, 2000).

Die bei weitem häufigste posttranslationale Modifizierung ist die reversible Acetylierung aller vier "Core"-Histone (Abbildung 3). Diese Modifikation von spezifischen Lysinresten in den N-terminalen Regionen der Histon-Proteine ist eng mit der transkriptionellen Aktivität entsprechender Regionen des Chromatins oder Genoms verknüpft und spielt darüber hinaus bei der Replikation von DNA eine wichtige Rolle (Turner und O'Neill, 1995; Cheung et al., 2000).

Die Phosphorylierung der Histone H1 und H3 wurde zunächst mit der Kondensation der Chromosomen während der Mitose in Verbindung gebracht (Bradbury, 1992; Koshland und Strunnikov, 1996). Neuere Studien zeigen jedoch, daß die Phosphorylierung von Ser10 in H3 bei der Induktion zahlreicher Gene eine wichtige Rolle spielt (Sassone-Corsi et al., 1999).

Sowohl H2A als auch H2B können in ihrer C-terminalen Region ubiquitiniert werden (Wolffe, 1998b). Die Ubiquitinierung von H2A scheint mit der transkriptionellen Aktivität von entsprechenden Genen einherzugehen (Levinger und Varshavsky, 1982). Die ADP-Ribosylierung von "Core"-Histonen könnte hingegen eine wichtige Rolle bei der Reparatur der DNA spielen (van Holde, 1988; Wolffe, 1998b).

Da Acetylierung, Phosphorylierung und Mehrfachmethylierung von Histonen direkt zu einer Veränderung der Nettoladung der N-terminalen Regionen der "Core"-Histone führen, wird angenommen, daß diese direkt zu einer Veränderung der internukleosomalen Wechselwirkungen führen (Wolffe, 1998b; Workman und Kingston, 1998; Kornberg und Lorch, 1999). Ebenso könnten Ubiquitinierung oder ADP-Ribosylierung eine lokale Entfaltung der Chromatinfaser hervorrufen.

Histon-Modifikationen können die Struktur des Chromatins jedoch nicht nur direkt über die Beeinflussung der Histon-DNA- und Histon-Histon-Kontakte regulieren (Hansen et al., 1998; Wolffe und Hayes, 1999). Auf der Basis der bemerkenswerten Diversität, der hohen biologischen Spezifität und der variablen Kombi-

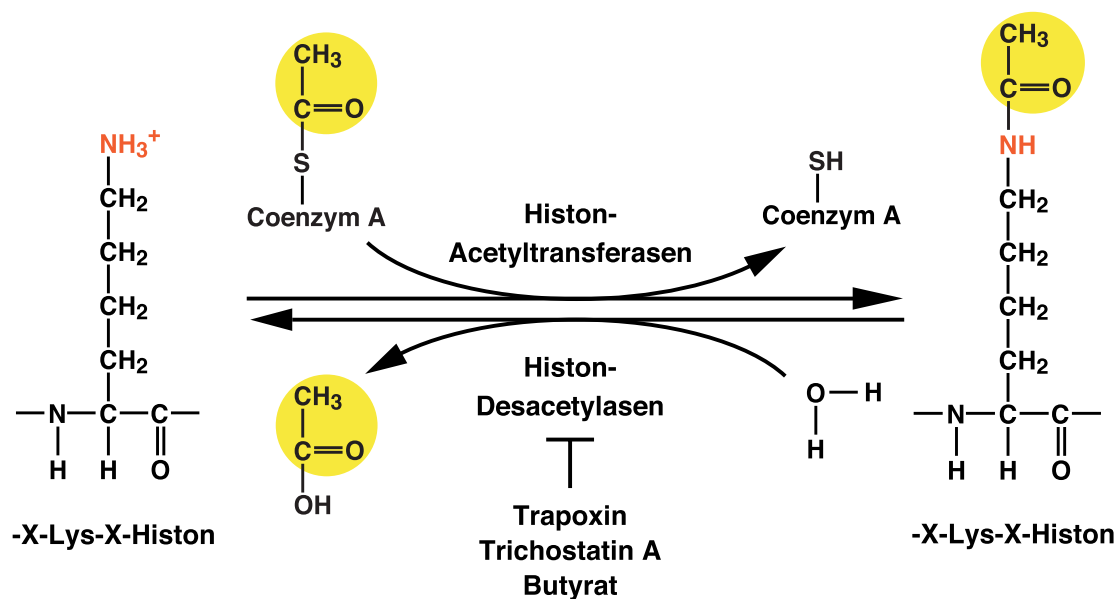
nationsmöglichkeiten, die mit bestimmten kovalenten Modifikationen der Histone einhergehen, wurde ein sogenannter “Histon-Code” formuliert (Strahl und Allis, 2000). Dieser postuliert, daß unterschiedliche Kombinationen posttranslationaler Modifikationen von entsprechenden Proteinen oder Proteinmodulen abgelesen und in biologische Prozesse umgesetzt werden. So sind Proteine mit sogenannten Bromodomänen beispielsweise in der Lage, die Acetylierung von Lysinen zu erkennen (Dhalluin et al., 1999; Jacobson et al., 2000). Chromodomänen hingegen wurden mit der Bindung von Methylresten in H3 in Verbindung gebracht (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Außerdem wurden verschiedene Hinweise gefunden, daß sich die posttranslationalen Modifizierungen der Histone gegenseitig beeinflussen (Strahl und Allis, 2000).

### **1.3 Acetylierung und Desacetylierung von Histonen**

Im Gegensatz zur cotranslationalen Acetylierung der N-terminalen  $\alpha$ -Aminogruppe zahlreicher Proteine, unterliegt die Acetylierung der Histone posttranslationalen Mechanismen und ist darüber hinaus reversibel. Histon-Acetyltransferasen (HAT) übertragen die aktivierte Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe konservierter Lysinreste in der N-terminalen Region der “Core”-Histone. Die Einführung einer Acetylgruppe neutralisiert die unter physiologischen Bedingungen positiv geladene  $\epsilon$ -Aminogruppe durch Bildung einer Amidbindung. Außerdem wird die Hydrophobizität der N-terminalen Regionen erhöht. In der entgegengesetzten Reaktion vermitteln Histon-Desacetylasen (HDAC) die Hydrolyse der Amidbindung. Dabei wird als Reaktionsprodukt Acetat frei (Abbildung 4).

Obwohl die exakten Mechanismen, mit denen die Acetylierung der “Core”-Histone zu einer Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften des Chromatins führt, nicht eindeutig geklärt sind, steht fest, daß die transkriptionellen Eigenschaften des Chromatins auf mehreren strukturellen Ebenen beeinflußt werden. So können Transkriptionsfaktoren an entsprechende Erkennungssequenzen innerhalb Chromatin leichter binden, nachdem die “Core”-Histone acetyliert wurden (Wolffe et al., 1993; Vettese-Dadey et al., 1996). Außerdem ist die Effizienz der Transkription von acetyliertem Chromatin im Vergleich zu nicht-acetyliertem Chromatin deutlich bes-

ser. Eine ähnliche Steigerung der Transkriptionsrate wird auch nach proteolytischem Abverdau der N-terminalen Histon-Domänen gemessen (Lee et al., 1993). Obwohl der Kontakt zur DNA selbst nicht verloren geht (Mutskov et al., 1998), wird die Affinität der N-terminalen Domänen der “Core”-Histone für die Bindung von mononukleosomaler DNA durch die Acetylierung reduziert (Hong et al., 1993; Puig et al., 1998). Außerdem wurde eine Veränderung des “Supercoilings” nukleosomaler DNA nach Acetylierung beobachtet (Norton et al., 1989; Krajewski und Becker, 1998). Acetylierte Histone scheinen im Vergleich zu nicht acetylierten Histonen eine erhöhte Mobilität entlang der DNA aufzuweisen (Cary et al., 1982). Neben den Auswirkungen auf die Eigenschaften und die Struktur einzelner Nucleosome, führt die Acetylierung durch Verminderung der Wechselwirkungen benachbarter Nucleosome zu einer generellen Destabilisierung höher geordneter Strukturen wie zum Beispiel der 30 nm-Chromatinfaser (Nightingale et al., 1998; Tse et al., 1998). Interessanterweise



**Abbildung 4. Acetylierung und Desacetylierung der ε-Aminogruppe in “Core”-Histonen.** Das dynamische Gleichgewicht der Acetylierung von Lysinresten in den N-terminalen Regionen der “Core”-Histone wird durch kompetitierende Enzyme mit Histon-Acetyltransferase- und Histon-Desacetylaseaktivität gesteuert. Die Acetylierung maskiert die unter physiologischen Bedingungen positiv geladene ε-Aminogruppe der N-terminalen Regionen in einer Amidbindung. Außerdem nimmt die Hydrophobizität der N-terminalen Domäne der “Core”-Histone durch diese Modifizierung zu. Histon-Desacetylaseinhibitoren (Trapoxin, Trichostatin A, Butyrat) verschieben das dynamische Gleichgewicht der Acetylierung und induzieren eine Hyperacetylierung der “Core”-Histone.

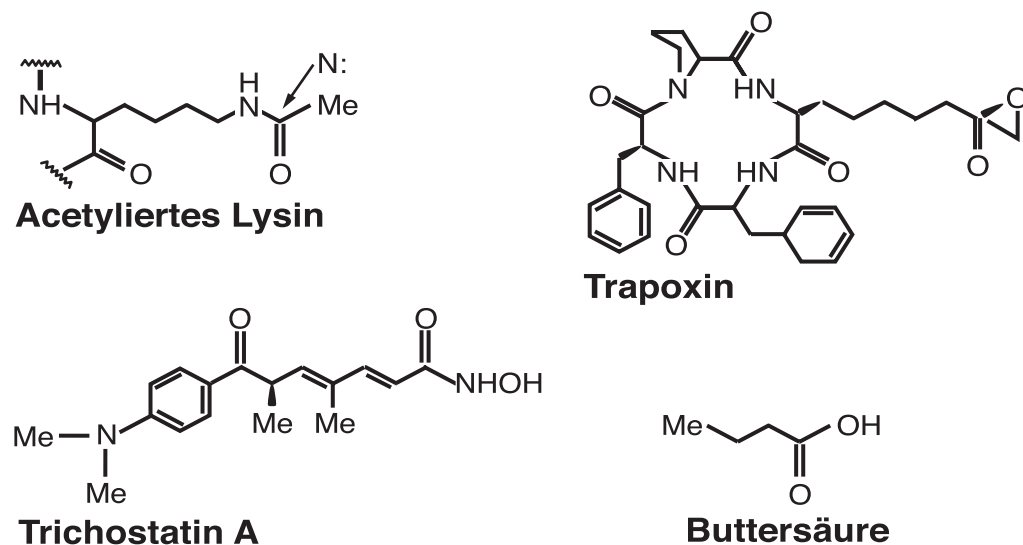
scheint die Gesamtzahl an Acetylierungen, die nötig sind, die Transkription nukleosomaler DNA zu erleichtern, relativ gering zu sein. In definierten Modellsystemen ist hierzu bereits die Acetylierung von 12 der insgesamt 28 acetylierbaren Lysinseitenketten ausreichend (Tse et al., 1998). Die Verringerung der Wechselwirkung der N-terminalen Domänen mit anderen Komponenten des Chromatins (beispielsweise nukleosomaler DNA, "Linker"-DNA, benachbarten Histone) scheint durch andere mit der Acetylierung einhergehende Effekte verstärkt zu werden. Die kontrollierte Bindung von Nicht-Histon-Proteinen, wie zum Beispiel Chromatin-"Remodeling"-Komplexen und anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie, scheinen hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen (Strahl und Allis, 2000).

Allfrey und Kollegen postulierten bereits vor mehr als 35 Jahren unmittelbar nach der Entdeckung der posttranslationalen Histonacetylierung, daß diese Chromatinmodifikation mit der transkriptionellen Aktivität in eukaryontischen Zellen verknüpft ist (Allfrey et al., 1964; Pogo et al., 1966). In der Folgezeit konnten mechanistisch und physiologisch bedeutsame Verbindungen zwischen der Acetylierung von "Core"-Histonen und der transkriptionellen Regulation hergestellt werden. Wie die biochemische Analyse zeigt, sind hyperacetylierte Histone präzise in bestimmten, besonders aktiven Domänen des Euchromatins angereichert (Hebbes et al., 1988; Hebbes et al., 1994). Hypoacetylierte Histone hingegen akkumulieren innerhalb transkriptionell inaktiver Regionen wie Heterochromatin oder dem inaktivierten X-Chromosom der Säugetiere (Braunstein et al., 1993). So stimmt innerhalb einer chromosomalen Domäne das Ausmaß an Acetylierung generell mit der Transkriptionsrate dieser Region überein (Jeppesen und Turner, 1993). Genetische Studien in *S. cerevisiae* zeigen, daß sich das Muster an exprimierten Genen drastisch verändert, wenn Lysinreste in der N-terminalen Region von H4 nach Arginin, das nicht acetyliert werden kann, mutiert werden (Durrin et al., 1991).

Die Acetylierung der Histone stellt einen äußerst dynamischen Vorgang dar (Wolffe, 1998a; Davie und Spencer, 1999), wobei die Acetylierungs- und Desacetylierungsraten innerhalb des Genoms stark unterschiedlich sind. Die Acetylierung von hyperacetylierten Histonen in transkriptionell aktiven Domänen des Chromatins zeigt eine Umsatzrate von wenigen Minuten während hypoacetylierte Histone in transkriptionell inaktiven Regionen viel langsamer umgesetzt werden (Davie und Chadee, 1998). Veränderungen des Acetylierungsgrades von Histonen in eng einge-

grenzten, diskreten Bereichen des Chromatins, die der Promotorregion verschiedener Gene entsprechen, konnten direkt mit der Aktivierung und Repression dieser Loci in Verbindung gebracht werden (Kadosh und Struhl, 1998b; Rundlett et al., 1998). Derartig lokale und temporäre Veränderungen des Acetylungsgrades Promoter-naher Histone sind der konstanten Umsetzung der Acetylierung und Desacetylierung nahezu des gesamten Genoms überlagert (Kuo et al., 2000; Vogelauer et al., 2000).

Die Entdeckung von Substanzen und Toxinen, die in der Lage sind durch Inhibierung von HDACs eine Verschiebung des dynamischen Gleichgewichts (*“steady state level”*) der Acetylierung von Histonen in Richtung Hyperacetylierung herbeizuführen, bedeutete einen immensen Fortschritt bei der Untersuchung der Bedeutung dieser Chromatinmodifikation (Abbildungen 4 und 5; Yoshida et al., 1990). Toxine wie Trichostatin A (TSA) und Trapoxin, die aus Schimmelpilzen isoliert wurden, zeigen dabei ein Wirkungspotential im nanomolaren Bereich (Yoshida et al., 1995). Behandlung eukaryontischer Zellen mit derartig potenten Inhi-



**Abbildung 5. HDAC-Inhibitoren.** Vergleich der Strukturen von  $\epsilon$ -acetyliertem Lysin, Butyrat und den aus Schimmelpilzen isolierten Toxinen Trichostatin A (TSA) und Trapoxin. HDAC-Inhibitoren können aufgrund ihrer Struktur folgendermaßen klassifiziert werden: (1) Fettsäuren mit kurzem Alkylrest (Butyrat), die HDACs lediglich bei millimolaren Konzentrationen inhibieren, sowie (2) Hydroxamsäuren (Trichostatin A) und (3) cyclische Tetrapeptide mit einer 2-Amino-8-oxo-9,10-epoxy-decanoylgruppe (Trapoxin), die bereits im nanomolaren Bereich zur Inhibierung von HDACs führen. Während die Inhibierung der HDACs mit TSA reversibel ist, führt Trapoxin zur irreversiblen Inaktivierung. N:, nucleophiler Angriff auf die Amidbindung bei der Desacetylierung (N: = H<sub>2</sub>O).

bitoren von HDACs führt zu einer drastischen Veränderung des Expressionsmuster einer Vielzahl von Genen (Yoshida et al., 1995). Dabei wird die Induktion zuvor nicht-exprimierter Faktoren, die Repression bereits aktiver Gene und die Modulation von Expressionsraten beobachtet (Van Lint et al., 1996). Inzwischen finden derartige Substanzen auch in der Klinik als Chemotherapeutika Anwendung, da sie entweder die terminale Differenzierung oder die Apoptose transformierter Zellen induzieren (Marks et al., 2000).

#### **1.4 Bedeutung von Histon-Desacetylasen in der transkriptionellen Regulation**

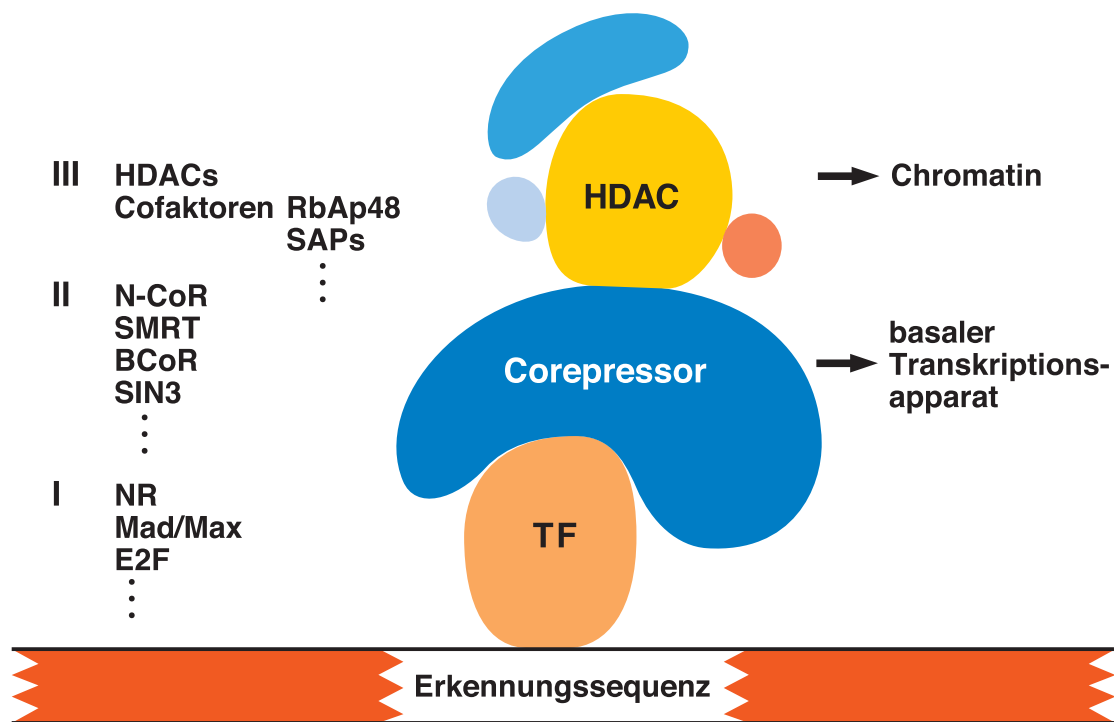
Wird die Transkription von nukleosomaler DNA mit der von nackter DNA verglichen, sind viele Transkriptionsfaktoren nicht in der Lage, die Regulation von Genen über direkte Wechselwirkungen mit dem basalen Transkriptionsapparat zu steuern. Sie benötigen deshalb die vermittelnde Aktivität von Coaktivatoren und Corepressoren (Lemon und Tjian, 2000; Wallberg et al., 2000). Als sich herausstellte, daß derartige Transkriptionsregulatoren, enzymatische HAT- oder HDAC-Aktivität aufweisen (Brownell et al., 1996; Taunton et al., 1996), konnte der kausale Zusammenhang zwischen der Acetylierung der "Core"-Histone, den daraus resultierenden Veränderungen der lokalen Chromatinstruktur und der transkriptionellen Aktivität entsprechender Gene eindeutig hergestellt werden (Kuo und Allis, 1998).

HDACs und HATs sind die enzymatischen Komponenten hochmolekularer Multiproteinkomplexe mit Coaktivator- oder Corepressoraktivität (Ahringer, 2000; Ng und Bird, 2000). Diese werden entweder über direkte Wechselwirkung mit sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren oder durch die vermittelnde Funktion von Cofaktoren zu bestimmten Stellen des Genoms gebracht (Abbildung 6). Transkriptionsfaktoren, die HDACs rekrutieren, sind zum Beispiel die Steroidhormonrezeptoren ("*nuclear hormone receptors*", NR), der Thyroidhormonrezeptor (TR), Faktoren die an sogenannte E-Boxen binden (zum Beispiel Mad/Max-Heterodimere), aber auch das Methylcytosin-bindende Protein MeCP2, das HDAC-Komplexe zu hypermethylierten CpG-Inseln im Genom bringt (Cress und Seto, 2000; Ng und Bird, 2000). Corepressoren, die als Brücken zwischen HDAC-Komplexen und Transkriptionsfaktoren fungieren, sind beispielsweise SMRT ("*silencing mediator of re-*



tinoid acid”), N-CoR (“nuclear receptor corepressor”) und SIN3 (“switch independent 3”; Xu et al., 1999; Ordentlich et al., 2001). Ebenso wurden mehrere Cofaktoren von HATs sowie HAT-rekrutierende Transkriptionsfaktoren identifiziert (Workman und Kingston, 1998). Die hochmolekularen HDAC- und HAT-Komplexe enthalten zusätzliche Faktoren, die in unabhängigen genetischen und biochemischen Studien bereits mit der transkriptionellen Regulation bestimmter Gene in Verbindung gebracht wurden (Struhl, 1998).

Mutationsstudien in *S. cerevisiae* und höheren Organismen deuten darauf hin, daß die enzymatische Aktivität der HDAC- und HAT-Komplexe tatsächlich für deren Rolle als Regulatoren der Transkription nötig ist. Punktmutationen in HDACs inter-



**Abbildung 6. Schematische Darstellung der Rolle von HDACs bei der transkriptionellen Regulation.** Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren (TF) binden an entsprechende Erkennungssequenzen in der Promoterregion von Zielgenen (Stufe I). Corepressoren vermitteln die Bindung der Transkriptionsfaktoren an HDACs (Stufe II) und können selbst integrale Komponenten der HDAC-Komplexe sein. HDAC-Komplexe modifizieren die lokale Chromatinstruktur durch Desacetylierung der “Core”-Histone. Dies führt ultimativ zur Repression der Transkription von Zielgenen (Stufe III). Corepressoren können zudem direkt einen negativen Effekt auf die Aktivität des basalen Transkriptionsapparates ausüben. Außerdem wurden auch direkte Interaktionen von Transkriptionsfaktoren mit HDACs beschrieben (Cress und Seto, 2000).

ferieren mit der Repressoraktivität dieser Faktoren, allerdings geht gleichzeitig die Integrität der hochmolekularen HDAC-Komplexe verloren (Hassig et al., 1998; Kadosh und Struhl, 1998a). Vergleichbar führt der Austausch von Aminosäuren innerhalb der katalytischen Domäne der HAT Gcn5 zum Verlust des Transaktivationspotential dieses Proteins (Kuo et al., 1998). Nach Deletion von HDAC-Genen in *S. cerevisiae* wurde eine Hyperacetylierung von H3 und H4 gemessen. Parallel hierzu wurde eine Veränderung der Expression zahlreicher Gene beobachtet (Rundlett et al., 1996). Zudem zeigen Mutationsstudien in *Drosophila*, daß HDACs für die Steuerung von Genen, die für die embryonale Entwicklung entscheiden sind, eine wichtige Rolle spielen (De Rubertis et al., 1996).

Mit der Etablierung hochspezifischer Antiseren, die in der Lage sind, den Acetylierungszustand einzelner Lysinreste in den N-terminalen Domänen der "Core"-Histone zu differenzieren (White et al., 1999), ist es inzwischen möglich, den Acetylierungszustand von Genen und im Besonderen deren Promoterregion gezielt zu analysieren (Kuo und Allis, 1999). So gelang es nachzuweisen, daß sich beispielsweise der Acetylierungszustand der "Enhanceosom"-Region des Interferon- $\beta$ -Gens bei der Umschaltung vom inaktivierten zum aktivierten Zustand ändert. Dieser Übergang von hypoacetylierten zu hyperacetylierten Histonen geht mit der Freisetzung von HDAC-Komplexen und der anschließenden Rekrutierung von HAT-Komplexen einher (Parekh und Maniatis, 1999; Agalioti et al., 2000).

Von besonderem Interesse sind Transkriptionsfaktoren, die sowohl die Rekrutierung von HAT- als auch von HDAC-Komplexen vermitteln. Der Thyroidhormonrezeptor beispielsweise bindet konstitutiv an Erkennungssequenzen auch wenn diese in Chromatin eingebunden sind. In Abwesenheit des Liganden rekrutiert dieser Rezeptor über die Bindung von Corepressoren HDACs. Diese etablieren eine repressive Umgebung. Nach der Bindung von Liganden führt eine Konformationsänderung des Rezeptors zur Freisetzung der Corepressorkomplexe. Gleichzeitig wird ein HAT-Komplex rekrutiert. Dieser ruft über die Acetylierung der Histone eine Auflockerung des Chromatins hervor. Weitere Faktoren können binden, und unter der Vermittlung von ATP-abhängigen "Remodeling"-Komplexen kommt es zur transkriptionellen Aktivierung (Collingwood et al., 1999; Peterson und Logie, 2000).

## 1.5 HDACs in Hefe und höheren Organismen

Nachdem es zunächst nach intensiver, mehr als 20-jähriger Forschungsarbeit nicht gelungen war, HDACs in biochemisch reiner Form aufzureinigen (Davie und Hendzel, 1994; Davie, 1996), entdeckten 1996 zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, daß ein bereits in genetischen Studien in *S. cerevisiae* identifiziertes Transkriptionsregulatorgen, *RPD3*, für die katalytische Untereinheit von HDAC-Komplexen codiert. Affinitätschromatographie mit Trapoxin als hochaffinem, irreversiblen Liganden führte zur Aufreinigung und Klonierung einer Histon-Desacetylase aus Extrakten humaner Zelllinien, HDAC1 (Taunton et al., 1996). Die Sequenz dieses neuen Faktors zeigte extrem hohe Homologie zu yRPD3 (Tabelle 1). Parallel wurden bei der biochemischen Fraktionierung von Hefeextrakten zwei unterschiedliche HDAC-Aktivitäten in *S. cerevisiae* beschrieben: HDA (ein Proteinkomplex von 350 kDa) und HDB (ein Proteinkomplex von 600 kDa; Carmen et al., 1996). Proteinmikrosequenzierung mit anschließender Klonierung der Komponenten zeigte, daß die katalytischen Untereinheiten dieser HDAC-Komplexe von den *HDA1*- und *RPD3*-Genen codiert werden (Rundlett et al., 1996). Die Primärstrukturen dieser beiden Faktoren zeigen eine Homologie von ca. 41%, was darauf schließen läßt, daß sie von einem gemeinsamen Urgen abstammen (Tabelle 1). Anhand von Computeranalysen des *S. cerevisiae*-Genoms wurden zudem Gene mit Homologie zu *HDA1* entdeckt: *HOS1*, *HOS2* und *HOS3* (Rundlett et al., 1996). Obwohl genetische Studien der *HOS*-Gene auf eine Funktion dieser Faktoren bei der transkriptionellen Regulation hindeuten, wurde bisher lediglich für *HOS3* bestätigt, daß das entsprechende Protein tatsächlich mit enzymatischer HDAC-Aktivität assoziiert ist (Carmen et al., 1999).

HDAC2, eine weitere humane HDAC, wurde bei der Analyse von Proteinen, die mit dem Transkriptionsfaktor YY1 interagieren, gefunden (Yang et al., 1996). Die Suche nach weiteren humanen Faktoren mit Homologie zu yRPD3 führte schließlich zur Identifizierung und Klonierung von HDAC3 (Yang et al., 1997; Dangond et al., 1998; Emiliani et al., 1998). HDAC1, HDAC2 und HDAC3 sind einander sehr ähnlich (über 70% Sequenzhomologie, Tabelle 1) und bilden die Gruppe der humanen yRPD3-ähnlichen HDACs (zusammengefaßt in der Klasse I der HDACs). Entsprechende orthologe Faktoren wurden auch in zahlreichen anderen höheren Organis-

men gefunden (Cress und Seto, 2000; Ng und Bird, 2000), wohingegen bisher keine Homologe zur zweiten HDAC in Hefe, yHDA1, beschrieben wurden.

Die HDACs der Klasse I sind relativ kompakt (400-500 aa), werden ausschließlich im Zellkern gefunden und zeigen gegenüber den Toxinen und Substanzen, die zur Hyperacetylierung der zellulären Histone führen (Abbildung 4), Sensitivität im nanomolaren Bereich (Emiliani et al., 1998). HDAC1 und HDAC2 wurden in denselben hochmolekularen HDAC-Corepressorkomplexen nachgewiesen (Zhang et al., 1999). Der sogenannte SIN3-Komplex entspricht dabei dem in *S. cerevisiae* definierten HDB-Komplex (SIN3 entspricht *RPD1* in Hefe). Die Zusammensetzung dieses Komplexes in humanen und in Hefezellen ist ähnlich (Laherty et al., 1998; Zhang et al., 1998c). Der zweite Komplex, der HDAC1 und HDAC2 enthält, NURD/Mi-2 (“*nucleosome remodeling and deacetylase complex*”), kommt nur in höheren Organismen vor. In diesem Komplex sind die HDACs mit einem ATP-abhängigen “Remodeling”-Faktor, Mi-2, assoziiert (Tong et al., 1998; Wade et al., 1998; Xue et al., 1998). Eine weitere HDAC der Klasse I, HDAC3, wurde hingegen in Komplexen der Corepressorproteine N-CoR und SMRT gefunden (Guenther et al., 2000; Underhill et al., 2000; Wen et al., 2000). Diese Komplexe vermitteln beispielsweise die durch den Thyroidhormonrezeptor oder das Oncoprotein v-ErbA vermittelte

**Tabelle 1. Homologievergleich der HDACs in Hefe und Mensch.**

		Mensch			Hefe	
		HDAC1	HDAC2	HDAC3	RPD3	HDA1
Mensch	HDAC1					
	HDAC2	90% <sup>a</sup>				
	HDAC3	74%	75%			
Hefe	RPD3	76%	73%	71%		
	HDA1	49%	46%	44%	41%	

<sup>a</sup>Die Aminosäuresequenzen der aufgeführten HDACs wurde anhand des ClustalW-Algorithmus verglichen (Eddy, 1995). Die relative Übereinstimmung der jeweiligen Sequenzen ist prozentual wiedergegeben.

Repression der Transkription (Li et al., 2000; Urnov et al., 2000). Über den 600 kDa großen HDA-Komplex in *S. cerevisiae* ist relativ wenig bekannt. Neben yHDA1 sind noch zwei weitere bisher nicht identifizierte Proteine in diesem Komplex enthalten (Rundlett et al., 1996).

## 1.6 Enzymatische Aktivität von HDACs

Nach der Identifizierung und Klonierung der ersten HDACs, wurden enorme Anstrengungen unternommen, hochmolekulare Corepressorkomplexe zu analysieren und aufzureinigen, die diese Faktoren enthalten. Ebenso intensiv wurde die Suche nach Transkriptionsfaktoren verfolgt, die über Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Lage sind, derartige Corepressorkomplexe zu bestimmten Promotoren und diskreten Regionen innerhalb des Chromatins zu rekrutieren (Ahringer, 2000; Cress und Seto, 2000; Ng und Bird, 2000; Wolffe et al., 2000). Vergleichsweise relativ wenig ist hingegen hinsichtlich der enzymatischen Aktivität der HDACs selbst bekannt.

Mutationsstudien von yRPD3 und HDAC1 deuten darauf hin, daß die enzymatische HDAC-Aktivität für die Funktion dieser Proteine als transkriptionelle Regulatoren essentiell ist (Hassig et al., 1998; Kadosh und Struhl, 1998a). Bis auf wenige Ausnahmen ist es aber bisher nicht gelungen, HDAC-Proteine mit enzymatischer Aktivität in rekombinanter Form herzustellen. Die wenigen in der Literatur beschriebenen rekombinanten HDAC-Proteinpräparationen zeigen eine relativ geringe spezifische Aktivität, besonders wenn sie mit der entsprechenden Aktivität der korrespondierenden zellulären Faktoren und im Kontext der endogenen hochmolekularen Multiproteinkomplexe verglichen werden (Hassig et al., 1998; Carmen et al., 1999; Hu et al., 2000). Die Aufspaltung der hochmolekularen HDAC-Komplexe in enzymatisch aktive und inaktive Komponenten bereitet ebenso Schwierigkeiten. Die enzymatische Aktivität von HDACs wurde bisher überwiegend in transienten Transfektionen entsprechender HDAC-Expressionskonstrukte mit anschließender Immunpräzipitation der überexprimierten Proteine untersucht (Taunton et al., 1996; Hassig et al., 1998). In Hefe besteht zusätzlich die Möglichkeit, HDAC-Gene direkt durch modifizierte Varianten zu ersetzen (Kadosh und Struhl, 1998a; Vogelauer et al., 2000; Wu et al., 2001).

Wie die biochemische Aufreinigung der HDAC1- und HDAC2-enhaltenden Komplexe ergeben hat, sind mehrere Faktoren zusätzlich zu den beiden HDACs nötig, um einen enzymatisch aktiven Minimalkomplex zu bilden (Zhang et al., 1998b; Zhang et al., 1998c; Zhang et al., 1999). Demnach könnte das Fehlen essentieller Co-faktoren, die für die enzymatische Aktivität entscheidend sind, für die Probleme, die bei der Expression, Aufreinigung und Aktivierung rekombinanter HDAC-Proteine auftreten, verantwortlich sein. Bislang ist außerdem unklar, ob unterschiedliche HDACs eine intrinsische, enzymatische Spezifität hinsichtlich einzelner acetylierter Lysinreste in den N-terminalen Domänen der "Core"-Histone aufweisen, oder ob alle Lysinreste mit gleicher Effizienz umgesetzt werden. Eine derartige Spezifität könnte auch durch unterschiedliche Komponenten der hochmolekularen HDAC-Komplexe vermittelt oder moduliert werden.

### **1.7 Strategien zur Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung von HDACs in höheren Eukaryonten**

Die klassische biochemische Aufreinigung von Enzymen und enzymatischen Komplexen mit HDAC-Aktivität gestaltet sich selbst in niederen Organismen äußerst schwierig (Lopez-Rodas et al., 1993; Davie und Hendzel, 1994; Loidl, 1994; Davie, 1996). Probleme bei der Aufreinigung bereitet dabei vor allem die geringe Sensitivität des enzymatischen HDAC-Aktivitätstests, der auf der Freisetzung [<sup>3</sup>H]-markierten Acetats von acetylierten Histonen oder Histon-Peptidfragmenten beruht (Alonso und Nelson, 1986; Emiliani et al., 1998). Diese HDAC-Aktivitätstests sind jedoch nicht nur relativ insensitiv und verlangen lange Reaktionszeiten, sondern sind auch so gut wie nicht in der Lage, die Aktivitäten entsprechender Isoenzyme zu unterscheiden (Yang et al., 1997; Emiliani et al., 1998; Zhang et al., 1998b). Obwohl angenommen wird, daß unterschiedliche HDAC-Komplexe lediglich bestimmte Lysinreste in den N-terminalen Domänen der "Core"-Histone desacetylieren (Grunstein, 1997b; Wu et al., 2001), konnten diese spezifischen Unterschiede deshalb bisher nicht ausgenutzt werden, um unterschiedliche HDACs aufzutrennen. Die Aufreinigung von HDACs über Affinitätsäulen mit immobilisierten hochaffinen HDAC-Inhibitoren umgeht das Problem der geringen Sensitivität der enzymatischen Aktivitätstests (Taunton et al.,

1996). Da alle Inhibitoren in Zellkulturexperimenten zu einer vergleichbaren globalen Hyperacetylierung der “Core”-Histone führen, ist bisher jedoch unklar, ob einzelne Inhibitoren spezifisch für eine bestimmte Gruppe von HDACs sind, (Almouzni et al., 1994; Van Lint et al., 1996; Yoshida und Horinouchi, 1999). Sind einer oder mehrere Faktoren hochmolekularer HDAC-Komplexe bekannt, stellt die biochemische Aufreinigung vor allem unter der Anwendung entsprechender spezifischer Antisera gegen diese Proteine eine äußerst effektive Untersuchungsmethode dar (Zhang et al., 1997; Zhang et al., 1998c; Guenther et al., 2000; Wen et al., 2000).

Aufgrund der offensichtlich generellen Bedeutung des dynamischen Acetylierungs-Desacetylierungsgleichgewichts für die strukturelle Integrität des Chromatins und dessen Rolle insbesondere innerhalb transkriptioneller Regulationsmechanismen, scheiden klassische genetische Klonierungsverfahren für die Identifikation neuer HDACs aus. Es ist zu erwarten, daß die genomische Mutation eines HDAC-Gens zu pleiotropen Effekten mit multiplen Phenotypen führt. So konnten bisher keine definierten Merkmale mit der Mutation einer bestimmten Gruppe von HDACs in Verbindung gebracht werden (Cress und Seto, 2000).

Ein klassisches Verfahren zur Identifizierung und Klonierung von Faktoren höherer Organismen, die ortholog zu bereits bekannten Proteinen niederer Organismen sind, stellt das Durchsuchen (“*screening*”) entsprechender cDNA-Bibliotheken dar. Dabei werden diese unter Bedingungen niedriger Stringenz mit markierten Sonden eines bereits bekannten Faktors hybridisiert. Inzwischen stehen für mehrere Organismen zudem ganze Bibliotheken genomischer sowie von mRNA-abgeleiteter DNA-Sequenzen in Form direkt abrufbarer Datenbankeinträge zur Verfügung (Benson et al., 2000; Vukmirovic und Tilghman, 2000). Sowohl das “*Human Genome Project*” als auch eine Initiative der Washington University, eine Großzahl der in cDNA-Bibliotheken enthaltenen Klone anzusequenzieren (“*database of expressed sequence tags*”, dbEST; Gerhold und Caskey, 1996; Gill und Sanseau, 2000), führten zu einer enormen Zunahme an derartigen allgemein zugänglichen Informationen. Diese Ansammlung an Sequenzen kann unter Zuhilfenahme entsprechender Computeralgorithmen nach Einträgen untersucht werden, die zu einem gegebenen Faktor entsprechende Homologien zeigen (Brenner, 1995). Wenn die Genome mehrerer Organismen vollständig sequenziert sein werden (in der sogenannten “*post genome aera*”), wird diese Methode weitgehend das direkte Durchsuchen

von cDNA-Bibliotheken ablösen und die Klonierung neuer Faktoren immens beschleunigen (Nature, Genomausgabe, Vol 409, 15.2.2001; Science, Genomausgabe, Vol, 291, 16.2.2001; Jang et al., 1999; Vukmirovic und Tilghman, 2000).

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, daß Chromatin in eukaryontischen Zellen kein rein statisches Verpackungsmaterial für die in Form von DNA gespeicherte genetische Information darstellt. Die Expression zahlreicher Gene hängt vielmehr von dynamischen Veränderungen des Chromatins ab. In den letzten Jahren wurde vor allem die Acetylierung und Desacetylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinen in der N-terminalen Domäne der "Core"-Histone als ein wichtiger Regulationsmechanismus der Chromatinstruktur und der Transkription von in diese eingebetteten Genen erkannt (Grunstein, 1997a; Struhl, 1998). Mit der Charakterisierung der Enzyme, die diese posttranslational Modifizierung regulieren, hat ein neues Kapitel in der Chromatinforschung und der Untersuchung der Transkriptionsregulation in Eukaryonten begonnen (Kuo und Allis, 1998).

Durch bahnbrechende Arbeiten in niederen Organismen wie Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) und dem Ciliaten *Tetrahymena* konnten nicht nur die ersten HATs und HDACs kloniert werden, sondern auch essentielle Zusammenhänge bei der Acetylierung und Desacetylierung von Histonen beleuchtet werden (Brownell et al., 1996; Rundlett et al., 1996; Taunton et al., 1996). Die bisher klonierten HDACs lassen sich aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu HDACs in *S. cerevisiae* in zwei Gruppen einteilen: yRPD3 und entsprechende Faktoren in höheren Organismen sowie yHDA1 und yHOS-Gene (Rundlett et al., 1996). Bisher sind keine orthologen Proteine zu yHDA1 in höheren Organismen und in menschlichen Zellen bekannt.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, Faktoren mit Homologie zu yHDA1 in höheren Organismen zu identifizieren und zu analysieren. Dabei sollte vom enormen Potential der Informationen, die den zahlreichen cDNA- und Genomsequenzierungsprojekten entstammen, Gebrauch gemacht werden. Mit dem rapiden Fortschreiten sowohl des "Human Genome Projects" (Jang et al., 1999; Benson et al., 2000; Vukmirovic und Tilghman, 2000) als auch der "EST"-Initiative der Washington



University, eine Großzahl der in cDNA-Bibliotheken enthaltenene Klone anzu-sequenzieren (“*database of expressed sequence tags*”, dbEST; Gerhold und Caskey, 1996; Gill und Sanseau, 2000), stehen eine Fülle von Sequenzen und Sequenzbruchstücken zum Großteil undefinierter humaner Gene zur Verfügung. Zunächst sollte eine Strategie ausgearbeitet werden, die es ermöglichen sollte, entsprechende Kandidatengene mit Homologie zu yHDA1 zu identifizieren. Nach der Klonierung dieser Faktoren sollte experimentell getestet werden, ob diese tatsächlich enzymatische HDAC-Aktivität aufweisen. Hierzu sollte ein enzymatischer Test für HDAC-Aktivität auf der Basis der Desacetylierung eines chemisch acetylierten Histon-Peptidfragments entsprechend bereits veröffentlichter Arbeiten etabliert werden (Taunton et al., 1996). Die enzymatische Aktivität der neuen HDACs sollte im zweiten Teil der Arbeit im Detail untersucht werden. Hierzu sollte unter anderem das Verhalten rekombinanter Proteine studiert werden. Außerdem sollte ermittelt werden, ob die klonierten Faktoren in höhermolekularen Multiproteinkomplexen mit enzymatischer Aktivität vorkommen. Schließlich sollte die Analyse des Expressionsmusters der neuen Faktoren sowie zellbiologische Untersuchungen erste Aufschlüsse über die physiologischen Funktionen der humanen yHDA1-ähnlichen Proteine erbringen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

FPLC-Chromatographiesystem	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
LPLC-Chromatographiesystem (GradiFRAC)	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
ÄKTA Purifier HPLC-Chromato- graphiesystem	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
Perkin Elmer Cetus 9600 PCR-Gerät	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Mini-PROTEAN II Dual Slab Cell- Minielektrophoreseeinheit	BIO-RAD, Hercules, USA
Mini Trans-Blot Cell System Mini Western Blotting-Einheit	BIO-RAD, Hercules, USA
PROTEAN II xi-Elektrophoreseeinheit	BIO-RAD, Hercules, USA
PROTEAN II Transfer Western Blotting-Einheit	BIO-RAD, Hercules, USA
Geltrockner	BIO-RAD, Hercules, USA
Heißluft-Trockenofen	BIO-RAD, Hercules, USA
Mini Horizontal-Elektrophoreseeinheiten	Gibco BRL, Rockville, USA
digitale Kameraeinheit zur Doku- mentation von Gelen (Eagle Eye II)	Stratagene, La Jolla, USA
Zellkultur-Sterilwerkbank	Nuaire, Plymoth, USA
Zellkultur-Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Szintillationszähler	Beckman, Palo Alto, USA
Spektralphotometer (Beckman DU-20)	Beckman, Palo Alto, USA
Dounce Homogenisator	Fisher Scientific, San Francisco, USA
Schüttler (Red Rocker PR50)	Hofer, San Francisco, USA
Tischzentrifuge (Eppendorf 5415C)	Brinkmann, Westbury, USA
Tischzentrifuge (Sorvall RT 6000 D)	Sorvall Instr., Wilmington, USA

Mikroskope	Nikon, Tokio, Japan
	Olympus, Tokio, Japan
Ultrazentrifuge (Beckman L-80)	Beckman, Palo Alto, USA
Standzentrifuge (Beckman J2-MC)	Beckman, Palo Alto, USA
Wasserbäder	Fisher Scientific, San Francisco, USA
Heizblock	Fisher Scientific, San Francisco, USA
Vortexer	Fisher Scientific, San Francisco, USA
Fluoreszenzmikroskop Zeiss LSM 510	Zeiss, Jena, Deutschland
Netzgerät (Power Pac 3000)	BIO-RAD, Hercules, USA
pH-Meter	Fisher Scientific, San Francisco, USA
Filmentwicklungsmaschine (X-OMAT)	Eastman KODAK Co., Rochester, USA
Sonikator Benson Sonifier	Fisher Scientific, San Francisco, USA
Hybridisierungsöfen	Hofer, San Francisco, USA
Gefriertrockner	Virtis, New York, USA
Vakuum-Trockenzentrifuge	Savant, Farmingdale, USA

### 2.1.2 Allgemeine Materialien

Nitrocellulose	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
Filterpapier Whatman 3 mm	Whatman, Maidstone, USA
Sterilfilter, 22 µm und 45 µm	Waters-Millipore, Milford, USA
Gelfiltrationssäule	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
Superose 6 10/30 HR	Waters-Millipore, Milford, USA
C8-Sephak RP Kartuschen	Eastman KODAK Co., Rochester, USA
Röntgenfilm KODAK X-OMAT/AR-5 oder Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
Ultrafiltrationseinheiten	Amicon, Beverly, USA
Centricon-10, -30, -50	
Umkehrphasensäule C-18 (Vydac 218TP54, 0,46 x 25 cm)	Vydac, Hesperia, USA

Centri-Sep	Princeton Separations Inc., Adelphia, USA
M2-Agarose	Sigma, St Louis, USA
Protein-G-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
Plastikeinwegssäulen (Ø 0,5 cm)	BIO-RAD, Hercules, USA

### 2.1.3 Chemikalien

Alle eingesetzten Chemikalien waren, soweit erhältlich, analysenrein. Nicht erwähnte Chemikalien des allgemeinen Gebrauchs wurden von Sigma (St. Louis, USA) und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Acetonitril p.a.	VWR Scientific Products, Chester, USA
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Gibco BRL, Rockville, USA
Amplify®	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
BOP	Sigma, St Louis, USA
Bradford Reagenz	BIO-RAD, Hercules, USA
Bromphenolblau	Sigma, St Louis, USA
Coomassie-Brillant-Blau G-250	Sigma, St Louis, USA
Dithiothreitol	Gibco BRL, Rockville, USA
ECL®	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
Ethylacetat	Sigma, St Louis, USA
Econofluor®	Packard, Meriden, USA
Glycerin	Gibco BRL, Rockville, USA
Methanol p.a.	VWR Scientific Products, Chester, USA
GELCODE®	Pierce, Rockford, USA
Molekulargewichtsstandards für die Gelfiltration	Roche MB, Indianapolis, USA oder Sigma, St Louis, USA

Molekulargewichtsstandards für die SDS-PAGE	Gibco BRL, Rockville, USA
Natriumdeoxycholat	Sigma, St Louis, USA
Natriumdodekylsulfat (SDS)	VWR Scientific Products, Chester, USA
PMSF	Gibco BRL, Rockville, USA
Paraphenyldiamin	Sigma, St Louis, USA
Proteaseinhibitor Complete™	Roche MB, Indianapolis, USA
Silbernitrat	Sigma, St Louis, USA
TEMED	Sigma, St Louis, USA
TFA	VWR Scientific Products, Chester, USA
Tris-Base	VWR Scientific Products, Chester, USA
Triton® X-100	VWR Scientific Products, Chester, USA
Trockenmilchpulver	BIO-RAD, Hercules, USA
Tween® 20	Sigma, St Louis, USA
Xylencyanol	Sigma, St Louis, USA

#### 2.1.4 Radiochemikalien

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
EXPRE <sup>35</sup> S <sup>35</sup> S [ <sup>35</sup> S]-Methionin und [ <sup>35</sup> S]-Cystein zur Zellmarkierung	NEN Life Science Products Inc., Boston, USA
[ <sup>3</sup> H]-Natriumacetat (Ethanol)	ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, USA
[ <sup>35</sup> S]-Methionin	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA

#### 2.1.5 Molekularbiologische Reagenzien

Agarose	Gibco BRL, Rockville, USA
Sequenzierreagenz BigDYE®	ABI, Columbia, USA

CIP-Phosphatase (“ <i>calf intestine phosphatase</i> “)	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Desoxynukleotide	Gibco BRL, Rockville, USA
DNase I	Roche MB, Indianapolis, USA
Ethidiumbromid	BIO-RAD, Hercules, USA
GENECLEAN SPIN®-Glasmilch	BIO 101 Inc., Vista, USA
HeLa-Zellen-cDNA-Bibliothek (QuickClone™)	CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, USA
IPTG	Gibco BRL, Rockville, USA
Computerprogramm MacVector 6.0	Eastman KODAK Co., Rochester, USA
MTN Northern Blot (human)	CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, USA
Multiprime Labeling-System	CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, USA
Nährlösung nach Luria Bertani (LB)	DIFCO, Bedford, USA
Oligonukleotide	GENSET Corp., La Jolla, USA
pcDNA3.1(+)-Plasmid	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Pfu-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
pGEX-4T1-, -4T2-, -4T3-Plasmide	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Gibco BRL, Rockville, USA
QIAGEN Maxi- und Megapreps	QIAGEN, Valencia, USA
QuickChange®	Stratagene, La Jolla, USA
Restriktionsenzyme mit konz.	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Verdaupuffern	Promega, Madison, USA
RNase-Inhibitor, RNasin®	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
T4-Ligase	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
T7-Polymerase	Promega, Madison, USA
TNT®-Retikulozytenlysat	Ambion, Austin, USA
ULTRAhyb®	Promega, Madison, USA
Wizard®-Minipreps	

### 2.1.6 Zellkulturmedien, -reagenzien und -materialien

DMEM	Gibco BRL, Rockville, USA
DMEM ohne Methionin und Cystein	Gibco BRL, Rockville, USA
DMSO	Sigma, St. Louis, USA
FKS	HyClone Laboratories Inc., Logan, USA
G418-Sulfat	Gibco BRL, Rockville, USA
Glutamin	Gibco BRL, Rockville, USA
Klonierungszylinder	Fisher Scientific, San Francisco, USA
LipofectAMINE™	Gibco BRL, Rockville, USA
OptiMEM®	Gibco BRL, Rockville, USA
PBS 10 X	Gibco BRL, Rockville, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Rockville, USA
RPMI1640	Gibco BRL, Rockville, USA
Trypanblau	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Rockville, USA
Zellkulturplatten	Becton Dickinson Labware, Bedford, USA oder Nalge Nunc International, Rochester, USA

### 2.1.7 Bakterienstämme

Die Bakterienklone *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ , HB101 und STBL2 wurden von Gibco BRL (Rockville, USA) und Klon BL21 (RIP) von Stratagene (La Jolla, USA) bezogen. Glycerinkulturen wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.1.8 Zelllinien

Die eingesetzten Zelllinien wurden sämtlich von der American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, USA) bezogen und sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2. Verwendete Zelllinien und deren Kulturbedingungen.**

<b>Zell- linie</b>	<b>Typ</b>	<b>Erschei- nungsbild</b>	<b>Ursprungs- gewebe</b>	<b>Trans- formation</b>	<b>Kultur- medium</b>
293	human	epithelial	Niere	transformiert (Adenovirus 5)	OptiMEM® 2% FKS
HeLa	human	epithelial	Cervix	Adeno- carcinom	OptiMEM® 2% FKS
HeLa S3	human	epithelial	Cervix	Adeno- carcinom	OptiMEM® 2% FKS
SK-N- SH	human	epithelial	Knochenmark	Neuroblastom	DMEM 2% FKS
Jurkat	human	lympho- blastisch	T-Lymphozyt	akute T-Zell- Leukämie	RPMI1640 10% FKS
SupTI	human	lympho- blastisch	T-Lymphoblast	Leukämie	RPMI1640 10% FKS
U937	human	Monozyten- ähnlich	Makrophage	Lymphom	RPMI1640 10% FKS
Raji	human	lympho- blastisch	B-Lymphozyt	Burkitt's Lymphom	DMEM 10% FKS
HISM	human	Myozyten- ähnlich	Jejunum		RPMI1640 10% FKS
Cos-7	Hamster	fibro- blastisch	Niere	transformiert (SV 40)	DMEM 10% FKS
10T1/2	Maus	fibro- blastisch	embrionales Gewebe		DMEM 10% FKS
NIH/ 3T3	Maus	fibro- blastisch	embrionales Gewebe		DMEM 10% FKS

## 2.1.9 Antiseren

### 2.1.9.1 Primäre Antiseren für Western Blotting und Immunpräzipitation

Die für Western Blots oder zu Immunpräzipitationen eingesetzten Antiseren sind in Tabelle 3 aufgelistet.



**Tabelle 3. Antiseren für Western Blotting und Immunpräzipitationen.**

<b>Anti-serum</b>	<b>Typ</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Western Blotting</b>	<b>Immunpräzipitation</b>
HDAC1	polyclonal (Kaninchen)	(Emiliani et al., 1998)	400 ng/ml	5 µg/ml
HDAC1	polyclonal (Ziege)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	800 ng/ml	—
HDAC2	polyclonal (Kaninchen)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	500 ng/ml	—
HDAC2	polyclonal (Ziege)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	800 ng/ml	—
HDAC3	polyclonal (Kaninchen)	(Emiliani et al., 1998)	650 ng/ml	10 µg/ml
HDAC3	polyclonal (Ziege)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	800 ng/ml	—
HDAC4	polyclonal (Kaninchen)	siehe Abschnitt 3.4.1	80 ng/ml	1 µg/ml
HDAC7	polyclonal (Kaninchen)	siehe Abschnitt 3.4.1	150 ng/ml	1 µg/ml
IKKα	polyclonal (Kaninchen)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	200 ng/ml	—
SIN3	polyclonal (Kaninchen)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	100 ng/ml	5 µg/ml
N-CoR	polyclonal (Kaninchen)	Upstate, Waltham, USA	1000 ng/ml	10 µg/ml
N-CoR	polyclonal (Kaninchen)	ABR, Golden, USA	500 ng/ml	10 µg/ml
SMRT	polyclonal (Kaninchen)	Upstate, Waltham, USA	1000 ng/ml	10 µg/ml
SMRT	polyclonal (Kaninchen)	ABR, Golden, USA	2000 ng/ml	5 µg/ml
FLAG	polyclonal (Kaninchen)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	200 ng/ml	—
FLAG	monoklonal (Maus), Klon M2	Sigma, St Louis, USA	5000 ng/ml	15 µg/ml
HA	polyclonal (Kaninchen)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	200 ng/ml	—
HA	monoklonal (Maus), Klon 3F10	Roche MB, Indianapolis, USA	—	1 µg/ml

### 2.1.9.2 Sekundäre Antikörper für Western Blotting

Die für Western Blots eingesetzten sekundären Antiseren sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4. Sekundäre Antikörper für Western Blotting.**

<b>Antiserum</b>	<b>Konjugation</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>
<i>anti</i> -Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Pierce, Rockford, USA	1:15000
<i>anti</i> -Maus	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA	1:5000
<i>anti</i> -Ziege	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	1:5000

### 2.1.9.3 Sekundäre Antikörper zur Immunfluoreszenz

Die zu Immunfluoreszenzuntersuchungen eingesetzten sekundären Antiseren sind in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 5. Sekundäre Antikörper zur Immunfluoreszenz.**

<b>Antiserum</b>	<b>Konjugation</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>
<i>anti</i> -Kaninchen	Alexa 488	Pierce, Rockford, USA	1:5000
<i>anti</i> -Maus	Cy3	Pierce, Rockford, USA	1:5000

### 2.1.10 Agarosegelelektrophorese

#### TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)

Tris-HCl, pH 8,3	100 mM
Natriumborat	83 mM

EDTA 2,5 mM

#### Agarosegele

Je nach Bedarf, 0,8-1.5% (w/v) Agarose in TBE-Puffer; im Mikrowellenherd zum Kochen erhitzt, Gele nach Abkühlen auf ca. 60°C gegossen.

#### Probenpuffer 6x

Bromphenolblau 0,25%

Xylolcyanol FF 0,25%

Glycerin 30%

#### Ethidiumbromid-Stammlösung

1% (w/v) in aqua bidest., lichtgeschützt gelagert bei RT

### **2.1.11 Northern Blotting**

#### 20 X SSC-Puffer

Natriumcitrat-NaOH, pH 7,0 0,3 M

NaCl 3 M

### **2.1.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

#### Sammelgelpuffer (4 X)

Tris-HCl, pH 6,8 0,5 M

SDS 0,4% (w/v)

#### Trennungsgelpuffer (4 X)

Tris-HCl, pH 8,8 1,5 M

SDS 0,4% (w/v)

#### Laufpuffer (5 X)

Tris-Base 125 mM

Glycin 1 M

SDS 0,5% (w/v)

#### Probenpuffer (6 X)

Tris-HCl, pH 6,8 0,5 M

Dithiothreitol (DTT)	0,6 M
Glycerin	30% (v/v)
SDS	10% (w/v)
Bromphenol Blau	0,02% (w/v)

### 2.1.12.1 Färbung der Gele

#### 2.1.12.1.1 Coomassie-Färbung

##### Fixierlösung

Methanol	50% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

##### Färbelösung

Methanol	50% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)
Coomassie Blau R-250	2% (w/v)

##### Entfärbelösung

Methanol	7,5% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

#### 2.1.12.1.2 Silberfärbung

##### Fixierlösung

Methanol	50% (v/v)
Eisessig	5% (v/v)

##### Sensibilisierungslösung

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	1,27 mM
-----------------------------------	---------

##### Silbernitratlösung

$\text{AgNO}_3$	0,15% (w/v)
-----------------	-------------

##### Entwickler

Formaledhyd	0,04% (v/v)
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	2% (w/v)

### 2.1.13 Western Blotting

#### Transferpuffer

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20% (v/v)

#### Waschpuffer

Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
NaCl	150 mM
Tween® 20	0,1% (v/v)

#### Blockierungspuffer

5% (w/v) Trockenmilchpulver in Waschpuffer

### 2.1.14 Transfektion

#### Calciumlösung

CaCl <sub>2</sub>	2 M
-------------------	-----

sterilfiltriert, bei 4°C gelagert

#### 2 X HBS-Puffer

HEPES-NaOH, pH 7,2	40 mM
NaCl	300 mM

sterilfiltriert, in Aliquots bei -20°C gelagert

### 2.1.15 Radiomarkierung von Zellen

#### Kurzzeitmarkierung

DMEM-Medium ohne Methionin und Cystein, Penicilin (50 U/ml), Streptomycin (50 µg/ml), Glutamin (2 mM), EXPRE<sup>35</sup>S<sup>35</sup>S (0,2 mCi/ml)

#### Langzeitmarkierung

80% DMEM-Medium ohne Methionin und Cystein, 10% DMEM, 10% FKS, Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 µg/ml), Glutamin (2 mM), EXPRE<sup>35</sup>S<sup>35</sup>S

(0,15 mCi/ml)

### 2.1.16 Gesamtzellextrakte

#### IPLS-Puffer

Tris-HCl, pH 7,4	50 mM
NaCl	120 mM
EDTA	0,2 mM
Nonidet® P40	0,5% (v/v)
Proteaseninhibitor Complete™	

### 2.1.17 Kern- und Zytoplasmaextrakte

#### Puffer A

HEPES-NaOH, pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Dithiothreitol (DTT)	0,5 mM
Proteaseninhibitor Complete™	

#### Puffer B

HEPES-NaOH, pH 7,9	20 mM
NaCl	450 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Dithiothreitol (DTT)	0,5 mM
EDTA	0,2 mM
Glycerin	20% (v/v)
Nonidet® P40	0,5% (v/v)
Proteaseninhibitor Complete™	

#### Puffer C

HEPES-NaOH, pH 7,9	20 mM
--------------------	-------

MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Dithiothreitol (DTT)	0,5 mM
EDTA	0,2 mM
Nonidet® P40	0,5% (v/v)

#### Puffer D

HEPES-NaOH, pH 7,9	30 mM
NaCl	360 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Dithiothreitol (DTT)	0,5 mM
EDTA	0,4 mM
Glycerin	30% (v/v)
Nonidet® P40	1% (v/v)

#### Puffer E

HEPES-NaOH, pH 7,9	20 mM
KCl	100 mM
Dithiothreitol (DTT)	0,5 mM
PMSF	0,5 mM
EDTA	0,2 mM

### **2.1.18 Aufreinigung von IgG**

#### Waschpuffer I

Tris-HCl, pH 7,5	100 mM
------------------	--------

#### Washpuffer II

Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
------------------	-------

#### Waschpuffer III

Tris-HCl, pH 8,8	10 mM
------------------	-------

#### Elutionspuffer

Glycin-HCl, pH 2,8	100 mM
--------------------	--------

#### Neutralisationspuffer

Tris-HCl, pH 8,8	1 M
------------------	-----

### Dialysepuffer

PBS, 0,02% NaN<sub>3</sub>

## **2.1.19 Immunpräzipitation**

### IPLS-Puffer

im Gegensatz zum Zelllysepuffer (siehe Abschnitt 2.1.16) ohne Proteaseinhibitoren

### IPHS-Puffer

im Gegensatz zum IPLS-Puffer 1M NaCl

## **2.1.20 GST-Fusionsproteine**

### IPTG-Stammlösung

Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid      100 mM

sterilfiltriert, in Aliquots lichtgeschützt bei -20°C gelagert

### GST-Lysepuffer

PBS, 1% (v/v) Triton® X-100

### GST-Lagerungspuffer

PBS, 10 % (v/v) Glycerin

### GST-Elutionspuffer

Tris-HCl, pH 8,0      50 mM

GSH      25 mM

vor Verwendung frisch angesetzt

### GST-Dialysepuffer

Tris-HCl, pH 8,0      20 mM

KCl      100 mM

PMSF      1 mM

EDTA      0,5 mM

Ditheothreitol (DTT)      0,5 mM

Glycerin      20% (v/v)



### GST-Puffer

Tris-HCl, pH 8.0	20 mM
KCl	150 mM
Dithiothreitol (DTT)	5 mM
EDTA	2 mM
Glycerin	10% (v/v)
Trockenmilchpulver	0,5% (w/v)
Nonidet® P40	0,1% (v/v)

### **2.1.21 Herstellung eines <sup>3</sup>H-markierten, peracetylierten H4-Peptidfragments**

#### Aktivierungslösung

0,24M Benzotriazolyl-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP), 0,2M Triethylamin gelöst in Acetonitril (vor Verwendung frisch hergestellt)

#### Peptid entsprechend des N-Terminus des humanen Histons H4

H<sub>2</sub>N-SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL RD-COOH, zu 2 mg/ml in aqua bidest. gelöst, bei -20°C gelagert

#### Auftragpuffer

Methanol	10% (v/v)
TFA	0,1% (v/v)

#### Umkehrphasenchromatographie RP C-18

Laufpuffer A aqua bidest., 0,1% TFA

Laufpuffer B Acetonitril, 0,1% TFA

filtriert (0,22 µm) und entgast

### **2.1.22 Enzymatischer Aktivitätstest**

#### Stoppmix

HCl	1 M
Essigsäure	0,16 M

### 2.1.23 Gelfiltration

#### Laufpuffer

Tris-HCl, pH 7,4	50 mM
NaCl	300 mM
EDTA	0,5 mM
Nonidet® P40	0,1% (v/v)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Klonierungen

#### 2.2.1.1 Allgemeine Klonierungstechniken

Sämtliche Klonierungen und molekularbiologischen Arbeiten erfolgten entsprechend gängiger Protokolle (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1995). Restriktionsverdau, Ligationen sowie die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers der jeweiligen Enzyme. Alle Oligonukleotide wurden von Genset (La Jola, USA) bezogen und direkt ohne weitere Aufreinigung in PCR-Reaktionen eingesetzt. Um die Wahrscheinlichkeit zu verringern, artifiziell Mutationen einzuführen, wurden alle PCR-Amplifizierungen mit Pfu-Polymerase durchgeführt. Die Aufreinigung von Restriktions- oder PCR-Fragmenten erfolgte unter Verwendung von GENE CLEAN SPIN®-Glasmilch. Für Minipreps wurde das auf der klassischen alkalischen Lyse der Bakterien beruhende Wizard®-Miniprepsystem verwendet, wobei nach den Angaben des Herstellers vorgegangen wurde. Größere Mengen an Plasmid-DNA (Maxipreps, Megaprep) wurden anhand der QIAGEN-Plasmidaufreinigungssysteme gewonnen. Für Transfektionen und für die Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA zusätzlich 2 x mit Phenol/Chloroform und 1 x mit Chloroform extrahiert. Sequenzierreaktionen wurden nach dem BigDYE®-Protokoll durchgeführt, wobei die Reaktionsprodukte über Gelfiltration (Centri-Sep) aufgereinigt wurden. Computeranalysen von Sequenzen wurden unter Zuhilfenahme des Mac Vector 6.0 Programmpackets durchgeführt.

### **2.2.1.2 Klonierung von Expressionskonstrukten mit C-terminalen FLAG- oder HA-Epitopen**

Plasmidkonstrukte für die exogene Expression von Fusionsproteinen in eukaryontischen Zellen wurde auf der Basis des pcDNA3.1(+)-Vektors hergestellt. In diesem System wird die Transkription der rekombinanten cDNA durch ein “Enhancer”-/Promoterelement des humanen Cytomagalovirus (CMV), das in vielen Zelllinien hochaktiv ist, gesteuert (Boshart et al., 1985; Nelson et al., 1987). Eine Neomycin-Kassette ermöglicht eine Selektion in eukaryontischen Zellen zur Etablierung konstitutiv exprimierender Zelllinien (siehe Abschnitt 2.2.6.3). Über ein T7-Promoterelement kann direkt transkribiert werden (siehe Abschnitt 2.2.8). Zur Erzeugung von Fusionsproteinen mit C-terminalem FLAG- oder HA-Epitop (Jarvik und Telmer, 1998; Fritze und Anderson, 2000) wurden über PCR und anschließende Ligation DNA-Sequenzen in den parentalen pcDNA3.1(+)-Vektor eingeführt, die eine Klonierung der Hybridproteine durch einfache PCR-Amplifikation mit entsprechenden Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme in den PCR-Oligonukleotiden ermöglichte.

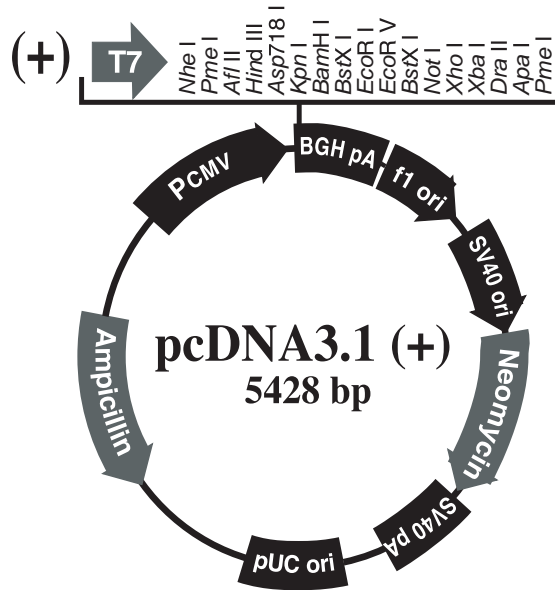
#### *EcoRI*-Konstrukte (HDAC1, HDAC3, HDAC4, HDAC7)

Ein HDAC3-Fragment entsprechend des vollen Leserahmens dieses Faktors wurde entweder mit einem “Antisense”-Oligonukleotid, das eine dem FLAG-Epitop (DYKDDDDK) entsprechende Sequenz enthielt, oder einem “Antisense”-Oligonukleotid, das eine dem HA-Epitop (YPYDVPDYA) entsprechende Sequenz enthielt, amplifiziert (siehe Tabelle 8). Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden sequentiell mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Bam*HI verdaut und in den entsprechend verdauten pcDNA3.1(+)-Vektor über Ligation eingeführt. *Eco*RI-Schnittstellen 5'-terminal des ATG-Startcodons sowie 3'-terminal der FLAG-Sequenz ermöglichten den Austausch der für HDAC3 codierenden cDNA gegen andere DNA-Fragmente mit *Eco*RI-Schnittstellen. Auf diese Weise konnten verschiedenste cDNAs mit den Epitopsequenzen fusioniert werden (Abbildung 7).

#### *Not*I-Konstrukte (HDAC5, HDAC6)

Die Herstellung von Klonierungsvektoren, die ein Fusionieren unterschiedlicher

**A**



**B**

5'- GGA TCC GAA TTC GGA GGA GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG TAA TCT AGA -3'

*Bam*H I      *Eco*R I      G G      D Y K D D D D K      *STOPP* *Xba* I  
 Übergang      FLAG-Epitop

5'- GGA TCC GAA TTC GGA GGA TAC CCA TAC GAC GTC CCA GAC TAC GCT TAA TCT AGA -3'

*Bam*H I      *Eco*R I      G G      Y P Y D V P D Y A      *STOPP* *Xba* I  
 Übergang      HA-Epitop

5'- AA GCT TGC GGC CGC GGA GGA GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG TAA TCT AGA -3'

*Hind* III      *Not* I      G G      D Y K D D D D K      *STOPP* *Xba* I  
 Übergang      FLAG-Epitop

5'- AA GCT TGC GGC CGC GGA GGA TAC CCA TAC GAC GTC CCA GAC TAC GCT TAA TCT AGA -3'

*Hind* III      *Not* I      G G      Y P Y D V P D Y A      *STOPP* *Xba* I  
 Übergang      HA-Epitop

**Abbildung 7. Expressionsvektoren zur Erzeugung von Fusionsproteinen mit C-terminalen FLAG- oder HA-Epitopen.** (A) Schematischer Aufbau des pcDNA3.1(+)-Plasmids. pCMV, "Enhancer"/-Promoterelement des Cytomegalovirus; pA, Polyadenylierungssignale (abgeleitet von BGH oder SV40); *ori*, Replikationssequenzen (abgeleitet von ColE1 (vom puC-Plasmid, erlaubt Replikation in Bakterien), f1 (Bakteriophage, erlaubt Gewinnung einsträngiger DNA) oder SV40 (Virus, erlaubt Replikation in eukaryontischen Zellen)). (B) Sequenzen der *Eco*RI- und *Not*I-Klonierungsstellen der hergestellten FLAG- und HA-Epitop Expressionsvektoren. Die angeführten Segmente wurden in das parentale pcDNA3.1(+)-Plasmid über die gemeinsamen 5'- und 3'-terminalen Restriktionssegmente eingeführt.

cDNAs mit FLAG- oder HA-Epitopen über *NotI*-Schnittstellen ermöglichten, erfolgte entsprechend des im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Verfahrens. Ein HDAC6-Fragment entsprechend des vollen Leserahmens dieses Faktors wurde entweder mit einem "Antisense"-Oligonukleotid, das eine dem FLAG-Epitop entsprechende Sequenz enthielt, oder einem "Antisense"-Oligonukleotid, das eine dem HA-Epitop entsprechende Sequenz enthielt, amplifiziert (siehe Tabelle 12). Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden sequentiell mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *HindIII* verdaut und in den entsprechend verdauten pcDNA3.1(+)-Vektor über Ligation eingeführt. *NotI*-Schnittstellen 5'-terminal des ATG-Startcodons und 3'-terminal der Epitopsequenzen ermöglichten die Fusion verschiedener cDNAs mit dem FLAG- oder HA-Epitop (Abbildung 7).

### **2.2.1.3 Klonierung von Expressionskonstrukten mit N-terminaler GST**

Zur Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine wurde das auf pGEX-4T-Vektoren basierende GST-Fusionsproteinsystem der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, USA) verwendet. Durch Klonierung der zu exprimierenden cDNA 3'-terminal zu einer Sequenz, die für Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* codiert, entsteht unter Berücksichtigung des entsprechenden Leserahmens ein Hybridprotein. Die Expression derartiger Fusionsproteine kann in Bakterien durch Induktion des *tac*-Promoters mit IPTG kontrolliert werden (Smith und Johnson, 1988). Alle cDNAs mit *EcoRI*-Restriktionssequenzen (HDAC4-, HDAC7- sowie N-CoR-Konstrukte) wurden in die korrespondierende Schnittstelle der multiplen Klonierungssequenz des pGEX-4T-1-Vektors kloniert. Entsprechend wurden die mit *NotI*-Restriktionssequenzen versehenen cDNAs (HDAC5- und HDAC6-Konstrukte) in den pGEX-4T-2-Vektor kloniert.

### **2.2.1.4 Verschiedene Konstrukte**

Expressionsplasmide, die für HDAC1 und HDAC3 codieren, wurden von Dr. Stephane Emiliani erhalten (Gladstone Institute of Virology and Immunology, Uni-

**Tabelle 6. Zur Klonierung von HDAC1-Konstrukten verwendete Oligonukleotide.**

<b>HDAC1-Konstrukt</b>	<b>Oligonukleotid “Sense”</b>	<b>Oligonukleotid “Antisense”</b>
aa 1-482	5' <u>CGGAATTC</u> ACCATGGCGC AGACGCAGGGCAC3' <sup>a</sup>	5' <u>CGGAATTC</u> GGCCAACCTTG ACCTCCTCCTTG3'

<sup>a</sup> *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

**Tabelle 7. Zur Klonierung von HDAC2-Konstrukten verwendete Oligonukleotide.**

<b>HDAC2-Konstrukt</b>	<b>Oligonukleotid “Sense”</b>	<b>Oligonukleotid “Antisense”</b>
aa 1-488	5' <u>CGGAATTC</u> ACCATGGCGT ACAGTCAAGGAGGC3' <sup>a</sup>	5' <u>CGGAATTC</u> GGGGTTGCTG AGCTGTTC3'

<sup>a</sup> *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

**Tabelle 8. Zur Klonierung von HDAC3-Konstrukten verwendete Oligonukleotide.**

<b>HDAC3-Konstrukt</b>	<b>Oligonukleotid “Sense”</b>	<b>Oligonukleotid “Antisense”</b>
aa 1-428	5' <u>CCGGATCCGAATTC</u> ACCA TGGCCAAGACCGTGGCC3' <sup>a</sup>	5' <u>GCTCTAGATT</u> ACTTGTCAT CGTCGTCCTTGTAGTCTCCT <u>CCGAATTC</u> CAATCTCCACATC GCTTTCC3' (enthält <i>FLAG</i> -Sequenz) 5' <u>CGTCTAGATTA</u> AGCGTAG TCTGGGACGTCGTATGGGT ATCCTCC <u>GAATTC</u> CAATCTCC ACATCGCTTTCC 3' (enthält <i>HA</i> -Sequenz)

<sup>a</sup> *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. *Bam*HI- und *Xba*I-Restriktionsschnittstellen sind durch Kursiv- und die Stoppcodons durch Fettdruck hervorgehoben.

versity of California, San Francisco, USA; Emiliani et al., 1998). Das HDAC2-Expressionsplasmid stammte von Dr. Ed Seto (Moffit Cancer Center, Miami, USA; Yang et al., 1996), das IKK $\beta$ -HA Konstrukt von Dr. Alison O'Mahony (Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California, San Francisco, USA; O'Mahony et al., 2000) und das Tat-FALG-Konstrukt von Dr. Melanie Ott (Picower Institute of Medical Research, Manhasset, USA; persönliche Mitteilung).

Die in den Tabellen 6-8 aufgeführten Oligonukleotide wurden zur Herstellung der verwendeten FLAG- und HA-Fusionskonstrukte verwendet.

### 2.2.1.5 HDAC4-Konstrukte

**Tabelle 9. Zur Klonierung von HDAC4-Konstrukten verwendete Oligonukleotide.**

<b>HDAC4-Konstrukt</b>	<b>Oligonukleotid "Sense"</b>	<b>Oligonukleotid "Antisense"</b>
aa 1-1084	5'CGGAATTCACCATGAGCT CCCAAAGCCATCCAG3' <sup>a</sup>	5'CGGAATTCAGGGGCGGC TCCTCTTCCAT3'
aa 1-231	5'CGGAATTCACCATGAGCT CCCAAAGCCATCCAG3'	5'CGGAATTCCTCCAGGACC GGGTGGTTATAGG3'
aa 118-1084	5'CGGAATTCACCATGCTGG CCATGAAGCACCAG3'	5'CGGAATTCAGGGGCGGC TCCTCTTCCAT3'
aa 612-1084	5'CGGAATTCACCATGGAGG CCGCCGGCATC3'	5'CGGAATTCAGGGGCGGC TCCTCTTCCAT3'
aa 638-1084	5'CGGAATTCACCATGACCT TCCCCGTGTCTGTGCAGG3'	5'CGGAATTCAGGGGCGGC TCCTCTTCCAT3'
aa 662-1084	5'CGGAATTCACCATGCTGA AGCACCAGTGCACC3'	5'CGGAATTCAGGGGCGGC TCCTCTTCCAT3'
aa 612-1058	5'CGGAATTCACCATGGAGG CCGCCGGCATC3'	5'CGGAATTCGGCGGTGACC GTCTCGGCTTG3'
aa 612-1002	5'CGGAATTCACCATGGAGG CCGCCGGCATC3'	5'CGGAATTCCTTCTGGGAGA GGATCAAGCTC3'
aa 118-662	5'CGGAATTCACCATGCTGG CCATGAAGCACCAG3'	5'CGGAATTCAGCGTGTCA TACACGAGGCC3'
$\Delta$ 803-846 I aa 612-802	5'CGGAATTCACCATGGAGG CCGCCGGCATC3'	5'GGGGTACCTCCAGGGGGG CGGACCACAGC3'

<b>HDAC4-Konstrukt</b>	<b>Oligonukleotid “Sense”</b>	<b>Oligonukleotid “Antisense”</b>
Δ803-846 II aa 847-1084	5'GGGGTACCCAGCAGGCTT TCTACAGC3'	5' <u>CGGAATTC</u> CAGGGGCGGC TCCTCTTCCAT3'

<sup>a</sup> *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und *KpnI*-Restriktionsschnittstellen sind durch Kursivdruck hervorgehoben.

Die KIAA0288-cDNA (GenBank AB006626) wurde von Dr. Nobuo Nomura (Kazusa DNA Research Institute, Kisarazu, Japan) erhalten. Die ursprünglich erhaltene cDNA wies an Position 1135 nt eine C→T Punktmutation auf, die zu einem “Nonsense”-Stoppcodon im Leserahmen von HDAC4 führte. Entsprechend wurde zunächst angenommen, daß das ATG-Codon an Position 1144 nt (entspricht aa 118 des eigentlichen HDAC4-Proteins) der Start für die Translation von HDAC4 sei. Durch Sequenzierung weiterer Klone wurde später die erwähnte “Nonsense”-Punktmutation identifiziert, welche durch Punktmutagenese korrigiert wurde (Dr. Nobuo Nomura, Kazusa DNA Research Institute, Kisarazu, Japan; persönliche Mitteilung). Die für die Klonierung der verschiedenen HDAC4-Konstrukte eingesetzten Oligonukleotide sind Tabelle 9 zu entnehmen. Das HDAC4(Δ803-846)-Konstrukt wurde über eine gemeinsame *KpnI*-Schnittstelle aus den separat PCR-amplifizierten cDNA-Fragmenten, HDAC4(aa 612-802) und HDAC4(aa 847-1084), zusammengesetzt.

### 2.2.1.6 Punkt-Mutagenese

Der gezielte Austausch einer oder weniger Aminosäuren in HDAC4 erfolgte nach dem QuickChange<sup>®</sup>-Protokoll. Dabei wird durch PCR mittels zweier gegenläufiger Oligonukleotide (“Sense” und “Antisense”) ein Nukleotidaustausch innerhalb einer entsprechenden Plasmid-DNA herbeigeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 10 zusammengestellt und wurden vor der Verwendung mittels präparativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend der Vorschrift von Sambrook und Kollegen aufgereinigt (Sambrook et al., 1989). Die Mutagenese erfolgte auf der Basis des HDAC4(aa 612-1084)-FLAG-Expressionskonstrukts (siehe Abschnitt 2.2.1.5); die PCR wurde 30 sec lang bei 95°C und danach für 15 Zyklen (30



sec bei 95°C, 1 min bei 55°C, 20 min 68°C) durchgeführt. Beide DNA-Stränge aller Konstrukte wurden sequenziert (UCSF Sequencing Core).

**Tabelle 10. Zur Punktmutagenese von HDAC4 verwendete Oligonukleotide.**

<b>Mutation</b>	<b>Oligonukleotid “Sense”</b>	<b>Oligonukleotid “Antisense”</b>
H802A	5'CCGCCCCCCTGGAG <b>CCCA</b> TGCGGAGGAGAGC3' <sup>a</sup>	5'GCTCTCCTCCGCATGGGC TCCAGGGGGGCGG3'
H803A	5'CCGCCCCCCTGGACAC <b>GC</b> TGCGGAGGAGAGC3'	5'GCTCTCCTCCGCAGCGTG TCCAGGGGGGCGG3'
D840N	5'CTCATCGTGGACTGGA <b>AC</b> GTGCACCATGGAAAC3'	5'GTTTCCATGGTGCACGTT CCAGTCCACGATGAG3'
H842A	5'GGACTGGGACGTGG <b>CCCA</b> TGGAACGGGACC3'	5'GGTCCCGTTTCCATGGGC CACGTCCAGTCC3'
N845D	5'GACGTGCACCATGGAG <b>AC</b> GGGACCCAGCAGGC3'	5'GCCTGCTGGGTCCCCTCT CCATGGTGCACGTC3'
D854N	5'CAGGCTTTCTACAGCA <b>AC</b> CCTAGCGTCCTGTAC3'	5'GTACAGGACGCTAGGGTT GCTGTAGAAAGCCTG3'
D934N	5'GTGTCATCAGGCTTCA <b>AT</b> GCCGTGGAGGGCCAC3'	5'GTGGCCCTCCACGGCATT GAAGCCTGATGACTC3'
H976A	5'CCCTCGAGGGAGGC <b>GCCG</b> ACCTGACCGCC3'	5'GGCGGTCAGGTCGGCGCC TCCCTCGAGGG3'
HD976 977AV	5'CCCTCGAGGGAGGC <b>GCCG</b> TCCTGACCGCC3'	5'GGCGGTCAGGACGGCGC CTCCCTCGAGGG3'

<sup>a</sup> ausgetauschte Nukleotide sind durch Fettdruck hervorgehoben.

### 2.2.1.7 HDAC5-Konstrukte

Der Klon #1142916 des I.M.A.G.E-Consortiums (Cariaso et al., 1999) wurde von Research Genetics (Huntsville, USA) bezogen und beide DNA-Stränge sequenziert (UCSF Sequencing Core). Zunächst wurde ein Fragment dieser cDNA entsprechend aa 131-1122 von HDAC5 mittels den in Tabelle 11 angegebenen Oligonukleotiden PCR-amplifiziert und in den pcDNA3.1-*NotI*-FLAG-Vektor kloniert (Nukleotidposition 202 bis zu 3168 der HDAC5-cDNA). Ein Fragment entsprechend

**Tabelle 11. Zur Klonierung von HDAC5-Konstrukten verwendete Oligonukleotide.**

<b>HDAC5-Konstrukt</b>	<b>Oligonukleotid “Sense”</b>	<b>Oligonukleotid “Antisense”</b>
aa 1-1122	5' ATTTGCGG <u>CCG</u> CCACCAT GAACTCTCCCAACGAGTC3' <sup>a</sup>	5' ATTTGCGG <u>CCG</u> CACAGGG CAGGCTCCTGCTCC3'
aa 1-247	5' ATTTGCGG <u>CCG</u> CCACCAT GAACTCTCCCAACGAGTC3'	5' ATTTGCGG <u>CCG</u> CTGTTCGT AGGGGCCAGGCAAAGG3'
aa 131-1122	5' ATTTGCGG <u>CCG</u> CAACCAT GCTGGCAGCCAAGCGGC3'	5' ATTTGCGG <u>CCG</u> CACAGGG CAGGCTCCTGCTCC3'
aa 131-682	5' ATTTGCGG <u>CCG</u> CAACCAT GCTGGCAGCCAAGCGGC3'	5' ATTTGCGG <u>CCG</u> CTGAACG TGTCGTAGACCACAC3'
aa 646-1122	5' ATTTGCGG <u>CCG</u> CAACCAT GCTCAGCCTGGCCACTG3'	5' ATTTGCGG <u>CCG</u> CACAGGG CAGGCTCCTGCTCC3'

<sup>a</sup> *NotI*-Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

aa 1-247 von HDAC5 wurde direkt aus einer HeLa-Zellen-cDNA-Bibliothek entsprechend den Vorgaben des Herstellers PCR-amplifiziert. Beide Fragmente wurden über eine interne *EcoRI*-Schnittstelle (an Nukleotidposition 565 des HDAC5-Leserahmens) zusammengefügt. Der erhaltene Leserahmen entspricht dem der GenBank-Eintragung NM 005474.

### 2.2.1.8 HDAC6-Konstrukte

Ausgehend von der Nukleotidsequenzinformation der GenBank-Eintragung AJ011972 (“Transcription map in Xp11.23”; Strom et al., nicht veröffentlicht) wurden überlappende Fragmente entsprechend aa 1-488 und aa 409-1214 von HDAC6 über PCR aus einer HeLa-Zellen-cDNA-Bibliothek mit den in Tabelle 12 aufgeführten Oligonukleotiden amplifiziert. Die beiden erhaltenen Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *DraIII* verdaut (schneidet an Nukleotidposition 1240 des HDAC6-Leserahmens) und anschließend über diese gemeinsame Schnittstelle fusioniert. Der auf diese Weise rekonstruierte Leserahmen entspricht dem der GenBank-Eintragung NM 006044.

**Tabelle 12. Zur Klonierung von HDAC6-Konstrukten verwendete Oligonukleotide.**

<b>HDAC6-Konstrukt</b>	<b>Oligonukleotid “Sense”</b>	<b>Oligonukleotid “Antisense”</b>
aa 1-1214	5'CCCAAGCTT <u>GCGGCCGCTC</u> AACTATGACCTCAACCGG3' <sup>a</sup>	5'GCTCTAGATTACTTGTCAT CGTCGTCCTTGTAGTCTCCT CCGCGGCCGCGAGTGTGGGT GGGGCATATCCTC3' (enthält FLAG-Sequenz) 5'CGTCTAGATTAAGCGTAG TCTGGGACGTCGTATGGGT ATCCTCCGCGGCCGCGAGTG TGGGTGGGGCATATCCTC3' (enthält HA-Sequenz)
aa 1-488	5'CCCAAGCTT <u>GCGGCCGCTC</u> AACTATGACCTCAACCGG3'	5'ATTTGCGGCCGCTATTTTG GTCATAGACCAGCC3'
aa 409-1214	5'ATTTGCGGCCGCGCACCATG CTGGAGTCACCTGGTGC3'	5'GCTCTAGATTACTTGTCAT CGTCGTCCTTGTAGTCTCCT CCGCGGCCGCGAGTGTGGGT GGGGCATATCCTC3' (enthält FLAG-Sequenz)

<sup>a</sup> *NotI*-Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. *Bam*HI- und *Hind*III-Restriktionsschnittstellen sind durch Kursiv- und die Stoppcodons durch Fettdruck hervorgehoben.

### 2.2.1.9 HDAC7-Konstrukte

Computeralgorithmen, die in der Lage sind, die Grenzen von Exons und Introns vorherzusagen (Genscan; Burge und Karlin, 1997 und GenFinder; Solovyev und Salamov, 1997) sowie Ähnlichkeiten zu den Sequenzen von HDAC4, HDAC5 und HDAC6 wurden verwendet, um einen hypothetischen Leserahmen von einer genomische Sequenz auf Chromosom 12q31 abzuleiten. Überlappende Fragmente entsprechend aa 279-912 und aa 438-912 von HDAC7 wurden durch PCR mit den in Tabelle 13 aufgeführten Oligonukleotidpaaren aus einer HeLa-Zellen-cDNA-Bibliothek amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *Bcl*I verdaut (schneidet an Nukleotidposition 1040 des HDAC7-Leserahmens) und danach

über diese gemeinsame Schnittstelle fusioniert. Der erhaltene Leserahmen entsprechend HDAC7 wurde in die GenBank eingetragen (AF239243).

**Tabelle 13. Zur Klonierung von HDAC7-Konstrukten verwendete Oligonukleotide.**

<b>HDAC7-Konstrukt</b>	<b>Oligonukleotid “Sense”</b>	<b>Oligonukleotid “Antisense”</b>
aa 1-912	5' <u>CGGAATTC</u> CAGCCCATGG ACCTGCGGGTG3' <sup>a</sup>	5' <u>CGGAATTC</u> GAGATTCATA GGTTCCTCCTC3'
aa 1-487	5' <u>CGGAATTC</u> CAGCCCATGG ACCTGCGGGTG3'	5' <u>CGGAATTC</u> GACCGAGTCA TAGATCAGCC3'
aa 279-912	5' <u>CGGAATTC</u> ACCATGGCCC CGCTGCTGACTGTGCC3'	5' <u>CGGAATTC</u> GAGATTCATA GGTTCCTCCTC3'
aa 343-912	5' <u>CGGAATTC</u> ACCATGACTC ACGTCCAGGTGATCAAG3'	5' <u>CGGAATTC</u> GAGATTCATA GGTTCCTCCTC3'
aa 438-912	5' <u>CGGAATTC</u> ACCATGCACC GGCCTCTGTCCC3'	5' <u>CGGAATTC</u> GAGATTCATA GGTTCCTCCTC3'
aa 487-912	5' <u>CGGAATTC</u> ACCATGCTGA AGCACCAGTGCTC3'	5' <u>CGGAATTC</u> GAGATTCATA GGTTCCTCCTC3'

<sup>a</sup> *Eco*RI-Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

#### 2.2.1.10 N-CoR-Konstrukte

Ein Expressionsplasmid, das die cDNA entsprechend dem vollständigen Leserahmen von murinem N-CoR enthält, wurde von Dr. Mitchell A. Lazar (University of Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt (GenBank NM 011308; Huang et al., 2000). Die Klonierung der GST-RD-Konstrukte erfolgte über PCR-Amplifizierung der entsprechenden Fragmente unter Verwendung der in Tabelle 14 angegebenen Oligonukleotide.

**Tabelle 14. Zur Klonierung von N-CoR-RD-Konstrukten verwendete Oligonukleotide.**

<b>N-CoR-Konstrukt</b>	<b>Oligonukleotid “Sense”</b>	<b>Oligonukleotid “Antisense”</b>
RD1 aa 1-312	5' <u>CGGAATTC</u> ACCATGTCAA G TTCAGGTTATCCTCC3' <sup>a</sup>	5' <u>CGGAATTC</u> CATCATAACGT TGGCAGATTTTTT3'
RD2 aa 752-1016	5' <u>CGGAATCC</u> ACCATGAGCA GTGAAAATGCTGCTTCTC3'	5' <u>CGGAATTC</u> CCCACTCCCTG TTTGGACTCTTAG3'
RD3 aa 1017-1506	5' <u>CGGAATTC</u> ACCATGCAAG TCCTCCAACCTGCTCCGC3'	5' <u>CGGAATTC</u> GGGGGAGCC TCTGGATATGGTG3'

<sup>a</sup> *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

### 2.2.2 Northern Blotting

cDNAs wurden mit dem Multiprime-System unter Verwendung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP radiomarkiert. Alle radiomarkierten Sonden wurden innerhalb einer Woche nach Erhalt des kalibrierten [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP hergestellt und verwendet. mRNA-Blots verschiedener Gewebe (MTN Northern Blots, human) wurden bei 42°C in ULTRAhyb<sup>®</sup> 2 h lang prähybridisiert (Rollerofen). Die Hybridisierung erfolgte mit ca. 10<sup>6</sup> cpm/ml radiomarkierter Probe in ULTRAhyb<sup>®</sup> 14-24 h lang bei 42°C. Anschließend wurden die Membranen 2 x 10 min lang bei 42°C in 2X SSC, 0.1 % (w/v) SDS und 2 x 30 min lang in 0,1X SSC bei 65°C gewaschen. Die Detektion erfolgte entsprechend der Fluorographie von SDS-Gelen (siehe Abschnitt 2.2.2.3). Zur Entfernung der radiomarkierten Proben von den Membranen wurde 10 min lang in 0,5% (w/v) SDS bei 90-100°C (kochende Lösung) inkubiert. Die Membranen wurden luftgetrocknet, in Plastiktüten verpackt und bis zur Wiederverwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde im diskontinuierlichen Verfahren nach der Methode von Laemmli durchgeführt (Laemmli,

1970). Es wurden sowohl BIO-RAD mini-PROTEAN II Dual Slab Cell-Mini-elektrophoreseeinheiten als auch PROTEAN II xi Elektrophoreseeinheiten verwendet. Gele wurden unmittelbar (1-2 h) vor dem Verbrauch nach der Vorschrift von Ausubel und Kollegen hergestellt (Ausubel et al., 1995). Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und 5 min lang gekocht. Nach Abkühlen und Abzentrifugieren wurden die Proben auf Eis oder im Kühlschrenak bei 4°C gelagert. Zu (semi-)quantitativen Vergleichen wurden stets gleiche Probenvolumina aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke (15 mA bei 0,75 mm dickem Gel, 30 mA bei 1,5 mm dickem Gel) und wurde gestoppt, sobald eine entsprechende Auftrennung der Molekulargewichtsmarker erreicht war.

### **2.2.3.1 Färbung der Gele**

#### **2.2.3.1.1 Coomassie-Färbung**

Die Gele wurden für 5-10 min mit Fixierlösung behandelt und danach 5 min lang in Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte nach mehrfachem Wechsel der Entfärbelösung und wurde durch die Saugkraft eines zugegebenen Papiertaschentuchs unterstützt.

#### **2.2.3.1.2 Silberfärbung**

Die Silberfärbung erfolgte nach der Vorschrift von Sammons und Kollegen (Sammons et al., 1981) mit entsprechenden Modifizierungen (GELCODE®-System). Zur Silberfärbung für die anschließende massenspektrometrische Analyse wurden die Gele 2 h lang mit Fixierlösung behandelt und anschließend 20 min lang in 50 % (v/v) Methanol und 2 x 15 min lang mit aqua bidest. gewaschen. Danach wurde 3 min lang mit Sensibilisierungslösung inkubiert. Es wurde kurz mit aqua bidest. gewaschen (2 x 1 min) und 30 min lang mit Silbernitratlösung gefärbt. Die Entwicklung erfolgte nach kurzem Waschen (2 x 2 min aqua bidest.) und mehrmaligem Wechseln des Entwicklers. Der Färbevorgang wurde mit 5% (v/v) Eisessig (5 min) gestoppt und die Gele bis zur weiteren Verwendung (Ausschneiden der Banden) in 1% (v/v) Eisessig gelagert (Shevchenko et al., 1996).

### **2.2.3.2 Trocknung der Gele**

Gefärbte Gele wurden auf Filterpapier mit dem Vakuumgeltrockner getrocknet. Alternativ wurden die Gele nach dem Färben 4 x 1 h lang in aqua bidest. und anschließend 1 h lang in 5% (v/v) Glycerin inkubiert. Danach wurden die Gele zwischen Cellulosepapier im Heißluft-Trockenofen getrocknet.

### **2.2.3.3 Fluorographie**

Im Anschluß an die Coomassie-Färbung wurden die SDS-PAGE-Gele 1 h lang mit Amplify<sup>®</sup> inkubiert und direkt im Vakuumtrockner getrocknet. Die getrockneten Gele wurden dann mit einem Röntgenfilm in einer beidseitig mit Verstärkerfolie beschichteten Fluorographie-Cassette bei -80°C exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte vollautomatisch im X-OMAT.

### **2.2.4 Western Blotting**

Nach der Auftrennung wurden die Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen direkt mit der Mini Trans-Blot Cell System Mini Western Blotting-Einheit oder der PROTEAN II Transfer Western Blotting-Einheit auf Nitrocellulosemembranen elektrotransferiert. Der Transfer erfolgte bei konstanter Spannung von 50 V 1 h lang bei 4°C in Transferpuffer. Die immunologische Detektion der transferierten Proteine erfolgte anschließend bei RT unter konstantem sanftem Schütteln. Die Membranen wurden mindestens 1h lang in Blockierungspuffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit der entsprechenden Verdünnung an primärem Antikörper in Blockierungspuffer mindestens 1 h lang (für Verdünnung der primären Antikörper siehe Abschnitt 2.1.9.1, Tabelle 3). Die Membranen wurden 5 x 5 min lang mit Waschpuffer gewaschen und in die entsprechende Verdünnung des sekundären Antikörpers in Blockierungspuffer für mindestens 1 h transferiert (zur Verdünnung der sekundären Antikörper siehe Abschnitt 2.1.9.2, Tabelle 4). Nach erneutem 5 x 5 min langem

Waschen mit Waschpuffer wurden die Membranen vorsichtig abgetrocknet und die Blots mit fluorogenem ECL<sup>®</sup>-Substrat und anschließender Fluorographie entwickelt.

### **2.2.5 Zellkultur**

Alle Zelllinien wurden bei 37°C in einer mit Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre von 95% Luft/5% CO<sub>2</sub> gehalten. Kultivierung, Einfrieren und Auftauen der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte nach den Vorgaben der American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, USA). Soweit nicht anders angegeben, enthielten alle Kulturmedien 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin (siehe Abschnitt 2.1.7, Tabelle 2).

### **2.2.6 Transfektion**

#### **2.2.6.1 Calciumphosphatmethode**

293- und Cos7-Zellen wurden mit der klassischen Calciumphosphatmethode transfiziert (Ausubel et al., 1995). Die Zellen wurden zu 5 x 10<sup>4</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> Kulturfläche ausgesät. Am nächsten Tag (die Zellen sollten zum Zeitpunkt der Transfektion zu ca. 60% konfluent sein) wurde das Kulturmedium 2 h vor der eigentlichen Transfektion gewechselt (1 ml/cm<sup>2</sup> Kulturfläche). Pro cm<sup>2</sup> Kulturfläche wurden 0,5 µg Plasmid-DNA zusammen mit 1,55 µl Calciumlösung in ein Volumen von 12,5 µl aqua bidest. eingebracht. Diese Plasmidlösung wurde langsam in 2 X HBS-Lösung unter gleichmäßigem sanftem Vortexen getropft (12,5 µl pro cm<sup>2</sup> an Kulturfläche). Nach 20 min Inkubation bei RT wurde die Transfektionslösung tropfenweise zum Kulturmedium über den Zellen zugegeben. Die Kulturplatten wurden zur Verteilung des Präzipitates sanft geschwenkt und 5 h lang im Kulturschrank inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium entfernt und frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben (3 ml/cm<sup>2</sup> Kulturfläche). Die transfizierten Zellkulturen wurden nach weiteren 48 h im Kulturschrank 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen und bei -80°C tiefgefroren.



### 2.2.6.2 Lipofektion

Hela- und NIH3T3-Zellen wurden mittels Lipofektion transfiziert. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausgesät ( $5 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  Kulturfläche, die Zellen sollten zum Zeitpunkt der Transfektion zu ca. 60% konfluent sein). Pro  $\text{cm}^2$  an Kulturfläche wurden zunächst 0,13  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in 13  $\mu\text{l}$  OptiMEM<sup>®</sup> (serumfrei, keine Zusätze, Lösung A) sowie 0,4  $\mu\text{l}$  LipofectAMINE<sup>™</sup> in 12,6  $\mu\text{l}$  OptiMEM<sup>®</sup> (serumfrei, keine Zusätze, Lösung B) eingebracht. Nach dem Vereinigen der beiden Lösungen A und B wurde durch sanftes Anstoßen an das Reaktionsgefäß gemischt und 45 min lang bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen einmal mit serumfreiem Kulturmedium gewaschen. Die Reaktionslösung wurde mit 45  $\mu\text{l}$  serumfreiem Kulturmedium verdünnt und direkt auf die Zellen gegeben. Nach 5 h Inkubation im Kulturschrank wurde das Transfektionsmedium durch Normalmedium ersetzt. Nach weiteren 48 h wurden die transfizierten Zellkulturen 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen und bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren.

### 2.2.6.3 Etablierung konstitutiv-exprimierender Zelllinien

Zur Etablierung von 293-Zelllinien, die HDAC-FLAG-Proteine konstitutiv exprimieren, wurden die zu transfizierenden pcDNA3.1-Plasmide mittels *SspI*-Restriktionsverdau linearisiert. Linearisierte Plasmide wurden über Agarosegelelektrophorese und GENE CLEAN-SPIN<sup>®</sup>-Glasmilch aufgereingt und mittels Lipofektion transfiziert. Die Selektion auf Zellklone, die die linearisierten Plasmide in ihr Genom integriert hatten, erfolgte in Normalmedium unter Zusatz von 700  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418-Sulfat. Zellklone wurden mittels Klonierungszyklindern isoliert und in getrennten Kulturen vermehrt. Nachdem die Klone auf die Expression der Hybridproteine mittels Western Blot getestet worden waren, wurden die Kulturen in Normalmedium unter Zusatz von 450  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418-Sulfat gehalten. Zur Anzucht großer Zellmengen wurde auf die Zugabe von G418-Sulfat verzichtet.

## **2.2.7 Gewinnung von Zellextrakten**

### **2.2.7.1 Radiomarkierung von Zellen**

HeLa- und 293-Zellen wurden zu  $5 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Kulturplatte in DMEM-Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen (ca. 90% konfluent) 2 x mit DMEM-Medium ohne Methionin und Cystein gewaschen und für 15 min in DMEM-Medium ohne Methionin und Cystein im Kulturschrank inkubiert. Kurzzeitmarkierungen erfolgten innerhalb von 5 h mit entsprechendem [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin und [ $^{35}\text{S}$ ]-Cystein enthaltenden EXPRE $^{35}\text{S}^{35}\text{S}$ -Markierungsmedium im Kulturschrank. Für Langzeitmarkierungen wurde 16 h lang mit entsprechenden Markierungsmedium inkubiert.

### **2.2.7.2 Gesamtzellextrakte**

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und bei einer Dichte von  $50 \times 10^6$  Zellen pro ml in IPLS-Puffer aufgenommen. Nach dem gründlichen Resuspendieren wurde 30 min lang bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde erneut gründlich resuspendiert und Zellbruchstücke sowie nicht-lysierte Zellen abzentrifugiert (14000xg, 15 min, 4°C). Zelllysate wurden durch Zugabe von IPLS-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml eingestellt, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.2.7.3 Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten**

#### 2.2.7.3.1 Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten im kleinen Maßstab

Die Isolierung und Lyse von Zellkernen erfolgte mit geringen Modifikationen nach der von Osborn und Kollegen beschriebenen Methode (Osborn et al., 1989). Die Zellen wurden 2 x in PBS gewaschen und zur hypoosmotischen Schwellung ( $2,5 \times 10^7$  Zellen/ml) 2 x 10 min lang auf Eis in Puffer A inkubiert (Zentrifugation bei 600xg, 7 min, 4°C). Zur Isolierung der Zellkerne wurden die geschwol-

lenen Zellen in Puffer A, 0,1% (v/v) Nonidet® P40 10 min lang auf Eis mit wiederholtem sanften Mixen inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellkerne (600xg, 10 min, 4°C) wurde der zytosolische Überstand mit Puffer D verdünnt (1:2). Die verbliebenen Zellkerne wurden in Puffer B bei kontinuierlichem Mischen 30 min lang bei 4°C extrahiert ( $3 \times 10^8$  Zellen/ml). Der erhaltene Kernextrakt (Zentrifugation bei 12000xg, 15 min, 4°C) wurde schließlich mit Puffer C verdünnt (1:3), in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 2.2.7.3.2 Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten größerer Zellmengen

Die Kernextrakte wurden nach der von Dignam und Kollegen beschriebenen Methode hergestellt (Dignam et al., 1983). Die Zellen wurden 2 x in PBS gewaschen und zur hypoosmotischen Schwellung 5 min lang auf Eis in Puffer A (5 Zellvolumina) inkubiert (Zentrifugation bei 600xg, 10 min, 4°C). Zur Isolierung der Zellkerne wurden die geschwollenen Zellen in Puffer A (zwei Zellvolumina) aufgenommen und in einen vorgekühlten Dounce Homogenisator (Pistill B) überführt. Die Zellsuspension wurde dann mit 30 Stößen homogenisiert (Kontrolle der Zelllyse mittels Trypanblaufärbung, bis zu 90%-iger Lyse). Nach dem Abzentrifugieren der Zellkerne (1500xg, 7 min, 4°C) wurde die zytosolische S100-Fraktion abgenommen und die Zellkerne in Puffer B resuspendiert ( $2,5 \times 10^8$  Zellen/ml). Die Suspension der Zellkerne wurde in einem Dounce Homogenisator (Pistill B, 10 Stöße alle 5 min) auf Eis 30 min lang homogenisiert. Nach dem Abzentrifugieren (25000xg, 30 min, 4°C) wurde gegen 3 x 50 Volumina Puffer E dialysiert. Unlösliches Material wurde abzentrifugiert (30000xg, 30 min, 4°C) und die Lysate durch Verdünnen mit Dialysepuffer auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. Extrakte wurden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.2.8 Transkription und Translation im Retikulozytenlysat**

Die Transkription und Translation von cDNAs zur Herstellung rekombinanter Proteine erfolgte gekoppelt im TNT®-Retikulozytenlysat auf der Basis der von pcDNA3.1(+) abgeleiteten Plasmide. In Standardreaktionen (50 µl Gesamtvolumen) wurden 1,5 µg aufgereinigtes Plasmid unter Zugabe von RNasin® unter RNase-freien

Bedingungen nach den Empfehlungen des Herstellers 2 h lang bei 30°C mittels T7-Polymerase transkribiert und parallel im Retikulozytenlysat translatiert. Zur Radiomarkierung wurde die Aminosäuremischung ohne Methionin, aber mit [<sup>35</sup>S]-Methionin verwendet. Die Reaktionsmischungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## **2.2.9 GST-Fusionsproteine**

### **2.2.9.1 Expression und Aufreinigung**

Zur N-terminalen Fusion mit GST wurden die cDNAs in die entsprechenden Leseraster der pGEX-4T-Vektoren kloniert. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte im Bakterienstamm BL21 (RIP). Einzelkolonien wurden in LB-Medium eingebracht und Vorkulturen entsprechenden Volumens bis zur stationären Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  ca. 2-3) herangezogen (über Nacht). Die Vorkulturen wurden mit LB-Medium verdünnt (1:10) und weitere 2 h lang im Schüttler inkubiert (bis  $OD_{600nm}$  ca. 1). Nach Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,1 mM wurde 4 h lang bei 30°C die Expression der Fusionsproteine induziert (Schüttler, 250 rpm). Die Bakterienkulturen wurden abzentrifugiert (10000xg, 15 min, RT) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Bakterien wurden in eiskaltem GST-Lysepuffer resuspendiert (2,5 ml pro 100 ml Bakterienkultur) und auf Eis durch Ultraschall mit dem Sonikator aufgebrochen (4 x 45 sec). Nach dem Abzentrifugieren der Zellbruchstücke (17000xg, 10 min, 4°C) wurden die Fusionsproteine 30 min lang bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden (0,1 ml GSH-Sepharose-Suspension pro 2,5 ml Lysat). Danach wurde 2 x 10 min lang mit GST-Lysepuffer und 2 x 10 min lang mit PBS gewaschen. Zur Verwendung als Affinitätsmatrices wurden die an GSH-Sepharose gebundenen Fusionsproteine in einem Bettvolumen GST-Lagerungspuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Elution der GST-Fusionsproteine erfolgte bei RT mit 3 x 2 Bettvolumen GST-Elutionspuffer. Die Eluate wurden vereinigt, filtriert (0,45 µm) und bei 4°C gegen 3 x 100 Volumina GST-Dialysepuffer dialysiert. Eluierte Fusionsproteine wurden bei -20°C gelagert. Die Überprüfung der

Qualität und Quantität der Aufreinigung erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der Gele. Für alle Experimente wurden gleiche molare Mengen an unterschiedlichen GST-Fusionsproteinen oder GST eingesetzt. Zum Abgleich der abweichenden Volumina der Affinitätsmatrices wurde GSH-Sepharose verwendet.

### **2.2.9.2 Bindung rekombinanter, radiomarkierter Proteine**

Zum Test der Bindung rekombinanter Proteine wurden die entsprechenden cDNAs im Retikulozytensystem (siehe Abschnitt 2.2.8) in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin translatiert. 5 µl der Markierungsreaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl GST-Puffer mit 20 µl 50%-iger Affinitätsmatrix auf dem Schüttler 1 h lang bei 4°C inkubiert. Reaktionen wurden 5 x 5 min lang mit GST-Puffer gewaschen, direkt mit Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und auf SDS-PAGE-Gele aufgetragen. Nach dem Trocknen der Gele erfolgte die Auswertung durch Fluorographie (siehe Abschnitt 2.2.3.3).

### **2.2.9.3 Bindung zellulärer Proteine**

200 µl Zellextrakt wurde mit 25 µl 50%-iger Affinitätsmatrix 1 h lang bei 4°C inkubiert. Danach wurde 3 x 5 min lang in IPLS-Puffer, 3 x 5 min lang in IPHS-Puffer und 2 x 5 min lang in HD-Puffer gewaschen. Die Ansätze wurden mit dem letzten Waschgang aufgeteilt und entweder direkt für Histon-Desacetylaseaktivitätstests oder für SDS-PAGE und Western Blotting eingesetzt.

## **2.2.10 Gewinnung und Aufreinigung von Antisera**

### **2.2.10.1 Gewinnung von *anti*-HDAC4- und *anti*-HDAC7-spezifischen Antisera**

Fusionsproteine zwischen GST und HDAC4(aa 118-662) sowie HDAC7(aa 1-

487) wurden in Bakterien exprimiert und über GSH-Affinitätssäulen aufgereinigt. Um kontaminierende bakterielle Proteine vollständig abzutrennen, wurden die Fusionsproteine mit Laemmli-Probenpuffer von den Affinitätssäulen eluiert und anschließend durch denaturierende SDS-PAGE in großem Maßstab (PROTEAN II xi Elektrophoreseeinheiten, 3 mm dicke Normalgele mit breitem Kamm) aufgetrennt. Nach der Coomassie-Färbung der Gele wurden die den Fusionsproteinen entsprechenden Proteinbanden mit dem Skalpell ausgeschnitten und die Gelstücke mittels Pressen durch eine Spritze mazeriert (20 g Nadel, geschätzte Gesamtmenge jeweils 0,5-1 g Protein im Vergleich zur Färbungsintensität entsprechend standardisierter Proteinmengen). Die Injektion, Haltung und Blutentnahme der Kaninchen wurde von der Firma Harland Bioproducts (Madison, USA) durchgeführt. Dabei entsprach der Zeitplan der Injektionen und der Entnahmen von Test- und Produktionsblut einem klassischen 4-wöchigen Rhythmus (Harlow und Lane, 1988). Die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Immunisierung erhaltenen Seren positiv-getesteter Kaninchen wurden vereinigt und in Aliquots von 5 ml gelagert bei -20°C.

#### **2.2.10.2 Eliminierung unspezifischer Fraktionen**

Aliquots der unterschiedlichen Seren wurden nach Bedarf bei RT aufgetaut, durch 0,22 µm Filter filtriert und sequentiell auf Affinitätssäulen von rekombinanter aufgereinigter GST, oder GST-HDAC-Fusionsproteinen aufgetragen (*Anti*-HDAC4-Antiserum: GST → HDAC5(aa 131-682) → GST-HDAC7(aa 1-487); *Anti*-HDAC7-Antiserum: GST → GST-HDAC4(aa 118-662) → GST-HDAC5(aa 131-682)).

#### **2.2.10.3 Aufreinigung der IgG-Fraktion von Antiseren**

Protein-G-Sepharose wurde in Waschpuffer I äquilibriert und in eine Plastik-einwegsäule (Ø 0,5 cm) gepackt (1 ml Säulenmaterial pro 3 ml aufzureinigendem Serum). Antiseren wurden durch 0,22 µm Filter filtriert und der pH-Wert wurde durch Zugabe von einem Zehntel Volumen 1 M Tris-HCl, pH 7,0 stabilisiert. Danach wurden die Seren wiederholt (4x) auf die Säulen aufgetragen. Nicht-gebundenes

Material wurde mit zehn Säulenvolumina Waschpuffer I und zwei Säulenvolumina Waschpuffer II ausgewaschen. Die Elution erfolgte in Fraktionen von ungefähr 0,9 ml mit 15 Säulenvolumina Elutionspuffer unter Vorlage von 0,1 ml Neutralisationspuffer. Fraktionen wurden sofort gemischt und bei 4°C gelagert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Fraktionen mit Proteinkonzentrationen  $\geq 1$  mg/ml vereinigt und bei 4°C gegen 3 x 100 Volumina Dialysepuffer dialysiert. Die aufgereinigten Antikörper wurden in Aliquots bei -20°C gelagert.

### **2.2.11 Immunpräzipitation**

Zellextrakte wurden entweder mit den entsprechenden Antiseren (siehe Abschnitt 2.1.9.1, Tabelle 3) und Protein-G-Sepharose (20  $\mu$ l 50%-ige Suspension pro ml) oder mit M2-Agarose (15  $\mu$ l/ml) versetzt und auf dem Schüttler über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der an die Matrix gebundenen Immunkomplexe (3000xg, 3 min, 4°C) wurde 3 x 5 min lang mit IPLS, 3 x 5 min lang mit IPHS und 2 x 5 min lang mit HD-Puffer gewaschen. Mit dem letzten Waschgang wurden die Ansätze aufgeteilt und entweder für Histon-Desacetylaseaktivitätstests oder für SDS-PAGE und Western Blotting eingesetzt. Alternativ wurden die Immunpräzipitate in HD-Puffer bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.2.12 Immunfluoreszenz**

Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mittels Lipofektion transfiziert. Nach einem Tag wurden die Zellen mit PBS, 1% (v/v) Paraformaldehyd 5 min lang bei RT fixiert und anschließend mit PBS, 0,5% (v/v) Triton<sup>®</sup> X-100 permeabilisiert. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurde 20 min lang in PBS, 10 % Kaninchenserum gewaschen, danach erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden primären Antikörpern (verdünnt in PBS) 60 min lang. Nach 3 x 5 min Waschen in PBS wurde mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (verdünnt in PBS, zur Verdünnung der Antikörper, siehe Abschnitt 2.1.9.2, Tabelle 5) 45 min lang inkubiert. Nach 3 x 5 min Waschen in PBS wurden die Deckgläschen in PBS,

90% (v/v) Glycerin, 1 mM Paraphenyldiamin auf Objektträger aufgebracht. Die konfokale Mikroskopie (Zeiss LSM510) erfolgte bei einer Wellenlänge des Lasers von 488 nm (mit Alexa 488 konjugierte sekundäre Antikörper, grün) oder 543 nm (mit Cy3 konjugierte sekundäre Antikörper, rot). Um das Überlappen der verschiedenen Farbkanäle zu minimieren, wurden Bandfilter eingesetzt, außerdem wurden die unterschiedlichen Wellenlängen einzeln gemessen. Bilder wurden zunächst im 12-bit-Format aufgenommen und die einzelnen Kanäle später separat auf 8-bit-Format rekali­briert.

## **2.2.13 Enzymatischer Nachweis auf Histon-Desacetylaseaktivität**

### **2.2.13.1 Herstellung des Substrats**

Folgendes 24 aa Peptid, das dem Aminoterminus des humanen Histons H4 entspricht, wurde synthetisiert: H<sub>2</sub>N-SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRD-COOH. Aliquots (200 µg) wurden lyophilisiert und in 250 µl [<sup>3</sup>H]-Natriumacetatlösung (Ethanol) aufgenommen (10 Ci/mmol, 50 mCi/ml). Die Lösung wurde in ein 5 ml Glasgefäß überführt und 5 µl Aktivierungslösung hinzugegeben. Nach 16-stündigem Rühren bei RT wurde die Lösung unter einem feinen Strahl flüssigen Stickstoffs bis zur Trockenheit konzentriert. Die Reaktionsprodukte wurden in 500 µl Auftragspuffer aufgenommen und in Portionen von 100 µl über Umkehrphasenchromatographie auf einer semianalytischen C-18 Säule aufgetrennt. Dabei wurde ein Gradient von 0%-35% Acetonitril, 0,1% TFA über 35 min bei einer Flußrate von 1 ml/min gefahren. Peakfraktionen (Absorption bei 214 nm) wurden vereinigt, lyophilisiert und in 200 µl aqua bidest. aufgenommen (100000 cpm/ml). Zur Kontrolle der Markierung wurden Aliquots von 30000 cpm auf 20%-igen SDS Gelen aufgetrennt und fluorimetrisch analysiert. Das erhaltene Substrat wurde in Aliquots bei -80°C gelagert.



### **2.2.13.2 Enzymatischer HDAC-Aktivitätstest**

Von Immunpräzitationen und GST-Affinitätsmatrices wurde der Überstand des letzten Waschganges in HD-Puffer vollständig abgenommen. 100000 cpm des Substrats (1 µl) wurden in 30 µl HD-Puffer auf die immobilisierten Enzyme gegeben und unter ständigem Schütteln für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 170 µl HD-Puffer und 50 µl Stoppmix abgebrochen und das freigesetzte [<sup>3</sup>H]-Acetat in 600 µl Ethylacetat durch kräftiges Vortexen (30 sec) extrahiert. Nach der Trennung der Phasen (Zentrifugation, 12000xg, 7 min, RT), wurden 540 µl der oberen, organischen Phase in 5 ml Szintillationsflüssigkeit eingebracht und im Szintillationszähler gezählt. Für Inhibitionstudien (TSA) wurden die immobilisierten Enzyme zunächst 15 min lang bei der entsprechenden Konzentration des Inhibitors vorinkubiert (Verdünnung in HD-Puffer, 4°C). Nach der Abzentrifugation der immobilisierten Enzymkomplexe wurde TSA dann in der entsprechenden Konzentration zur Reaktionsmischung zugegeben. Aufgrund langsamer Zersetzung des Substrats wurden alle Meßwerte gegen entsprechende Leerwerte einer Extraktion des eingesetzten Substrats abgeglichen.

### **2.2.13.3 Gelfiltration über Superose 6**

Zellextrakte wurden durch Zugabe einer 1 M MnCl<sub>2</sub>-Lösung auf 10 mM MnCl<sub>2</sub> eingestellt und 10 min lang bei 37°C mit DNase I behandelt (300U/ml). Der Verdau der DNA wurde durch Zugabe von 0,5 M EDTA-Lösung (Endkonzentration 25 mM) und Kühlen auf Eis gestoppt. Aliquots von 300 µl wurden auf eine in Laufpuffer äquilibrierte Superose 6 HR 10/30-Gelfiltrationssäule aufgetragen (Flußrate 0,2 ml/min, Fraktionsmenge 0,8 ml). Fraktionen wurden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Vor der SDS-PAGE wurde mit 6% Trichlooessigsäure, 0,04% Deoxycholat präzipitiert (20 min, 4°C, 2 x Waschen mit Aceton, RT) und die gefällten Proteine wurden mit 50 µl Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Zur Kalibrierung der Säule wurde ein Gemisch von Dextranblau (Ausschlußvolumen, 2 MDa), Thyreoglobulin (669 kDa), Apoferritin (450 kDa), β-

Amylase (200 kDa), BSA (68 kDa) und Cytochrom C (12,5 kDa) unter den gleichen Bedingungen aufgetrennt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Klonierung einer neuen Klasse humaner HDACs

##### 3.1.1 Identifizierung von humanen Faktoren mit Homologie zu yHDA1

Zur Identifizierung und Klonierung humaner HDACs wurde auf die wachsende Fülle an Sequenzinformationen, die dem “*Human Genome Project*” (Jang et al., 1999; Benson et al., 2000; Vukmirovic und Tilghman, 2000) und der “EST”-Initiative der Washington University entstammen (“*database of expressed sequence tags*”, dbEST; Grosveld, 1999; Gill und Sanseau, 2000), zurückgegriffen. Da bereits drei humane Proteine mit Ähnlichkeit zu yRPD3, einer HDAC in *S. cerevisiae*, bekannt waren (Taunton et al., 1996; Yang et al., 1996; Yang et al., 1997; Dangond et al., 1998; Emiliani et al., 1998), jedoch kein Ortholog einer weiteren Hefe-HDAC, yHDA1 (Carmen et al., 1996; Rundlett et al., 1996), in höheren Eukaryonten beschrieben war, wurde eine Homologiesuche mit diesem Faktor gestartet. Zunächst wurden die Primärstrukturen der yHDA1- und yRPD3-Proteine verglichen (ClustalW-Algorithmus; Eddy, 1995). Im Sequenzbereich von yHDA1 aa 83-439 und yRPD3 aa 29-379 wurde eine signifikante Übereinstimmung (42%) der beiden Sequenzen gefunden, was auf die Konservierung einer zentralen HDAC-Domäne schließen ließ (Abbildung 8).

Suchprogramme mit BLAST- und TBLAST-Algorithmen (Brenner, 1995) des GenomeNetWWW-Webservers (Human Genome Center, Tokyo Univerität, Japan) wurden mit der auf diese Weise identifizierten zentralen yHDA-Sequenz gefüttert.

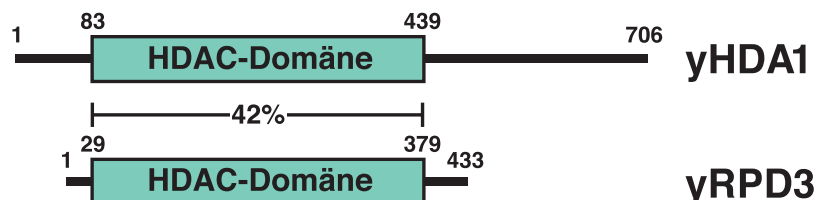


Abbildung 8. Schematischer Vergleich der Primärstrukturen der Hefe-HDACs yHDA1 und yRPD3.

Die Aminosäuresequenzen der yRPD3- und yHDA1-Proteine wurden mittels des ClustalW-Algorithmus verglichen (Eddy, 1995). Eine Region hoher Übereinstimmung der beiden Sequenzen ist als Box dargestellt (HDAC-Domäne).

Dabei wurde die Suche zunächst auf alle zugänglichen Datenbanken ausgeweitet (GenBank, EMBL, SWISSPROT). Die gefundenen Sequenzen wurden auf Gemeinsamkeiten untersucht (Mehrfachalignment mit ClustalW-Algorithmus; Eddy, 1995), in verschiedene Gruppen eingeteilt und zu weiteren Homologiesuchen in definierten Datenbanken (genomische Sequenzen und dbEST) eingesetzt. Die mehrfache manuelle und Computer-unterstützte Sortierung der erhaltenen Sequenzen ergab vier verschiedene neue humane HDACs (Tabelle 15). In der Fortführung der etablierten Nomenklatur wurden diese als HDAC4, HDAC5, HDAC6 und HDAC7 bezeichnet (Emiliani et al., 1998; Fischle et al., 1999; Grozinger et al., 1999; Miska et al., 1999; Wang et al., 1999). Dabei wurde jede dieser neu-identifizierten Sequenzen in min-

**Tabelle 15. Humane Sequenzen mit Homologie zu yHDA1.**

genomische Sequenz <sup>a</sup>	Transkriptionsprodukt <sup>b</sup>	dbEST <sup>c</sup>	HDAC <sup>d</sup>
	<b>KIAA0288</b>	<b>AA101045</b> <b>N27858</b> <b>AA3274322</b>	<b>HDAC4</b>
<b>AC004150</b> <b>AC004994</b> "Chromosom 17"	<b>KIAA0600</b> <b>NY-CO-9</b>	<b>AA194873</b> <b>AA617796</b> <b>H69274</b>	<b>HDAC5</b>
	<b>KIAA0901</b> <b>AJ011972</b>	<b>AL530414</b> <b>AU132867</b> <b>BF528502.1</b>	<b>HDAC6</b>
<b>AC004466</b> "Chromosom 12q31"		<b>W04418</b> <b>H09529</b> <b>N64095</b>	<b>HDAC7</b>

<sup>a</sup> Identifikationsnummer (GenBank) und chromosomale Lokalisation genomischer Sequenzen entsprechend des "Human Genome Projects".

<sup>b</sup> Identifikationsnummer und vorläufige Bezeichnung von mRNAs und cDNAs unbekannter Funktion in GenBank.

<sup>c</sup> Identifikationsnummer (GenBank) von dbEST-cDNA-Klonen, lediglich eine Auswahl der identifizierten Klone mit Homologie zu yHDA1 ist aufgeführt.

<sup>d</sup> Die in den unterschiedlichen Datenbanken gefundenen Sequenzen wurden entsprechend ihrer Identität in Gruppen eingeteilt: HDAC4, HDAC5, HDAC6 und HDAC7.

destens zwei unterschiedlichen Datenbankkategorien gefunden (genomische Sequenzen, Transkriptionsprodukte unbekannter Funktion in GenBank, dbEST; Tabelle 15).

### **3.1.2 Klonierung von humanen Proteinen mit Homologie zu yHDA1**

#### **3.1.2.1 HDAC4**

Eine auf die Größe der mRNAs selektierende Klonierungsstrategie führte in einer Suche nach außergewöhnlich langen cDNAs in Gehirngewebe zur Entdeckung eines 8459 bp großen Genprodukts unbekannter Funktion (KIAA0288; Nagase et al., 1997). Ein größeres Sequenzstück (zwischen Nucleotidpositionen 2400-3900; Abbildung 4) dieser cDNA wies die gewünschte hohe Homologie zu yHDA1 auf. Diese cDNA wurde von Dr. Nobuo Nomura (Kazusa DNA Research Institute, Kisarazu, Japan) erhalten. Nach der Sequenzierung beider DNA-Stränge (UCSF Sequencing Core) ergab eine Computeranalyse einen Leserahmen (ORF) von 3255 nt, was einem Polypeptid von 1084 aa mit einem theoretischen Molekulargewicht von 119 kDa entspricht (zwischen Nucleotidposition 793-4047 des erhaltenen cDNA-Klons; Abbildung 4). [Eine "Nonsense"-Punktmutation des ursprünglich erhaltenen Klons in Nucleotidposition 1135 (C→T), die zu einem Stoppcodon führte, wurde durch Sequenzierung weiterer Klone identifiziert und später durch Punktmutagenese korrigiert (Dr. Nobuo Nomura; persönliche Mitteilung)]. Weitaus kürzere Leserahmen wurden in der 5'-UTR gefunden (nicht abgebildet). Diese sind jedoch höchst wahrscheinlich zu kurz, um funktionelle Proteine zu repräsentieren. Da der abgeleitete Leserahmen hingegen für ein funktionelles Protein codiert (siehe Abschnitt 3.4.5), zählt diese mRNA wohl zu einer wachsenden Gruppe von Transkripten, bei denen nicht das erste ATG-Codon für die Initiation der Translation verwendet wird (Kozak, 1991). Die cDNA KIAA0288 wurde aufgrund der Sequenzhomologie zu yHDA1 und der enzymatischen HDAC-Aktivität des von ihr codierten Polypeptids (siehe Abschnitt 3.4.4) in HDAC4 umbenannt (GenBank-Eintragung NM006037; Fischle et al., 1999; Grozinger et al., 1999; Miska et al., 1999; Wang et al., 1999).

```

...792 nt...atgagctc ccaaagccat ccagatggac tttctggccc agaccagcca gtggagctgc
851 tgaatcctgc cgcggtgaac cacatgcccc gcacgggtgga tgtggccacg gcgctgcctc tgaagtggc
921 cccctcggca gtgcccattg acctgcgcct ggaccaccag ttctcactgc ctgtggcaga gccggccctg
991 cgggagcagc agctgcagca ggagctcctg gcgctcaagc agaagcagca gatccagagg gatccctca
1061 tcgctgagtt ccagaggcag gagatgctgg ccatgaagca ccagcaggag ctgctggaac accagcggaa
1131 gctggagagg caccgccagg agcaggagct ggagaagcag caccggggagc agaagctgca gcagctcaag
1201 aacaaggaga agggcaaaaga gagtgcctgt gccagcacag aagtgaagat gaagttaaca gaatttgtcc
1271 tcaataaaaa gaaggcgctg gccaccggga atctgaacca ctgcatttcc agcgaccctc gctactggtg
1341 cgggaaaaacg cagcacagtt cccttgacca gagttctcca ccccagagcg gagtgtcgac ctctataac
1411 caccgggtcc tgggaatgta cgacgcaaaa gatgacttcc ctcttaggaa aacagcttct gaaccgaatc
1481 tgaatttacg gtcccaggta aagcagaaaag tggccgaaaag acggagcagc cccctgttac gcaggaaaag
1551 ggggcccagtg gtcactgctc taaaaaagcg tccggttggat gtcacagact ccgctgtagc cagcgcacca
1621 ggctccggac ccagctcacc caacaacagc tccgggagcg tcagcgcgga gaacggtatc gcgcccgccg
1691 tccccagcat cccggcggag acgagtttgg cgcacagact tgtggcacga gaaggctcgg ccgctccact
1761 tcccctctac acatcgccat ccttgcccaa catcacgctg ggctgcctg ccaccggccc ctctgcgggc
1831 acggcgggccc agcaggacac cgagagactc acccttcccg cctccagca gaggctctcc cttttccccg
1901 gcaccacctc cactccctac ctgagcacct cgccttggga gcgggacgga ggggacgccc aggcctctc
1971 tctgcagcac atggtcttac tggagcagcc accgggcaaa gcacccctcg tcacccctcg ccgagcactg
2041 cccctccacg cacagtcctt ggttggtgca gaccgggtgt cccctccat ccacaagctg cggcagcacc
2111 gccactggg ggggacccag tccgccccgc tgccccagaa cgcccaggct ctgacagacc tggcatcca
2181 gcagcagcat cagcagtttc tggagaaaaca caagcagcag ttcacagcagc agcaactgca gatgaacaag
2251 atcatcccca agccaagcga gccagcccgg cagccggaga gccaccgga gcacagggag gagagctcc
2321 gtgagcacca ggctctgctg gacgagccct acctggaccg gctgccgggg cagaaggagg cgcacgcaca
2391 ggccggcgtg caggtgaagc aggagcccat tgagagcgat gaggagagg cagagcccc acgggaggtg
2461 gagccgggccc agcggccagc cagtgcagc gagctgctc tcagacagca agccctcctg ctggagcagc
2531 agcggatcca ccagctgagg aactaccagg cgtccatgga ggcgcgcggc atccccgtgt ccttggcgg
2601 ccacaggcct ctgtcccggg cgcagtoctc acccgcgtct gccaccttcc ccgtgtctgt gcaggagccc
2671 cccaccaagc cgaggttac gacagggctc gtgtatgaca cgctgatgct gaagcaccag tgcacctgcg
2741 ggagtagcag cagccacccc gagcagcgg ggaggatcca gagcatctg tcccgcctgc aggagacggg
2811 cctccggggc aaatgcgagt gcatccggcg acgcaaggcc acctggagg agtacagac ggtgactcg
2881 gaagcccaca cctcctgta tggcacgaac cccctcaacc ggcagaaact ggacagtaag aaacttctag
2951 gctcgctcgc ctccgtgttc gtccggctcc cttgcggtgg tgttggggtg gacagtgaca ccatatggaa
3021 cgaggtgcac tggcgggggg cagcccgcct ggctgtgggc tgctggttag agctggtctt caaggtggcc
3091 acaggggagc tgaagaatgg ctttctgtgt gtccgcccc ctggacacca tgcggaggag agcacgccc
3161 tgggcttttg ctacttcaac tccgtggccc tggcagcaa gcttctgcag cagaggttga gcgtgagcaa
3231 gatcctcatc gtggactggg acgtgcacca tggaaaacggg acccagcagg ctttctacag cgacctagc
3301 gtctgttaca tgtccctcca ccgctacgac gatgggaact tcttcccagg cagcggggct cctgatgagg
3371 tgggacacag gcccgcgctg ggtttcaacg tcaacatggc tttcaccggc ggcctggacc cccccatggg
3441 agacgctgag tacttggcgg ccttcagaac ggtggtcatg ccgatcgcca gcgagtttgc cccggatgtg
3511 gtgctggtgt catcaggctt cgatgccgtg gagggccacc ccaccctct tgggggctac aacctctccg
3581 ccagatgctt cgggtacctg acgaagcagc tgatgggctt ggctggcggc cggattgtcc tggccctcga
3651 gggaggccac gacctgaccg ccatttgcga cgctcggaa gcatgtgtt ctgccttgcg gggaaacgag
3721 cttgatcctc tcccagaaaa ggttttacag caaagacca atgcaaacgc tgtccgttcc atggagaaaag
3791 tcatggagat ccacagcaag tactggcgct gcctgcagcg cacaacctcc acagcggggc gttctctgat
3881 cgaggctcag acttgcgaga acgaagaagc cgagacggtc accgccatgg cctcgctgtc cgtgggctg
3951 aagcccgcg aaaagagacc agatgaggag cccatggaag aggagccgccc cctgtag...4412 nt...

```

**Abbildung 9. Nukleotidsequenz der HDAC4-cDNA.** Der längste zusammenhängende Leserahmen der KIAA0288-cDNA ist notiert. Start- und Stoppcodons sind unterstrichen.

### 3.1.2.2 HDAC5

Die Nukleotidsequenz eines durch Homologiesuche in der dbEST-Datenbank identifizierten Klons des I.M.A.G.E-Consortiums (Klon #1142916; Cariaso et al., 1999) zeigte am 5'-Ende hohe Homologie zur yHDA1-Sequenz (GenBank-Eintragung AA617796, siehe Tabelle 15, Abschnitt 3.1.1). Dieser Klon von 3249 nt Länge wurde von Research Genetics (Huntsville, USA) erhalten und beide DNA-Stränge sequenziert (UCSF Sequencing Core). Eine Computeranalyse ergab einen

durchgehenden Leserahmen bis zur Nukleotidposition 3168 des Klons #1142916. Da am 5'-Ende weder ein Stoppcodon noch ein geeignetes Startcodon gefunden wurde, wurde die erhaltene Sequenz mit den BAC-Klonen genomischer DNA von Chr. 17 (siehe Tabelle 15, Abschnitt 3.1.1) und mit der HDAC4-cDNA verglichen. Diese Computeranalyse führte zur Identifizierung eines hypothetischen ATG-Startcodons das colinear mit dem gefundenen Leserahmen war. Da dieses hypothetische Startcodon zudem in Sequenzen eingebettet war, die die Initiation der Translation begünstig-

```

1  atgaactctc ccaacgagtc ggatgggatg tcaaggctggg aaccatcctt ggaaatcctg ccgcggaactt
71 ctctgcacag catccctgtg acagtggagg tgaagccggg gctgccaaga gccatgcccc gttccatggg
141 ggggtgggggt ggaggcagcc ccagccctgt ggagctacgg ggggctctgg tgggctctgt ggacccca
211 ctgcegggagc agcaactgca gcaggagctc ctggcgctca agcagcagca gcagctgcag aagcagctcc
281 tgttcgctga gttccagaaa cagcatgacc acctgacaag gcagcatgag gtccagctgc agaagcacct
351 caagcagcag caggagatgc tggcagccaa gcagcagcag gagatgctgg cagccaagcg gcagcaggag
421 ctggagcagc agcggcagcg ggagcagcag cggcaggaag agctggagaa gcagcggctg gagcagcagc
491 tgctcatcct gcggaacaag gagaagagca aagagagtgc cattgccagc actgaggtaa agctgaggct
561 ccaggaattc ctcttgtcga agtcaaagga gccacacca ggcggcctca accattccct cccacagcac
631 cccaaatgct ggggagccca ccatgcttct ttggaccaga gttcccctcc ccagagcggc cccctggga
701 cgcctccctc ctacaaactg cctttgcctg ggcctacga cagtgcagac gacttcccc tccgaaaaac
771 agcctctgaa cccaacttga aagtgcgttc aaggctaaaa cagaaggtgg ctgagcggag aagcagctcc
841 ctccctgcgtc gcaaggatgg gactgttatt agcaccttca agaagagagc tgttgagatc acaggtgccg
911 ggcctggggg gtcgtccgtg tgtaacagcg caccgccctc cggccccagc tctccaaca gctcccacag
981 caccatcgct gagaatggct ttactggctc agtccccaac atccccactg atatgctccc tcagcacca
1051 gccctccctc tggacagctc ccccaaccag ttcagcctct acacgtctcc ttctctgccc aacatctccc
1121 tagggctgca gccacagctc actgtcacca actcacacct cactgcctcc ccgaagctgt cgacacagca
1191 ggagggccgag aggcaggccc tccagtcctt gcggcagggg ggcacgctga ccggcaagt catgagcaca
1261 tcctctattc ctggctgcct gctggcgctg gactggaggg gcgacggggag ccccacggg catgctccc
1331 tgctgcagca tgtgctgttg ctggagcagg cccggcagca gagcaccctc attgctgtgc cactccacgg
1401 gcagtccccca ctagtgcagg gtgaacgtgt ggcaccagc atgcggacgg taggcaagct cccggggcat
1471 cggccctga gccgcaactc gtcctcaccc ctgcccagca gtccccaggc cctgcagcag ctggctcatg
1541 aacaacagca ccagcagttc ctggagaagc agaagcagca gcagctacag ctgggcaaga tcctcaccia
1611 gacaggggag ctgcccagc agcccaccac ccaccctgag gagacagagg aggagctgac ggagcagcag
1681 gaggtcttgc tgggggaggg agccctgacc atgccccggg agggctccac agagagtgg agcacacagg
1751 aagacctgga ggaggaggac gaggaagagg atggggagga ggaggaggat tgcatccagg ttaaggacga
1821 ggagggcgag agtgggtgct agggggggcc cgacttgagg gagcctgggt ctggatacaa aaaactgttc
1891 tcagatgccc agcgcgtgca gcctttgca gtgtaccag gtgtaccag cgccctcag cctggccact
1961 aggcctggg cgttaccag tcctccctg ctgcccctgg gggcatgaag agcccccag accagccctg
2031 caagcacctc ttcaccacag gtgtggtcta cgacacgttc atgctaaagc accagtgcac gtgcgggaac
2101 acacacgtgc accctgagca tgctggccgg atocagagca tctggctccc gctgcaggag acagggcctg
2171 ttagcaagtg cgagcggatc cgagtgcgca aagccacgct agatgagatc cagacagtgc actctgaata
2241 ccacaccctg ctctatggga cctatcccct caaccggcag aagctagaca gcaagaagtt gctcggcccc
2311 atcagccaga agatgtatgc tgtgctgctt tgtgggggca tgggggtgga cagtgcacac gtgtggaatg
2381 agatgcactc ctccagtgct gtgcgcatgg cagtggctg cctgctggag ctggccttca agtggtgctg
2451 aggagagctc aagaatggat ttgccatcat cggcccccca ggacaccacg ccgaggaatc cacagccatg
2521 ggattctgct tcttcaactc tgtagccatc accgcaaac tcctacagca gaagtgaac gtgggcaagg
2591 tcctcatcgt ggactgggac attcaccatg gcaatggcac ccagcaggcg ttctataatg acccctctgt
2661 gctctacatc tctctgcatc gctatgacaa cgggaacttc tttccaggct ctggggctcc tgaagaggtt
2731 ggtggaggac caggcgtggg gtacaatgtg aacgtggcat ggacaggagg tgtggacccc cccattggag
2801 acgtggagta ccttacagcc ttcaggacag ttggtgatgcc cattgcccac gagttctcac ctgatgtggt
2871 cctagtctcc gccgggtttg atgctgttga aggacatctg tctcctctg ttctcctctg tgtcaccgcc
2941 agatgttttg gccacttgac caggcagctg atgacctgg cagggggccg ggtggtgctg gcctggagg
3011 gaggccatga ctgaccgcc atctgtgatg cctctgaggc ttgtgtctcg gctctgctca gtgtagagct
3081 gcagcccttg gatgaggcag tcttcagcga aaagcccaac atcaacgcag tggccaagct agagaaagt
3151 atcagatcc agagcaaaac ctggagctgt gtgcagaagt tcgccgctgg tctgggcccg tcctggcag
3221 aggcccaagc aggtgagacc gaggaggccg agactgtgag cgcctggccc tctgctgctg tgggggcccga
3291 gcagggcccag gctgcggcag cccgggaaca cagccccagg ccggcagagg agcccatgga gcaggagcct
3361 gccctgga...81 nt...

```

**Abbildung 10. Nukleotidsequenz der HDAC5-cDNA.** Der längste zusammenhängende Leserahmen der klonierten cDNA ist notiert. Start- und Stoppcodons sind unterstrichen.

en (Kozak, 1991), war anzunehmen, daß es sich dabei um die gesuchte ATG-Sequenz handelte. Um die fehlenden 201 nt dieses hypothetischen Leserahmens zu rekonstruieren, wurde ein Fragment von 741 bp über PCR mit spezifischen Oligonukleotiden aus einer HeLa-Zellen-cDNA-Bibliothek amplifiziert (beginnend mit dem angenommenen Startcodon und bis zu Nukleotidposition 539 der Sequenz von Klon #1142916). Sowohl Klon #1142916 als auch das neu-amplifizierte Fragment wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut (schneidet an Nukleotidposition 364 von Klon #1142916) und anschließend über diese gemeinsame Schnittstelle fusioniert. Der auf diese Weise erhaltene Leserahmen der HDAC5-cDNA umfaßt 3369 nt (Abbildung 10), was einem Polypeptid von 1122 aa mit einem theoretischen Molekulargewicht von 122 kDa entspricht. Er codiert für ein funktionelles Polypeptid (siehe Abschnitt 2.6.8) und wurde unabhängig von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (GenBank-Eintragung NM005474; Grozinger und Schreiber, 2000). Zudem besteht große Ähnlichkeit zu einer murinen cDNA (mHDA1; Verdel und Khochbin, 1999).

### 3.1.2.3 HDAC6

Die Computeranalyse ergab, daß die Sequenz der GenBank-Eintragung AJ011972 alle Fragmente der "HDAC6"-Gruppe enthielt. Die AJ011972 entsprechende "Transcription Map in Xp11.23" (Strom et al, nicht veröffentlicht) wies zudem einen durchgehenden Leserahmen von 3648 nt mit einer die Initiation der Translation begünstigenden Umgebung des angenommenen ATG-Startcodons auf (Abbildung 11). Interessanterweise wurden zwei separate Regionen mit Homologie der für die Homologiesuche eingesetzten yHDA1-Domäne in dieser Sequenz gefunden. In mehreren Versuchen unter unterschiedlichen PCR-Bedingungen gelang es nicht, eine cDNA entsprechend des vollen Leserahmens von HDAC6 direkt aus einer HeLa-Zellen-cDNA-Bibliothek zu amplifizieren. Daher wurden überlappende Fragmente (Nukleotidpositionen 1–1464 und 1225–3648) mit entsprechenden Oligonukleotiden aus derselben Bibliothek amplifiziert. Die beiden erhaltenen Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *DraIII* verdaut (schneidet an Nukleotidposition 1240 des HDAC6-Leserahmens) und anschließend über diese gemeinsame Schnittstelle fusioniert. Die Sequenzierung des auf diese Weise erhaltenen HDAC6-cDNA-



Klons ergab vollständige Übereinstimmung mit der in der GenBank-Eintragung AJ011972 gefundenen Nukleotidssequenz (Abbildung 11). Der HDAC6-Leserahmen entspricht einem Polypeptid von 1214 aa mit einem theoretischen Molekulargewicht von 131 kDa und wurde unabhängig von genomischen Sequenzen auf dem X-Chromosom abgeleitet (GenBank Eintragung NM 006044, “*Human Genome Project*”).

```

1  atgacctcaa cgggccagga ttccaccaca accaggcagc gaagaagtag gcagaacccc cagtgcgccc
71  ctcaggactc cagtgtcact tcgaagcgaa atattaaaaa gggagccggt ccccgcctcta tccccaatct
141 agcggaggta aagaagaaa gcaaaatgaa gaagctcggc caagcaatgg aagaagacct aatcgtggga
211 ctgcaaggga tggatctgaa ccttgaggct gaagcactgg ctggcactgg cttggtgttg gatgagcagt
281 taaatgaatt ccattgcctc tgggatgaca gcttcccgga aggccctgag cggctccatg ccatcaagga
351 gcaactgatc caggagggcc tcctagatcg ctgcgtgtcc tttcaggccc ggtttgctga aaaggaagag
421 ctgatgttgg ttcacagcct agaatatatt gatctgatgg aaacaaccca gtacatgaa gagggagaac
491 tccgtgtcct agcagacacc tacgactcag tttatctgca tccgaactca tactctgtg cctgcctggc
561 ctcaggctct gtctcaggc tgggtggatg ggtcctgggg gctgagatcc ggaatggcat ggccatcatt
631 aggcctcctg gacatcacgc ccagcacagt cttatggatg gctattgcat gtccaaccac gtggctgtgg
701 cagcccgcta tgctcaacag aaacaccgca tccggagggt ccttatcgta gattgggatg tgaccacagg
771 tcaaggaaca cagttcacct tcgaccagga ccccagtgc ctctatttct ccattccaccg ctacgagcag
841 ggtaggttct gggcccacct gaaggcctct aactggtcca ccacaggttt cggccaaggc caaggatata
911 ccatcaatgt gccttggaac cagggtggga tgcgggatgc tgactacatt gctgctttcc tgcagctcct
981 gctgccagtc gccctcgagt tccagcctca gctggctctg gtggctgctg gatttgatgc cctgcaaggg
1051 gacccaagg gtgagatggc cgccactcgg gcaggggtcg cccagctaac ccacctgctc atgggtctgg
1121 caggaggcaa gctgatcctg tctctggagg gtggctacaa cctccgccc ctggctgaag cggctcagtc
1191 ttcgctccac acccttctgg gagacccttg ccccatgtcg gagtcaacct gtgccccctg ccggagtgcc
1261 caggctcag tttcctgtgc tctggaagcc cttgagccct tctggagggt tcttgtgaga tcaactgaga
1331 ccgtggagag ggacaacatg gaggaggaca atgtagagga gagcgaggag gaaggaccct gggagcccc
1401 tgtgctccca atcctgacat ggccagtgtc acagtctcgc acagggctgg tctatgacca aaatatgatg
1471 aatcaactgca acttgtggga cagccaaccac cctgaggtac cccagcgcac ctgcggatc atgtgccctc
1541 tggaggagct gggccttggc gggcgctgcc tcaccctgac accgcgccct gccacagagg ctgagctgct
1611 cacctgtcac agtgctgagt acgtgggtca tctccggccc acagagaaaa tgaaaacccg ggagctgcac
1681 cgtgagagtt ccaactttga ctccatctat atctgcccga gtaccttgcg ctgtgcacag cttgccactg
1751 gcgctgcctg cgcctggtg gaggctgtgc tctcaggaga ggtctgaaat ggtgctgctg ggtgctcc
1821 cccaggacac cacgcagagc aggatgcagc ttgcggtttt tgctttttca actctgtggc tgtggctgct
1891 cgccatgccc agactatcag tgggcatgcc ctacggatcc tgatgtgga ttgggatgtc caccacggta
1961 atggaactca gcacatgttt gaggatgacc ccagtgtgct atatgtgtcc ctgcaccgct atgatcatgg
2031 caccttcttc cccatggggg atgaggggtg cagcagccag atcggccggg ctgcccggac aggcttcacc
2101 gtcaacgtgg catggaacgg gccccgcctg ggtgatgctg gcccagacca tttctgagc tgccctggctc
2171 ttcccattgc ctacgagttt aaccacagaac tgggtgctggt ctcagctggc tttgatgctg cacgggggga
2241 tccgctgggg ggctgccagg tgtcacctga gggttatgcc cacctcacc acctgctgat gggccttggc
2311 agtggccgca ttatccttat cctagagggt ggctataacc tgacatccat ctcagagctc atggctgctc
2381 gcaactgcct cctccttggg gaccaccac cctgctgac cctgccacgg ccccactat cagggcccct
2451 ggcctcaate actgagacca tccaagtcca tcgcagatac tggcgcagct tacgggtcat gaaggtagaa
2521 gacagagaag gacctccag ttctaagttg gtcaccaaga aggcaccca accagccaaa cctaggttag
2591 ctgagcggat gaccacacga gaaaagaagg ttctggaagc aggcattggg aaagtacct cggcatcatt
2661 tggggaagag tccactccag gccagactaa ctcagagaca gctgtgggtg cctcactca ggaccagccc
2731 tcagaggcag ccacaggggg agccactctg gcccagacca tttctgagc agccattggg ggagccatgc
2801 tgggcccagac cacctcagag gaggctgtgc ggggagccac tccggaccag accacctcag aggagactgt
2871 gggaggagcc attctggacc agaccacctc agaggatgct gttgggggag ccacgctggg ccagactacc
2941 tcagaggagg ctgtaggagg agctacactg gccagacca cctcggaggc agccatggag ggagccacac
3011 tggaccagac tacgtcagag gaggctccag ggggcaccga gctgatccaa actcctctag ctccagcac
3081 agaccaccag acccccccaa cctcacctgt gcagggaaact acaccccaga tatctcccag tacctgatt
3151 gggagtctca ggaccttggg gctaggcagc gaatctcagg gggcctcaga atctcaggcc ccaggagagg
3221 agaacctact aggagaggca gctggaggtc aggacatggc tgattcgatg ctgatgcagg gatctagggg
3291 cctcactgat caggccatat tttatgctgt cacaccactg cctgggtgtc cccatttggg ggcagtatgc
3361 cccatacctg cagcaggcct agacctgacc gaacctgtg caaccttggg gggactgtgg gagaattggg
3431 tgtgtctctc ttgctatcag gtctactgtg gtgcttacct caatggccac atgctccaac accatggaaa
3501 ttctggacac ccgctggctc tcagctacat cgacctgtca gcctgggtgt actactgtca ggctatgtc
3571 caccaccagg ctctcctaga tgtgaagaac atcgcccacc agaacaagtt tggggaggat atgccccacc
3641 cacactaa

```

**Abbildung 11. Nukleotidsequenz der HDAC6-cDNA.** Die klonierte cDNA entspricht dem Leserahmen von HDAC6. Start- und Stoppcodons sind unterstrichen.

### 3.1.2.4 HDAC7

Die "HDAC7"-Gruppe an Sequenzen enthielt bei weitem am wenigsten dbEST-Klone, woraus geschlossen wurde, daß es sich um einen relativ seltenen Faktor handeln könnte. Außerdem konnte kein dbEST-Klon >1000 nt identifiziert werden. Computeralgorithmen, die in der Lage sind, die Grenzen von Exons und Introns vorherzusagen (Genscan; Burge und Karlin, 1997 und GenFinder; Solovyev und Salamov, 1997), ermöglichten es, die Sequenz einer hypothetischen mRNA von der auf 12q31 liegenden genomischen Sequenz abzuleiten. Dabei wurden die Ergebnisse der Computeralgorithmen anhand von Vergleichen mit den abgeleiteten Sequenzen von HDAC4, HDAC5 und HDAC6 sowie der wenigen HDAC7-dbEST-cDNA-Sequenzen verfeinert. In vielfachen Versuchen gelang es nicht, eine entsprechende cDNA mittels PCR direkt aus einer HeLa-Zellen-cDNA-Bibliothek zu amplifizieren. Deshalb wurde versucht, zunächst kürzere, überlappende Fragmente zu klonieren. Oligonukleotidpaare, welche die Nukleotidpositionen 216-1676 sowie 1527-2954 (siehe Abbildung 12) einrahmten, erlaubten schließlich eine Amplifizierung derartiger Fragmente. Die erhaltenen Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *BclI* verdaut (schneidet an Nukleotidposition 1255 der in Abbildung 12 gezeigten HDAC7-cDNA-Sequenz) und über diese gemeinsame Schnittstelle fusioniert. Anschließend wurden beide DNA-Stränge sequenziert (UCSF Sequencing Core). Um sicherzustellen, daß der erhaltene cDNA-Klon einen vollständigen Leserahmen enthielt, wurden sowohl die 5'- als auch die 3'-UTR mittels einseitig verankerter PCR ("*rapid Amplifikation of cDNA Ends*", RACE) amplifiziert. Mit dieser Technik konnte neben einem 3'-Fragment von 1132 nt ein 5'-Fragment von 215 nt erhalten werden (Dr. Franck Dequiedt, Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California, San Francisco, USA; persönliche Mitteilung). Da ein Stoppcodon im gleichen Leseraster der hypothetisch für HDAC7 codierenden cDNA gefunden wurde, ist davon auszugehen, daß der in Abbildung 12 gezeigte Leserahmen tatsächlich HDAC7 entspricht. Dieser Leserahmen von 2739 nt codiert für ein Polypeptid von 912 aa (zwischen Nukleotidposition 216 und 3074, theoretisches Molekulargewicht 99 kDa, Abbildung 12) und wurde in die GenBank eingetragen (NM006596).

```

...215 nt...atgga cctgcggggtg ggccagcggc cccagtgga
251 gccccacca gagccacat tgctggccct gcagcgtccc cagcgcctgc accaccacct ctctctagca
321 ggcctgcagc agcagcgtc ggtggagccc atgaggctct ccatggacac gccgatgccc gatttgacag
391 tgggacccca ggaacaagag ctgcggcagc ttctccacaa ggacaagagc aagcgaagtg ctgtagccca
461 cagcgtggtc aagcagaagc tagcggaggt gattctgaaa aaacagcagg cggccctaga aagaacagtc
531 catcccaaca gccccggcat tccctacaga accctggagc ccctggagac ggaaggagcc acccgctcca
601 tgctcagcag ctttttgcct cctgttccca gcctgccccag tgacccccca gagcacttcc ctctgcgcaa
671 gacagctctc gagcccaacc tgaagctgcg ctataagccc aagaagtccc tggagcggag gaagaatcca
741 ctgctccgaa aggagagtgc gccccccagc ctccggcggc ggcccgcaga gaccctcgga gactcctccc
811 caagtagtag cagcacgccc gcatcagggt gcagctcccc caatgacagc gagcacggcc ccaatcccat
881 cctgggctcg gaggcgctct tgggcccagc gctgcggctg caggagactt ctgtggcccc gttcgccttg
951 ccgacagtgt ccttgctgcc cgcaatcact ctggggctgc ccgcccctgc cagggctgac agtgaccgca
1021 ggaccatcc gactctgggc cctcgggggc caatcctggg gagccccac actccctct tctgccccca
1091 tggcttgagg cccgaggctg ggggacacct gccctctcgc ctgcagccca ttctctctct ggaccctca
1161 ggctctcatg cccgctgct gactgtgccc gggcttgggc ccttgcccct ccactttgcc cagtcttaa
1231 tgaccaccca gcggtctctt gggctcaggcc tccactggcc actgagccgg actcgtcag agccccctgc
1301 cccagtgccc accgctcccc caccgcccgg ccccatgcag ccccgctgg agcagctcaa aactcacgctc
1371 caggtgatca agaggtcagc caagccgagt gagaagcccc ggctgcggca gatacctcg gctgaagacc
1441 tggagacaga tggcggggga ccgggcccagg tggtagcaga tggcctggag cacagggagc tgggcatgg
1511 gcagcctgag gccagaggcc ccgctcctct ccagcagcac cctcaggtgt tgctctggga acagcagcga
1581 ctggctgggc ggctcccccg gggcagcacc ggggacactg tgctgcttcc tctggcccag ggtgggcacc
1651 ggcctctgtc ccgggctcag tcttccccag cgcacactgc ctcactgtca gccccagagc ctgccagcca
1721 ggcccagatc ctctccagct cagagacccc tgccaggacc ctgcccctca ccacagggct gatctatgac
1791 tcggtcatgc tgaagcacca gtgctcctgc ggtgacaaca gcaggcacc ccagcagcgc gcccgcatcc
1861 agagcatctg gtcccggctg caggagcggg ggtcccggag ccagtgtgag tgtctccgag gccggaaggc
1931 ctccctggaa gagctgcagt cggtcacct tgagcggcac gtgctctct acggcaccaa cccgctcagc
2001 cgcctcaaac tggacaacgg gaagctggca gggctcctgg cacagcggat gtttgtgat ctgcccctgtg
2071 gtggggttgg ggtggacact gacaccatct ggaatgagct tcatctctcc aatgcagccc gctgggcccgc
2141 tggcagtgtc actgacctcg ccttcaaagt ggttctctct gagctaaaga atggtttcgc tgtggtgagg
2211 cccccaggac accatgcaga tcattcaaca gccatgggct tctgcttct caactcagtg gccatcgct
2281 gccgagcagt gcaacagcag agcaaggcca gcaagatcct cattgtagac tgggacgtgc accatggcaa
2351 cggcaccag caaaccttct accaagaccc cagtgtgctc tacatctccc tgcatcgcca tgacgagggc
2421 aacttcttcc cggggagtgg ggctgtggat gaggtagggg ctggcagcgg tgagggctt aatgtcaatg
2491 tggcctgggc tggaggtctg gaccccccca tgggggatcc tgagtacctg gctgcttca ggatagctgt
2561 gatgcccat gcccgagagt tctctccaga cctagtcctg gtgtctgctg gatttgatgc tgcaggggt
2631 caccggccc cactgggtgg ctaccatggt tctgcccatt gtttggata catgacgcag caactgatga
2701 acctggcagg aggcgcagtg gtgctggcct tggagggtgg ccatgacctc acagccatct gtgagcctc
2771 tgaggcctgt gtggctgctc ttctgggtaa cagggtggat cccctttcag aagaaggctg gaacagaaa
2841 cccaacctca atgcatccg ctctctggag gccgtgatcc ggggtgcacag taaatactgg ggtgcatgc
2911 agcgctggc ctctgtcca gactcctggg tgcctagagt gccaggggct gacaaagaag aagtggaggc
2981 agtgaccgca ctggcgtccc tctctgtggg catcctggct gaagataggc cctcggagca gctggtggag
2951 gaggaagaac ctatgaatct ctaa...1132 nt...

```

**Abbildung 12. Nukleotidsequenz der HDAC7-cDNA.** Der längste zusammenhängende Leserahmen der klonierten cDNA ist notiert. Start- und Stoppcodons sind unterstrichen.

### 3.1.3 Sequenzanalyse humaner Proteine mit Homologie zu yHDA1

Abbildung 13 zeigt die schematische Struktur der klonierten humanen Faktoren mit Homologie zu yHDA1. HDAC4, HDAC5 und HDAC7 sind ähnlich aufgebaut. Eine Region von ca. 450 aa mit großer Ähnlichkeit zur Primärsequenz der für die Datenbanksuche eingesetzten yHDA1-Domäne befindet sich in Nähe des C-Terminus. Davor befinden sich N-terminale Regionen unterschiedlicher Länge (460 aa in HDAC7 bis 670 aa in HDAC5). Der schematische Aufbau von HDAC6 hingegen unterscheidet sich signifikant von HDAC4, HDAC5 und HDAC7. HDAC6 weist zwei Domänen in Serie mit Ähnlichkeit zu yHDA1, gefolgt von einer C-terminalen Region

von ca. 300 aa auf. Die von yHDA1 abgeleiteten Domänen der neu klonierten Proteine sind zur entsprechenden Sequenz in yHDA1 zu ca. 60% homolog. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit dieses Sequenzmotifs wurden HDAC4, HDAC5, HDAC6 und HDAC7 zu einer neuen Klasse II humaner HDACs zusammengefaßt (Fischle et al., 1999; Grozinger et al., 1999).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der C-terminalen Domänen von HDAC4, HDAC5 und HDAC7 ergibt einen sehr hohen Grad an Konservierung (79-82%, Tabelle 16, Abbildung 14). Die N-terminalen Regionen dieser Proteine sind einander hingegen weitaus weniger ähnlich (31-45%, Tabelle 16). Während einige kürzere Sequenzblöcke relativ stark konserviert sind, ist die Homologie der zwischen diesen liegenden Regionen relativ gering (Abbildung 14). Über Suchen in unterschiedlichen Datenbanken von Proteindomänen und Sequenzmotifen konnten keine Hinweise auf die etwaige Funktionen dieser konservierten Sequenzblöcke erhalten werden. Interessanterweise zeigt jedoch ein im Zusammenhang mit der Regulierung der Differenzierung von Myocyten zunächst in *Xenopus* (xMITR; Sparrow et al., 1999) und später in humanen Zelllinien (hMITR; Zhou et al., 2000) klonierter Faktor eine relativ hohe Gesamthomologie zu den N-terminalen Regionen von HDAC4, HDAC5 und HDAC7 auf (33-47%, Tabelle 16).





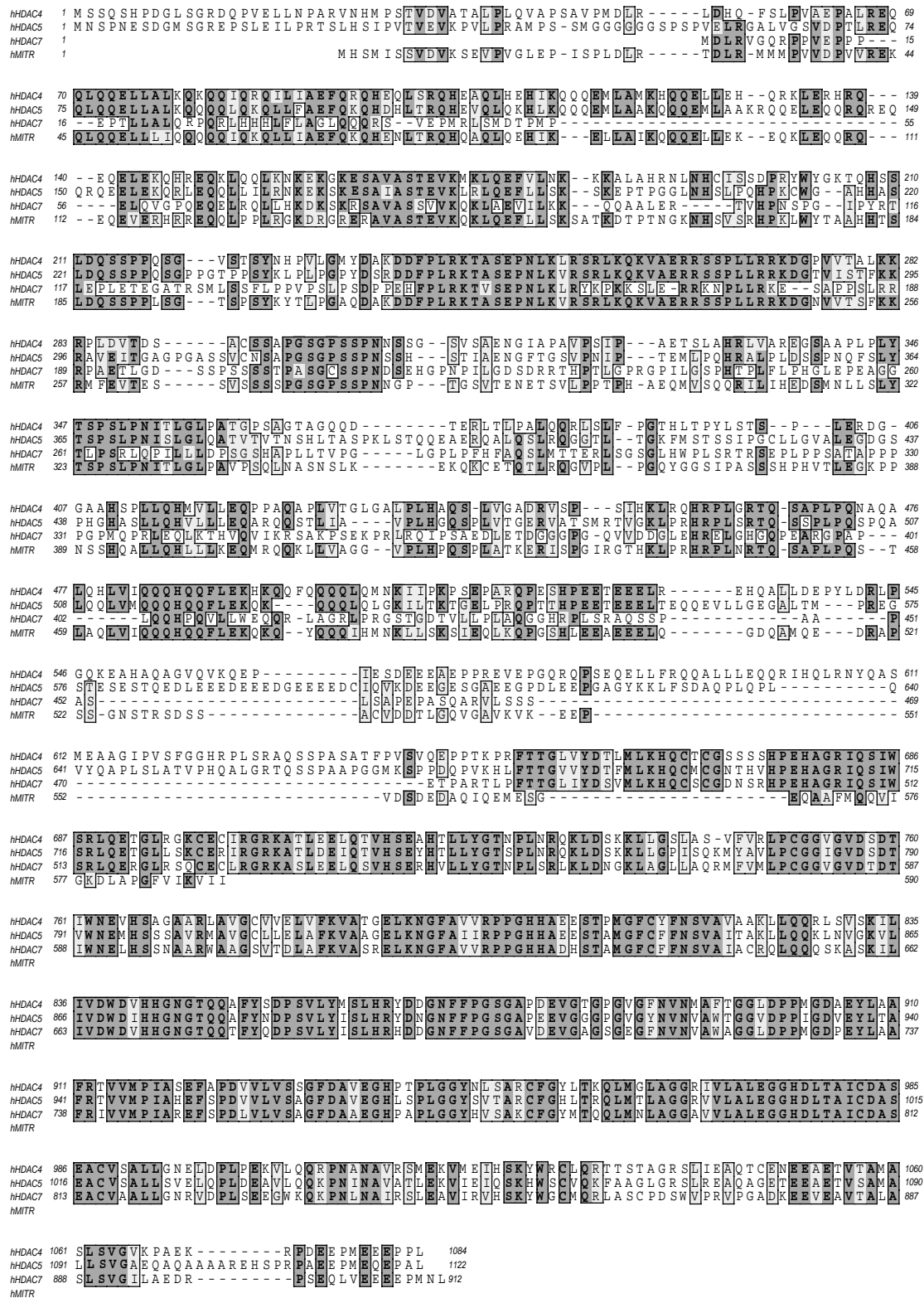
HDAC	Schematischer Aufbau	Aminosäuren	Referenz
HDAC4		1084	Fischle et al, 1999 Grozinger et al, 1999 Miska et al, 1999 Wang et al, 1999
HDAC5		1122	Fischle et al, 1999 Grozinger et al, 1999 Miska et al, 1999 Verdel et al, 1999 Wang et al, 1999
HDAC7		912	Kao et al, 2000 Fischle et al, in Vorbereitung
HDAC6		1215	Grozinger et al, 1999 Miska et al, 1999 Verdel et al, 1999 Wang et al, 1999

Abbildung 13. Schematischer Aufbau der humanen HDACs der Klasse II.



**Abbildung 14. Vergleich der Aminosäuresequenzen von HDAC4, HDAC5, HDAC7 und hMITR.** Identische Aminosäuren sind dunkel, ähnliche Aminosäuren hell unterlegt. Regionen, die in mindestens drei der vier Proteine konserviert sind, sind eingerahmt. Der Sequenzvergleich wurde mit dem ClustalW-Algorithmus erstellt (Eddy, 1995). hMITR/HDLP zeigt hohe Homologie zur N-terminalen Region der HDACs Klasse II, besitzt jedoch selbst keine HDAC-Domäne (Gesamtprotein 586 aa).

**Tabelle 16. Vergleich der Primärstrukturen der HDACs der Klasse II.**

	<b>HDAC4 N-Terminus (aa 1-662)</b>	<b>HDAC5 N-Terminus (aa 1-690)</b>	<b>HDAC7 N-Terminus (aa 1-487)</b>	<b>hMITR/ HDLP<sup>b</sup></b>
<b>HDAC5 N-Terminus (aa 1-690)</b>	45% <sup>a</sup>	—	36%	46%
<b>HDAC7 N-Terminus (aa 1-487)</b>	31%	36%	—	33%
<b>hMITR/ HDLP</b>	47%	46%	33%	—

	<b>HDAC4 C-Terminus (aa 612-1084)</b>	<b>HDAC5 C-Terminus (aa 648-1122)</b>	<b>HDAC7 C-Terminus (aa 438-912)</b>
<b>HDAC5 C-Terminus (aa 648-1122)</b>	82%	—	79%
<b>HDAC7 C-Terminus (aa 438-912)</b>	81%	79%	—

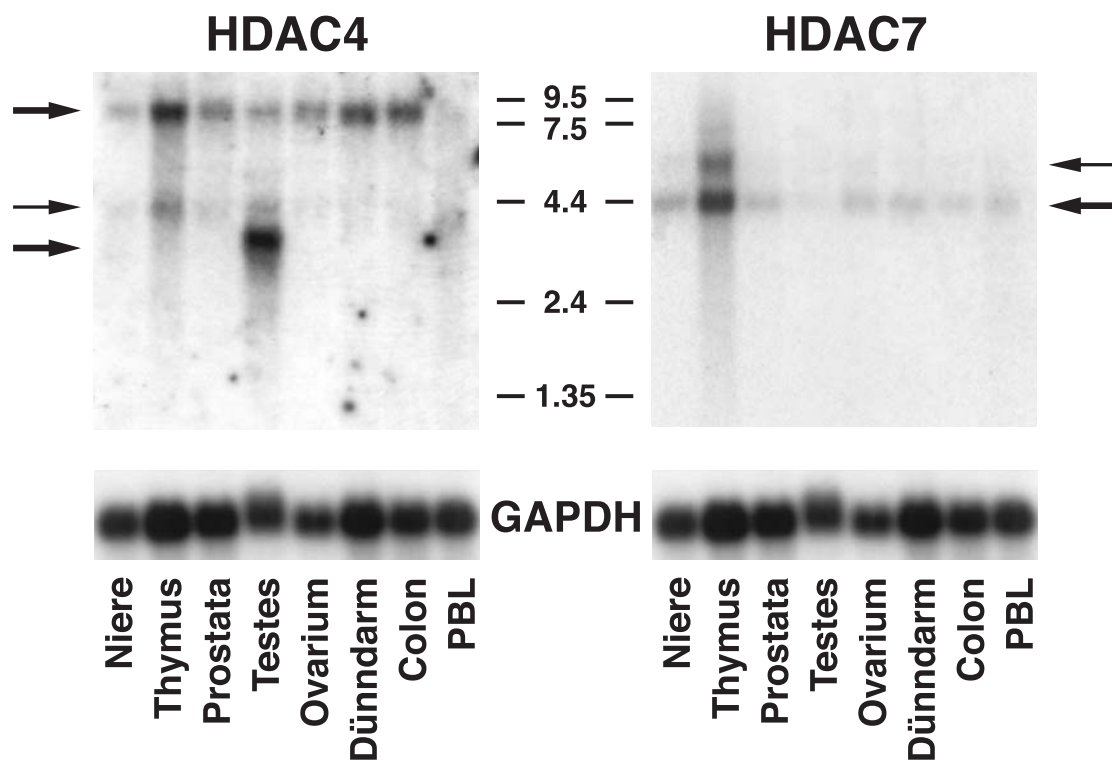
<sup>a</sup> Alignments wurden mit dem ClustalW-Algorithmus erstellt und entsprechend prozentuale Homologiewerte abgeleitet.

<sup>b</sup> hMITR/HDLP zeigt hohe Homologie zur N-terminalen Region der HDACs der Klasse II, besitzt jedoch selbst keine HDAC-Domäne (Gesamtprotein 586 aa).

### **3.2 Untersuchung der Expression von HDAC4 und HDAC7 in unterschiedlichen Geweben**

Die Bestimmung des Expressionsmusters von HDAC4 und HDAC7 wurde anhand von Northern Blots mit mRNAs verschiedener humaner Gewebe durchgeführt (Abbildung 15). Eine Membran, auf die standardisierte Mengen von mRNAs verschiedener humaner Zelltypen und Organe nach Agarose-Gelelektrophorese mittels Northern Transfer gebロットet waren, wurde mit <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Sonden ent-

sprechend HDAC4 oder HDAC7 hybridisiert. Nach dem Waschen der Membran erfolgte die Auswertung mittels  $^{32}\text{P}$ -Autoradiographie. Zur Kontrolle wurde dieselbe Membran mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten cDNA-Sonde des konstitutiv in allen Geweben und Organen nahezu gleichmäßig exprimierten Enzyms GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) hybridisiert. Die vergleichbare Intensität des Signals für GAPDH in den unterschiedlichen Geweben zeigte, daß sich die aufgetragenen mRNA-Mengen nicht wesentlich unterschieden (Abbildung 15). Mit der HDAC4-Sonde wurde eine mRNA von 8,4 kb in allen untersuchten Gewebetypen (Niere, Thymus, Prostata, Testes, Ovarien, Dünndarm, Colon, periphere Leukozyten) nachgewiesen (Abbildung 15). Die Größe dieser mRNA stimmte relativ gut mit der Länge



**Abbildung 15. Untersuchung der Gewebe-spezifischen Expression von HDAC4 und HDAC7.** Northern Blot-Analyse wurde mit mRNAs von verschiedenen humanen Geweben durchgeführt. Als Kontrolle ist die Hybridisierung zu humaner GAPDH gezeigt. HDAC4, der dicke Pfeil deutet auf die HDAC4-mRNA; eine weitere Bande in Testes und eine schwächere Bande, bei der es sich vermutlich um ein Abbauprodukt handelt, sind ebenfalls markiert; HDAC7, der dicke Pfeil deutet auf die HDAC7 mRNA, eine weitere mRNA, die vermutlich durch alternatives "Splicing" entsteht, ist ebenfalls indiziert. Die Positionen von Molekulargewichtsstandards (kb) sind zwischen den beiden Blots angezeigt. PBL, Periphere Leukozyten.

der klonierten HDAC4-cDNA von 8459 nt überein. Eine schwächere Bande entsprechend 4,2 kb, die in einigen der untersuchten Gewebe nachgewiesen wurde, könnte durch enzymatischen Abbau der HDAC4-mRNA entstanden sein. Die Expression von HDAC4 ist offensichtlich nicht in allen Geweben gleich. Thymus, Dünndarm und Colon enthielten am meisten HDAC4-mRNA. Darüber hinaus wurde in Testes eindeutig eine kürzere HDAC4-mRNA von 3,4 kb nachgewiesen. Niere, Prostata und Ovarien wiesen eine mittelmäßige und periphere Leukozyten eine sehr schwache HDAC4-Expression auf.

Die Auswertung des HDAC7-Northern Blots ergab eine mRNA von 4,4 kb in allen untersuchten Gewebetypen (Abbildung 15). Diese mRNA war etwas länger als die klonierte cDNA von 4086 nt, was darauf schließen läßt, daß nicht die vollständige 5'-UTR der HDAC7-mRNA kloniert wurde. Die Expression von HDAC7 war dabei im Thymus um ein Vielfaches höher als in allen anderen untersuchten Gewebetypen. Eine schwächere Bande von 6,0 kb, die vor allem im Thymus nachgewiesen wurde, könnte auf ein differentielles "Splicing" von HDAC7-mRNAs hinweisen.

### **3.3 Immunfluoreszenzuntersuchungen von HDACs der Klasse II**

Die Untersuchung der subzellulären Verteilung der HDACs der Klasse II wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Hendzel (Cross Cancer Institute, University of Alberta, Canada) mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

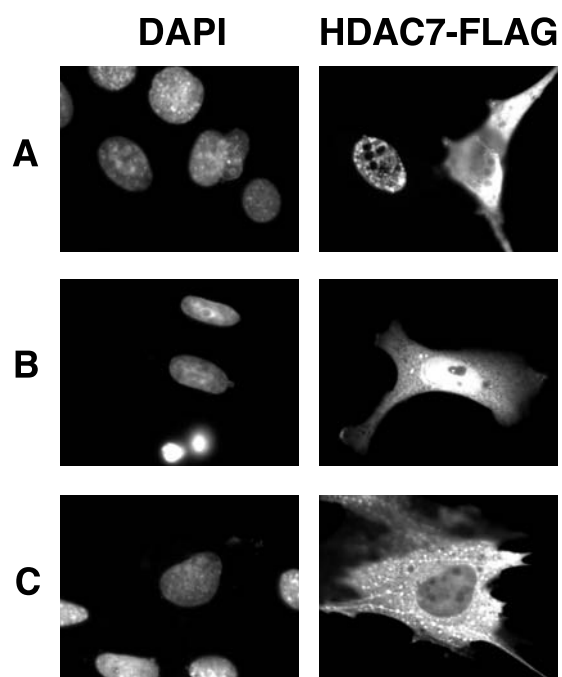
#### **3.3.1 Subzelluläre Lokalisation von HDAC7**

Um die subzelluläre Lokalisation des HDAC7-Proteins zu bestimmen, wurde ein Plasmid, das die Expression eines Fusionsproteins von HDAC7 mit einem C-terminalen FLAG-Epitop steuert, in unterschiedliche Zelllinien (HISM, SKN, HeLa, 10T1/2, 293 und COS7) transfiziert. Nach der Fixierung der Zellen, erfolgte der Nachweis des transient exprimierten Fusionsproteins über ein für das FLAG-Epitop spezifisches monoklonales Antiserum. Die Fluoreszenz eines Farbstoffs, der über ein



sekundäres *Anti-Maus-Antiserum* an die primären *Anti-FLAG-Antikörper* gebunden wurde, zeigte HDAC7 in den meisten Zelllinien und in der Mehrheit der untersuchten Zellen im Zellkern (Abbildung 16A und weitere, nicht gezeigte). In einem Bruchteil der untersuchten Zellen wurde das HDAC7-FLAG-Fusionsprotein jedoch sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma gefunden (Abbildung 16B). In einigen wenigen Zellen wurde HDAC7 sogar ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen (Abbildung 16C). Die relative Häufigkeit der Zellen, in denen HDAC7 ausschließlich im Zellkern, gleichzeitig im Zellkern und im Zytoplasma oder ausschließlic h im Zytoplasma gefunden wurde, war von Zelllinie zu Zelllinie verschieden (Tabelle 17). In Cos7-Zellen zum Beispiel wurde HDAC7 nur im Zellkern gefunden, wohingegen lediglich 60% der transfizierten 10T1/2-Zellen HDAC7 ausschließlich im Zellkern zeigten. Unterschiede in der relativen Expressionsstärke des Fusionsproteins in diesen Zelllinien (10T1/2>HISM>SKN>Cos7) deuten darauf hin, daß eine zytoplasmatische Lokalisation von HDAC7 durch hohe Expression begünstigt oder gar hervorgerufen wird.

Die Beobachtung, daß HDAC7 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma gefunden wurde, könnte darauf hinweisen, daß dieses Protein unter physiologischen Bedingungen zwischen diesen beiden Kompartimenten ausgetauscht wird. Vorläufige Versuche mit Leptomycin B, einem aus Schimmelpilzen aufgereinigten Toxin, das den



**Abbildung 16. Untersuchung der subzellulären Verteilung von HDAC7.** HDAC7-FLAG wurde transient in HISM-Zellen transfiziert. Zur Markierung der DNA im Zellkern wurde mit dem Farbstoff DAPI gefärbt. Die Analyse der subzellulären Verteilung des Fusionsproteins erfolgte mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie (HDAC7-FLAG). A, B und C entsprechen verschiedenen subzellulären Verteilungen des HDAC7-FLAG-Fusionsproteins (A, im Zellkern sowie im Zellkern und gleichzeitig im Zytoplasma; B, im Zellkern und gleichzeitig im Zytoplasma; C, ausschließlich im Zytoplasma).

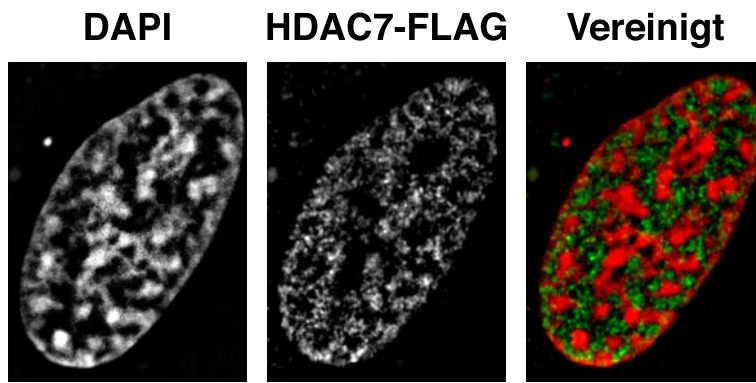
Proteinexport von Faktoren aus dem Zellkern blockiert (Yoshida und Horinouchi, 1999), ergaben eine nahezu vollständige Umverteilung von HDAC7 mit ausschließlicher Lokalisation im Zellkern (Abbildungen nicht gezeigt und Dr. Michael Hendzel, Cross Cancer Institute, University of Alberta, Canada; persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse stimmen mit einem dynamischen Austausch des HDAC7-Proteins zwischen Zellkern und Zytoplasma überein.

**Tabelle 17. Relative subzelluläre Verteilung von HDAC7-FLAG in unterschiedlichen Zelllinien.**

Zelllinie	10T1/2	HISM	SKN	Cos7	<sup>a</sup> Die subzelluläre Verteilung eines HDAC7-FLAG-Fusionsproteins wurde, wie in Abbildung 16 beschrieben, mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (konfokal) untersucht und statistisch für eine größere Anzahl an transfizierten Zellen ausgewertet.
Zellkern (Zk)	60.3% <sup>a</sup>	91.5%	93.4%	100%	
Zytoplasma (Zyt)	7.8%	1.7%	0%	0%	
Zk+Zyt	31.9%	6.8%	6.6%	0%	
Zellen gezählt	232	176	151	180	

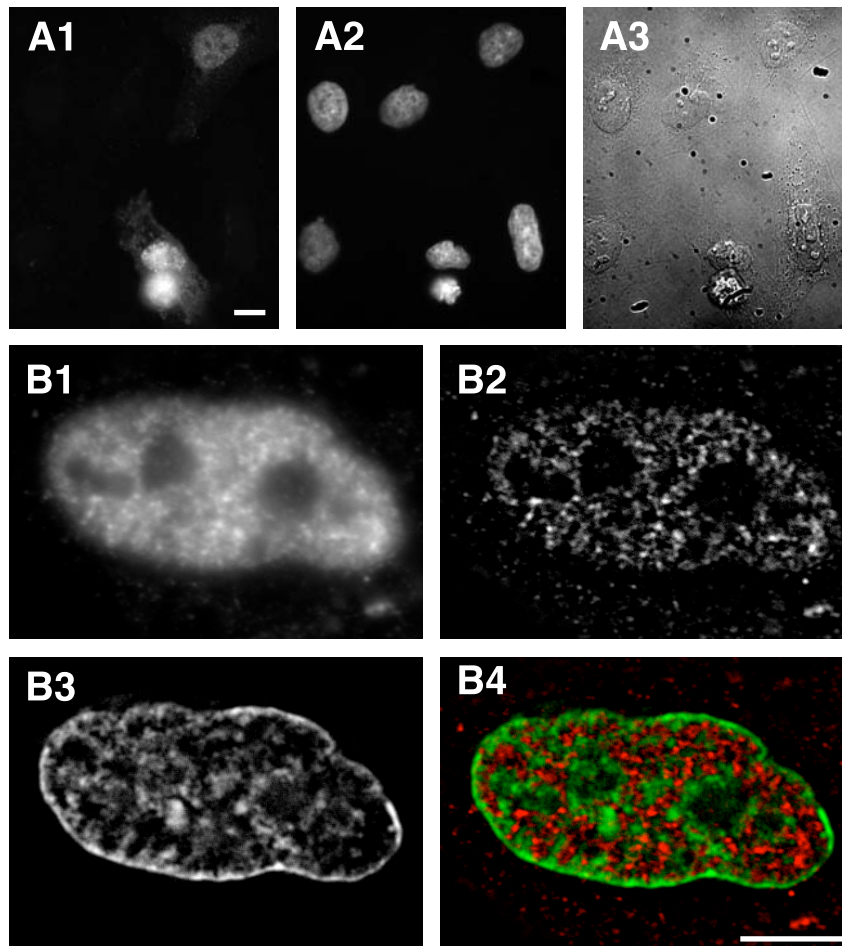
### 3.3.2 Feinanalyse der Verteilung von HDAC4 und HDAC7 im Zellkern

Zur genaueren Bestimmung der Verteilung der HDAC4- und HDAC7-Proteine innerhalb des Zellkerns, wurden HeLa-Zellen transient mit Plasmiden, die für HDAC4-FLAG oder HDAC7-FLAG codieren, transfiziert (Abbildungen 17 und 18). Wie unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben, erfolgte die Analyse der subzellulären Verteilung mittels indirekter Immunfluoreszenz über das an die Proteine gekoppelte FLAG-Epitop. Ebenso wie HDAC7, wurde HDAC4 überwiegend im Zellkern von Zellen in der Interphase des Zellzykluses nachgewiesen (Abbildung 17A, Zelle am unteren Bildrand). Während der Mitose, bei welcher der Zellkern aufgelöst wird, wurde eine diffuse Verteilung beobachtet (Abbildung 17A, Zelle am oberen Bildrand).



**Abbildung 17. Feinanalyse der Verteilung von HDAC7-FLAG im Zellkern.** Der Zellkern einer HeLa-Zelle, in der HDAC7-FLAG transient exprimiert wurde, wurde in seriellen z-Sektionen von 0,4 µm aufgenommen. Eine einzelne

Sektion nahe des Zentrums des Zellkerns ist gezeigt. DAPI, DNA wurde mit dem Farbstoff DAPI angefärbt; HDAC7-FLAG, korrespondierendes *Anti*-FLAG-Signal; Vereinigt, Überlagerung der beiden Signale der DAPI- (rot) und *Anti*-HDAC7-Färbung (grün).



**Abbildung 18. Detaillierte Untersuchung der subzellulären Verteilung von HDAC4.** Ein

HDAC4-FLAG-Fusionsprotein wurde transient in HeLa-Zellen exprimiert. A, ein Ausschnitt aus dem Vergrößerungsfeld ist wiedergegeben. A1, Färbung mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum; A2, DNA, gefärbt mit DAPI; A3, Zellen im Phasenkontrast. Die Zelle am unteren Bildrand befindet sich in der

Mitose und zeigt eine diffuse Verteilung des HDAC4-FLAG-Fusionsproteins. Die Zellen am oberen Bildrand sind in der Interphase und zeigen HDAC4-FLAG überwiegend im Zellkern (Balken, 10 µm). B, Vergrößerung des Zellkerns einer repräsentativen Zelle. HDAC4-FLAG ist im Zellkern in diskreten Zonen angereichert. Eine Sektion nahe des Zentrums des Zellkerns ist konfokal dargestellt. B1, *Anti*-

FLAG-Färbung vor der digitalen Aufbereitung; B2, korrespondierende Sektion nach digitaler Aufbereitung; B3, entsprechende digital aufbereitete Sektion der DNA-Färbung mit DAPI; B4, Überlagerung der Signale von B2 und B3, *anti*-FLAG in rot und DAPI in grün (Balken, 10 µm).

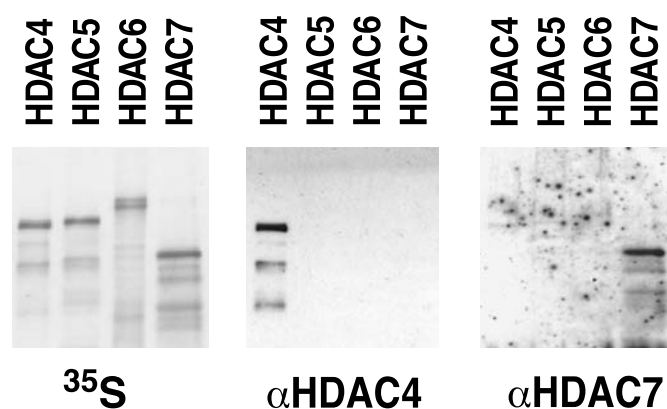
Im Interphasenzellkern waren HDAC4 und HDAC7 von den Nukleoli ausgeschlossen und in diskreten Mikrozonen angereichert (Abbildung 17 und Abbildung 18B). Diese Mikrozonen enthalten keine DNA, wie die Vereinigung der Immunfluoreszenzbilder des FLAG-Signals und eines spezifisch DNA färbenden Farbstoffes zeigt (DAPI, Abbildungen 17 links und 18B4). Derartig Chromatin-freie Zonen wurden bereits für HDACs der Klasse I sowie für einige Transkriptionsfaktoren beschrieben (Henzel et al., 1998; Fischle et al., 1999). HDAC4 und HDAC7 waren von der Peripherie des Zellkerns ausgeschlossen und nicht in heterochromatischen Bereichen, die mit transkriptionell inaktivem Chromatin in Verbindung gebracht werden, nachzuweisen (Henzel et al., 1998).

### **3.4 Enzymatische Aktivität der HDACs der Klasse II**

#### **3.4.1 Gewinnung von spezifischen *Anti*-HDAC4- und *Anti*-HDAC7-Antisera**

Zur Gewinnung spezifischer polyklonaler Antisera gegen HDAC4 und HDAC7 wurden rekombinante Fusionsproteine folgender N-terminaler Fragmente mit GST verwendet: GST-HDAC4(aa 118-662) und GST-HDAC7(aa 1-487). Jeweils zwei Kaninchen wurden mit diesen Antigenen immunisiert und die erhaltenen Sera mittels Western Blot auf ihre Titer für die Erkennung der Fusionsproteine getestet. Während beide mit HDAC4 immunisierten Kaninchen und ein mit HDAC7 immunisiertes durchweg sehr hohe Titer aufwies, war die Immunantwort des zweiten mit HDAC7 immunisierten Kaninchens auch nach wiederholter Injektion des Antigens sehr niedrig. Die zu verschiedenen Zeitpunkten der Immunstimulation gewonnenen Sera jeweils eines Kaninchens für HDAC4 und HDAC7 wurden vereinigt und durch Aufreinigung über GST-HDAC-Affinitätssäulen sowohl von Antikörpern mit Affinität für GST als auch für orthologe HDACs gereinigt. Western Blot-Analyse der aufgereinigten Antisera mit im Retikulozytenlysat exprimierten HDAC-Proteinen zeigte, daß die auf diese Weise erhaltenen *Anti*-HDAC4- und *Anti*-

HDAC7-Antisera hochspezifisch waren und keine Affinität für andere HDACs der Klasse II aufwiesen (Abbildung 19).



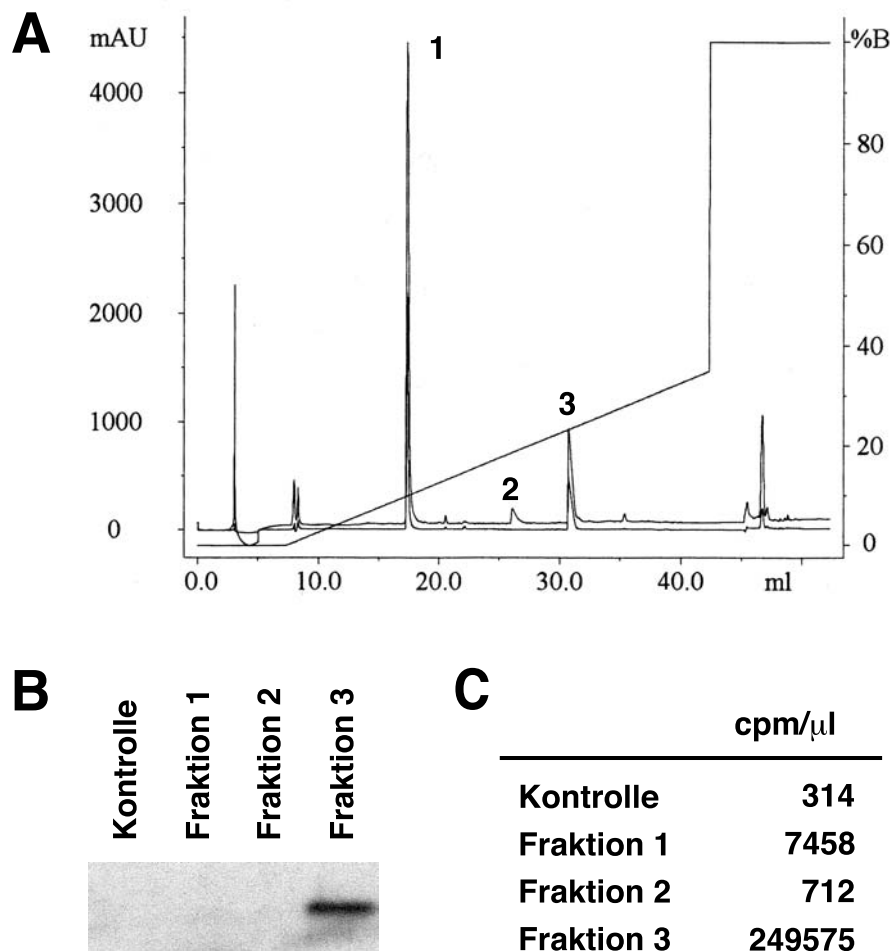
**Abbildung 19. Untersuchung der Spezifität der *Anti-HDAC4-* und *Anti-HDAC7-*Antisera.** Die angegebenen HDACs der Klasse II wurden im Retikulozytenlysat unter Verwendung von <sup>35</sup>S-Methionin translatiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. <sup>35</sup>S: <sup>35</sup>S-Autoradiographie der Membran

zeigt, daß vergleichbare Mengen der verschiedenen HDACs aufgetragen wurden; αHDAC4, αHDAC7: Western-Blot-Entwicklung derselben Membran mit *Anti-HDAC4-* oder *Anti-HDAC7-*Antisera.

### 3.4.2 Herstellung eines Substrats zur Etablierung eines enzymatischen HDAC-Aktivitätstests

Zur Etablierung eines enzymatischen Aktivitätstests für Histon-Desacetylasen wurde ein Peptid, das den 24 N-terminalen Aminosäuren des humanen Histons H4 entspricht, hergestellt (Alonso und Nelson, 1986; Taunton et al., 1996). Dieses wurde chemisch unter Verwendung von BOP und trityliertem Acetat peracetyliert (Emiliani et al., 1998). Die Abtrennung des peracetylierten und radiomarkierten Reaktionsprodukts von nicht-acetyliertem Peptid und freiem Acetat erfolgte über Umkehrphasenchromatographie auf einer C-18 Säule. Abbildung 20 zeigt, daß die Retentionszeit des peracetylierten, radiomarkierten H4-Peptidfragments (Fraktion C) deutlich größer war als die des nicht acetylierten Ausgangsmaterials (Fraktion A). Wie erwartet, nimmt die Hydrophobizität des Peptids nach Acetylierung zu, was eine relativ einfache Abtrennung von nicht umgesetzten Material ermöglicht. Wie die massenspektrometrische Analyse bestätigte (UCSF Mass Spectrometry Facility), führten die gewählten Reaktionsbedingungen reproduzierbar zur Acetylierung aller vier Lysinreste sowie des N-Terminus des H4-Peptidfragments (Daten sind nicht gezeigt).

Die Freisetzung  $^3\text{H}$ -markierten Acetats, das unter sauren Bedingungen mit Ethylacetat aus wässrigen Reaktionslösungen extrahiert werden kann, aus diesem H4-Substratpeptid dient zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis enzymatisch-

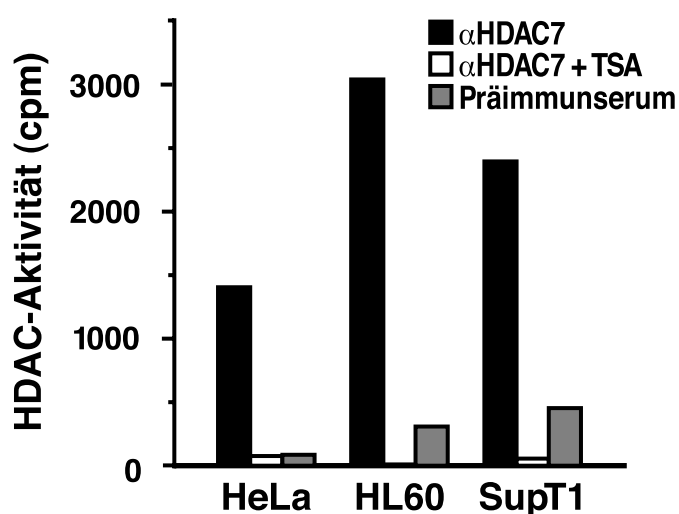


**Abbildung 20. HPLC-Aufreinigung des  $^3\text{H}$ -peracetylierten Histon H4-Peptidfragments.** Ein 24 aa Peptid des N-Terminus des humanen Histons H4 wurde unter Verwendung von trityliertem Acetat chemisch peracetyliert. A, Auftrennung der Reaktionsprodukte über Umkehrphasenchromatographie auf einer C-18 Säule; 100  $\mu\text{l}$  resuspendiertes Reaktionsprodukt wurden aufgetragen; Säule: Vydac 218TP54 (C18, 5 $\mu$ , 300 Å, 4,6 mmID x 250 mL); Flußrate: 1 ml/min; Detektion: Absorption bei 214 und 254 nm; Mobile Phase: Laufpuffer A ( $\text{H}_2\text{O}$ ), Laufpuffer B (Acetonitril); beide Laufpuffer enthielten 0,1% TFA; 100% Laufpuffer A für 5 min nach der Injektion, anschließend linearer Gradient bis 35% Laufpuffer B über 35 min gefolgt von 100% Laufpuffer B für 10 min; 1, 2, 3, Fraktionen die analysiert wurden; B,  $^3\text{H}$ -Autoradiographie der SDS-PAGE der Fraktionen 1-3 (20%-iges Gel); C, spezifische Radioaktivität der Fraktionen 1-3, zur Kontrolle wurde Resuspensionspuffer (aqua bidest.) verwendet.

er HDAC-Aktivität (Taunton et al., 1996; Emiliani et al., 1998; Fischle et al., 1999).

### 3.4.3 Nachweis der enzymatischen Aktivität von HDAC7

Die enzymatische Aktivität von HDAC7 wurde getestet, indem das HDAC7-Protein aus Gesamtyellextrakten von HeLa-, HL60- und SupT1-Zellen mit spezifischem *Anti*-HDAC7-Antiserum immunpräzipitiert wurde. *Anti*-HDAC7-Immupräzipitate wurden entweder direkt oder in Gegenwart von 400 nM TSA mit dem peracetylierten Peptidfragment des Histons H4 inkubiert. Wie Abbildung 21 zeigt, wurden aus allen drei Zelllinien über das *Anti*-HDAC7-Antiserum Proteine mit spezifischer HDAC-Aktivität angereichert, die zur Desacetylierung des H4-Peptidfragments führten. Diese enzymatische Aktivität wurde durch 400 nM TSA nahezu vollständig inhibiert. Nur sehr geringe unspezifische Aktivität wurde in Immunpräzipitationen mit dem Präimmenserum aus den unterschiedlichen Zelllinien erhalten. Da zusätzliche Experimente zeigten, daß diese Aktivität von TSA selbst bei höheren Konzentrationen nicht inhibiert wird (Daten sind nicht gezeigt), ist anzunehmen, daß es sich nicht um Histon-Desacetylaseaktivitäten sondern vielmehr um proteolytische Aktivitäten handelt. Derartige Aktivitäten führen zum Abbau des Substratpeptids und setzen auf diese Weise extrahierbares radiomarkiertes Material frei.

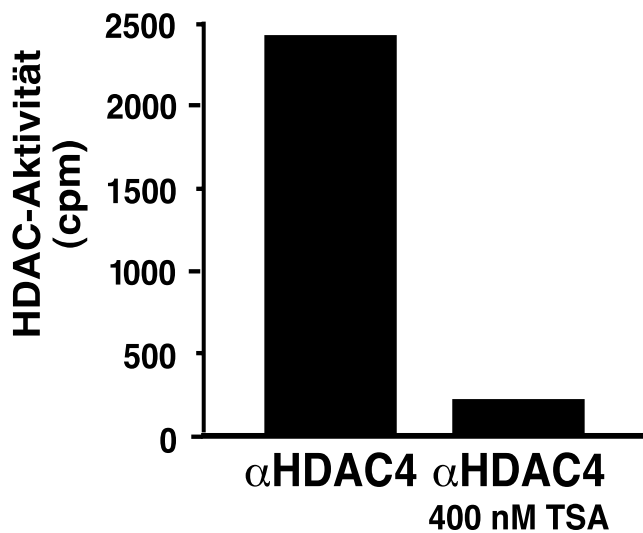


**Abbildung 21.** Nachweis der enzymatischen Aktivität von HDAC7. Endogenes HDAC7 wurde aus Gesamtzellextrakte der angegebenen Zelllinien (jeweils 10 mg Protein) entweder mit *Anti*-HDAC7-Antiserum oder dem entsprechenden Präimmenserum immunpräzipitiert. Die enzymatische HDAC-Aktivität der Immunpräzipitate wurde über die Desacetylierung des H4-Substratpeptids

in Gegenwart (+TSA) oder Abwesenheit von 400 nM TSA gemessen. Die jeweils freigesetzte Menge tritylierten Acetats (cpm) ist als Durchschnitt dreier unabhängiger Messungen angegeben.

### 3.4.4 Nachweis der enzymatischen Aktivität von HDAC4

Um zu testen, ob auch HDAC4 enzymatische Histon-Desacetylaseaktivität aufweist, wurde endogenes HDAC4 von 293-Zellextrakten mit *Anti*-HDAC4-Antiserum immunpräzipitiert. Das Immunpräzipitat wurde in gleiche Teile aufgeteilt und entweder direkt oder in Gegenwart von 400 nM TSA auf enzymatische Aktivität untersucht. Wie Abbildung 22 zeigt, desacetylierte das *Anti*-HDAC4-Immunpräzipitat das eingesetzte H4-Substratpeptid. Diese enzymatische Aktivität wurde durch 400 nM TSA nahezu vollständig inhibiert.



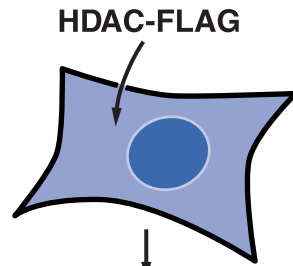
**Abbildung 22. Nachweis der enzymatischen Aktivität von HDAC4.** Gesamtzellextrakte von 293-Zellen (10 mg Protein) wurden mit *Anti*-HDAC4-Antiserum immunpräzipitiert. Die enzymatische HDAC-Aktivität wurde mit dem tritylierten peracetylierten H4-Substratpeptid in Gegenwart oder Abwesenheit von 400 nM TSA gemessen. Die jeweils freigesetzte Menge tritylierten Acetats (cpm) ist als Durchschnitt dreier unabhängiger Messungen angegeben.

### 3.4.5 Enzymatischer Aktivitätsvergleich von HDACs der Klasse II mit HDACs der Klasse I

Zum direkten Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von HDACs der Klasse II mit Enzymen der Klasse I wurden HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC4 an C-terminale FLAG-Epitope gekoppelt und transient in 293-Zellen exprimiert. Nach der Transfektion wurden die entsprechenden Fusionsproteine mit für das FLAG-Epitop spezifischem Antiserum immunpräzipitiert (Abbildung 23). Die enzymatische HDAC-Aktivität von auf diese Weise aufgereinigtem HDAC4 war in derselben



Transfektion:



Immunpräzipitation:

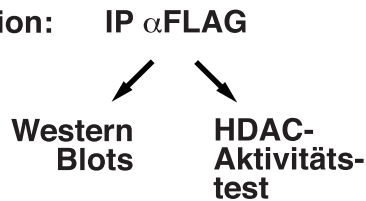


Abbildung 23. Schematische Darstellung der transienten Expression von HDACs mit C-terminalem FLAG-Epitop. Plasmide, die für Fusionsproteine verschiedener HDAC-Proteine mit einem C-terminalen FLAG-Epitop codieren, wurden in 293-Zellen transient exprimiert. Die Fusionsproteine wurden aus Gesamtzell- oder Kernextrakten mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden aufgeteilt und entweder über

SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blots analysiert oder zur Bestimmung der enzymatischen HDAC-Aktivität eingesetzt (Desacetylierung des H4-Substratpeptids).

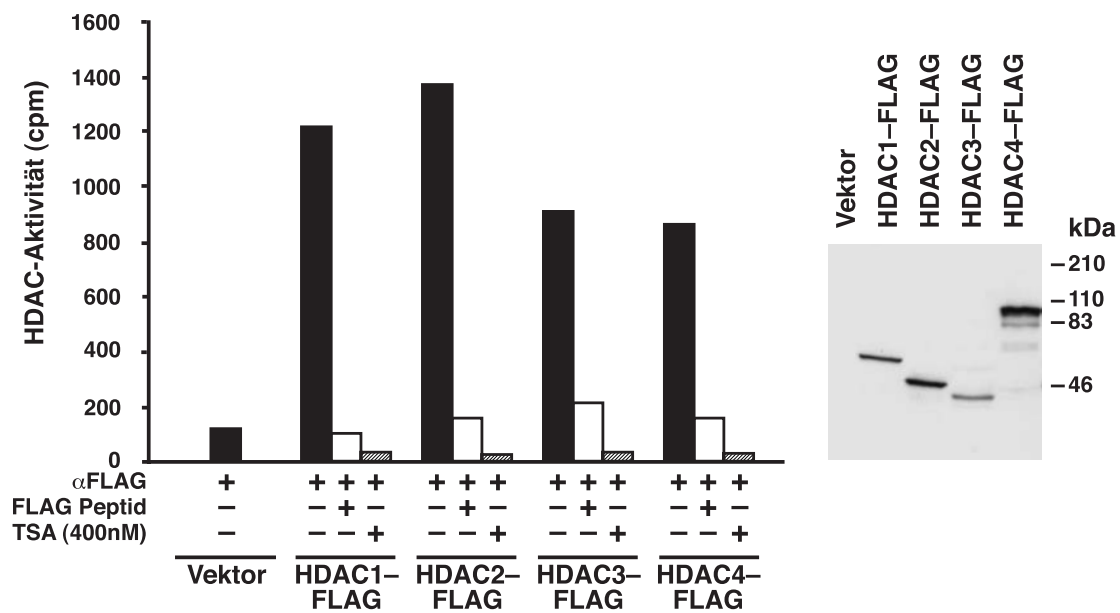


Abbildung 24. Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von HDACs der Klasse I und Klasse II. Plasmide, die für die angegebenen HDAC-FLAG-Fusionsproteine codieren, oder der leere Vektor wurden in 293-Zellen transfiziert. Fusionsproteine wurden mit *anti*-FLAG spezifischem Antiserum in Gegenwart oder Abwesenheit eines molaren Überschuss des FLAG-Peptids immunpräzipitiert. Links, die enzymatische HDAC-Aktivität der Immunpräzipitate wurde mit oder ohne 400 nM TSA durch Desacetylierung des H4-Substratpeptids in den angegebenen Kombinationen bestimmt; rechts, Western Blot der *Anti*-FLAG-Immunpräzipitationen in Abwesenheit des FLAG-Peptids. Die Positionen von Molekulargewichtsmarkern (kDa) sind auf der rechten Seite angezeigt.

Größenordnung wie die der HDACs der Klasse I, HDAC1, HDAC2 und HDAC3 (Abbildung 24; Taunton et al., 1996; Yang et al., 1997; Emiliani et al., 1998). Wie der *Anti*-FLAG-Western Blot der Immunpräzipitate zeigte, waren alle Fusionsproteine in ähnlichem Umfang exprimiert und immunpräzipitiert worden (Abbildung 24). Weit- aus geringere enzymatische Aktivität wurde immunpräzipitiert, wenn das *Anti*-FLAG-Antiserum mit einem molaren Überschuss an FLAG-Peptid blockiert worden war. Eine Beobachtung, welche die Spezifität der *Anti*-FLAG-Immunpräzipitation unter Beweis stellt. Die Sensitivität der HDACs der Klasse I, HDAC1, HDAC2 und HDAC3, und der HDAC der Klasse II, HDAC4, gegenüber TSA war vergleichbar. Die enzymatischen Aktivitäten aller Immunpräzipitate waren bei 400 nM TSA zu mehr als 95% inhibiert. Ähnliche Ergebnisse wurden für die anderen HDACs der Klasse II, HDAC5, HDAC6 und HDAC7, erhalten (Abbildungen nicht gezeigt).

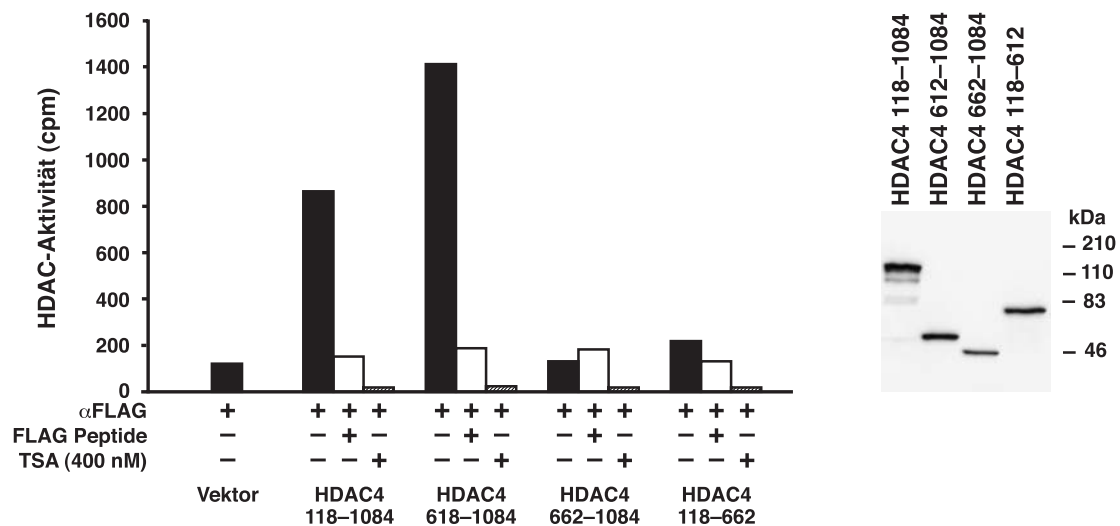
### **3.5 Bestimmung der HDAC-Domäne in HDACs der Klasse II**

Wie unter Abschnitt 3.1.3 ausgeführt, können HDAC4, HDAC5 und HDAC7 grob in zwei Domänen aufgeteilt werden: eine N-terminale Region mit geringer Homologie zu anderen Faktoren und eine C-terminale Region mit großer Ähnlichkeit zu anderen Histon-Desacetylasen sowie bakteriellen Enzymen, die als Acetyl-Polyaminhydrolasen klassifiziert sind (Leipe und Landsman, 1997; Finnin et al., 1999). Um die enzymatisch aktiven Domänen in HDAC4 und HDAC7 zu bestimmen, wurden Deletionsmutanten dieser Faktoren mit C-terminaler FLAG-Sequenz transient in 293-Zellen exprimiert und, wie unter Abschnitt 3.4.5 beschrieben, nach Immunpräzipitation auf enzymatische Aktivität untersucht.

#### **3.5.1 Bestimmung der HDAC-Domäne in HDAC4**

Folgende HDAC4-Fragmente wurden über Transfektion gefolgt von Immunpräzipitation auf enzymatische Aktivität untersucht: HDAC4(aa 118-1084), HDAC4(aa 662-1084), HDAC4(aa 612-1084) und HDAC4(aa 118-662). Spezifische enzymatische HDAC-Aktivität wurde für HDAC4(aa 118-1084) und HDAC4(aa 662-

1084) gemessen (Abbildung 25). Weitere Deletion von 50 Aminosäuren von HDAC4 führte zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität (HDAC4(aa 662-1084)). Wie aufgrund der fehlenden Sequenzhomologie zu *yHDA1* und anderen HDACs zu erwarten war, war keine enzymatische Aktivität mit dem N-terminalen Fragment HDAC4(aa 118-662) assoziiert. Der Western Blot der *Anti*-FLAG-Immunpräzipitate zeigte, daß alle Fusionsproteine in ähnlichem Umfang exprimiert und immunpräzipitiert worden waren (Abbildung 25). Der Verlust der enzymatischen Aktivität des Fragments HDAC4(aa 612-1084) kann somit nicht durch Instabilität dieses Fragments und erhöhten proteolytischen Abbau erklärt werden.

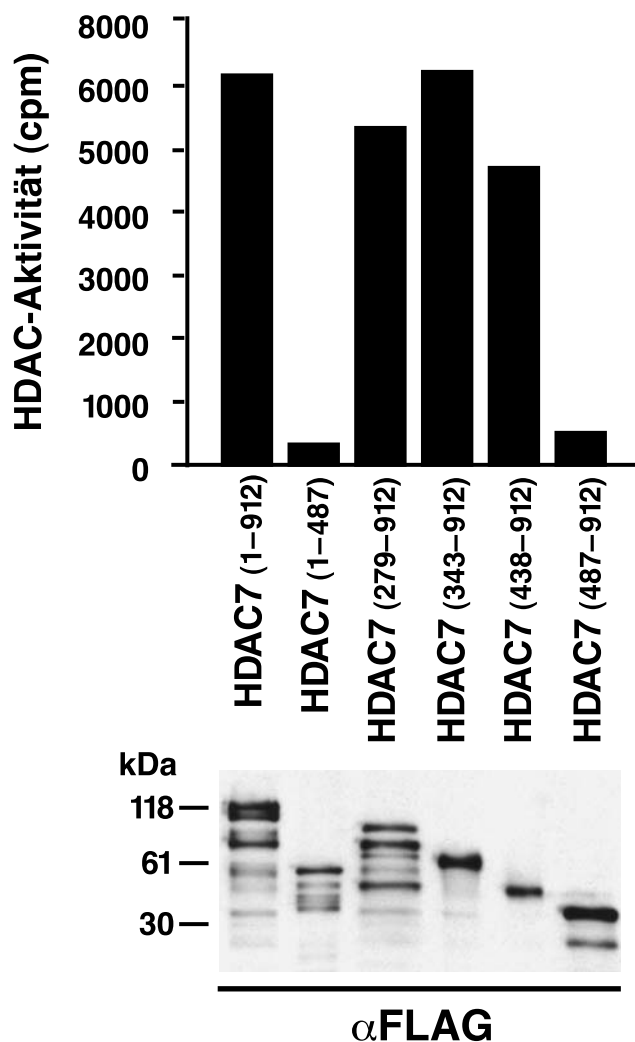


**Abbildung 25. Bestimmung der für die enzymatische Aktivität von HDAC4 verantwortlichen Domäne.** Plasmide, die für die angegebenen HDAC4-FLAG-Fusionsproteine codieren oder der leere Vektor wurden in 293-Zellen transfiziert. Fusionsproteine wurden mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum in Gegenwart oder Abwesenheit eines molaren Überschusses des FLAG-Peptids immunpräzipitiert. Links, die enzymatische HDAC-Aktivität der Immunpräzipitate wurde mit oder ohne 400 nM TSA durch Desacetylierung des H4-Substratpeptids in den angegebenen Kombinationen bestimmt; rechts, Western Blot der *Anti*-FLAG-Immunpräzipitationen in Abwesenheit des FLAG-Peptids. Die Position von Molekulargewichtsmarkern (kDa) ist auf der rechten Seite angezeigt.

### 3.5.2 Bestimmung der HDAC-Domäne in HDAC7

Für die Bestimmung der enzymatisch aktiven HDAC-Domäne in HDAC7 wurden folgende HDAC7-Fragmente untersucht: HDAC7(aa 1-912), HDAC7(aa 1-

487), HDAC7(aa 279-912), HDAC7(aa 343-912), HDAC7(aa438-912) und HDAC7(aa 487-912). Ähnlich HDAC4 war eine C-terminale Region von 474 aa für die enzymatische Aktivität von HDAC7 essentiell. Die Fragmente HDAC7(aa 1-912), HDAC7(aa 279-912), HDAC7(aa 343-912) und HDAC7(aa 438-912) wiesen vergleichbare enzymatische Aktivitäten auf (Abbildung 26). Weitere Deletion von 49 Aminosäuren von HDAC7 führte zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität [HDAC7(aa 487-912)]. Wie erwartet, war keine HDAC-Aktivität mit dem N-terminalen Fragment HDAC7(aa 1-487) assoziiert. Alle Fusionsproteine waren dabei in ähnlichem Umfang exprimiert und immunpräzipitiert worden (Abbildung 26).

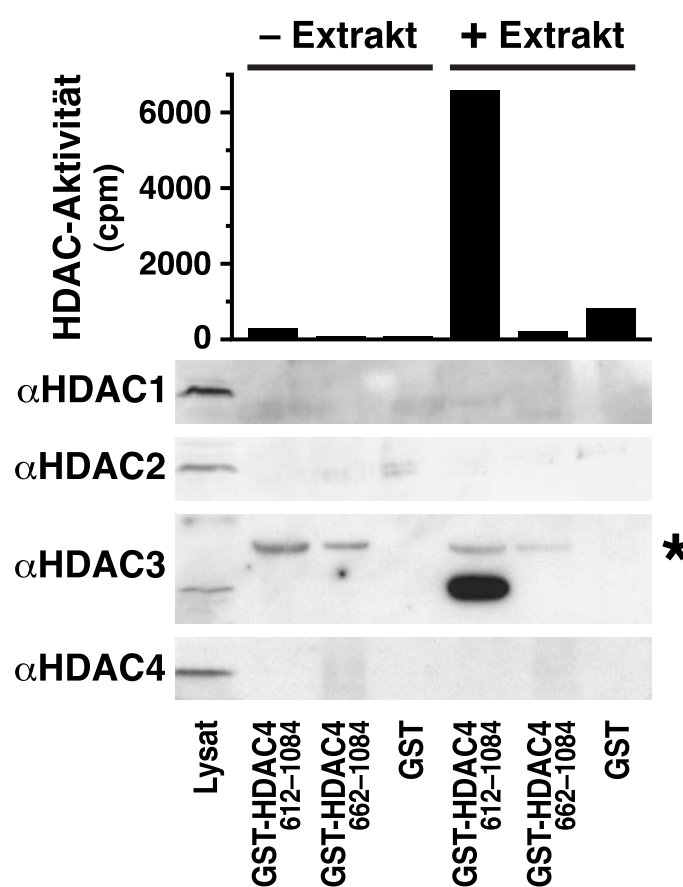


**Abbildung 26. Bestimmung der für die enzymatische Aktivität von HDAC7 verantwortlichen Domäne.** Die angegebenen Konstrukte mit C-terminalem FLAG-Epitop, HDAC7 oder N- sowie C-terminale Deletionsmutanten von HDAC7, wurden transient in 293-Zellen exprimiert. Oben, *Anti-FLAG* Immunpräzipitate wurden mit dem H4-Substratpeptid auf enzymatische Aktivität getestet; unten, Western Blots der Immunpräzipitate mit *Anti-FLAG*-Antiserum zur Kontrolle der Expression und Immunpräzipitation der Fusionsproteine. Die Positionen von Molekulargewichtsmarkern (kDa) sind auf der linken Seite angezeigt.

### 3.6 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von HDACs der Klasse II mit einer HDAC-Domäne

#### 3.6.1 Untersuchung der enzymatischen Aktivität rekombinanter HDAC4- und HDAC7-Proteine

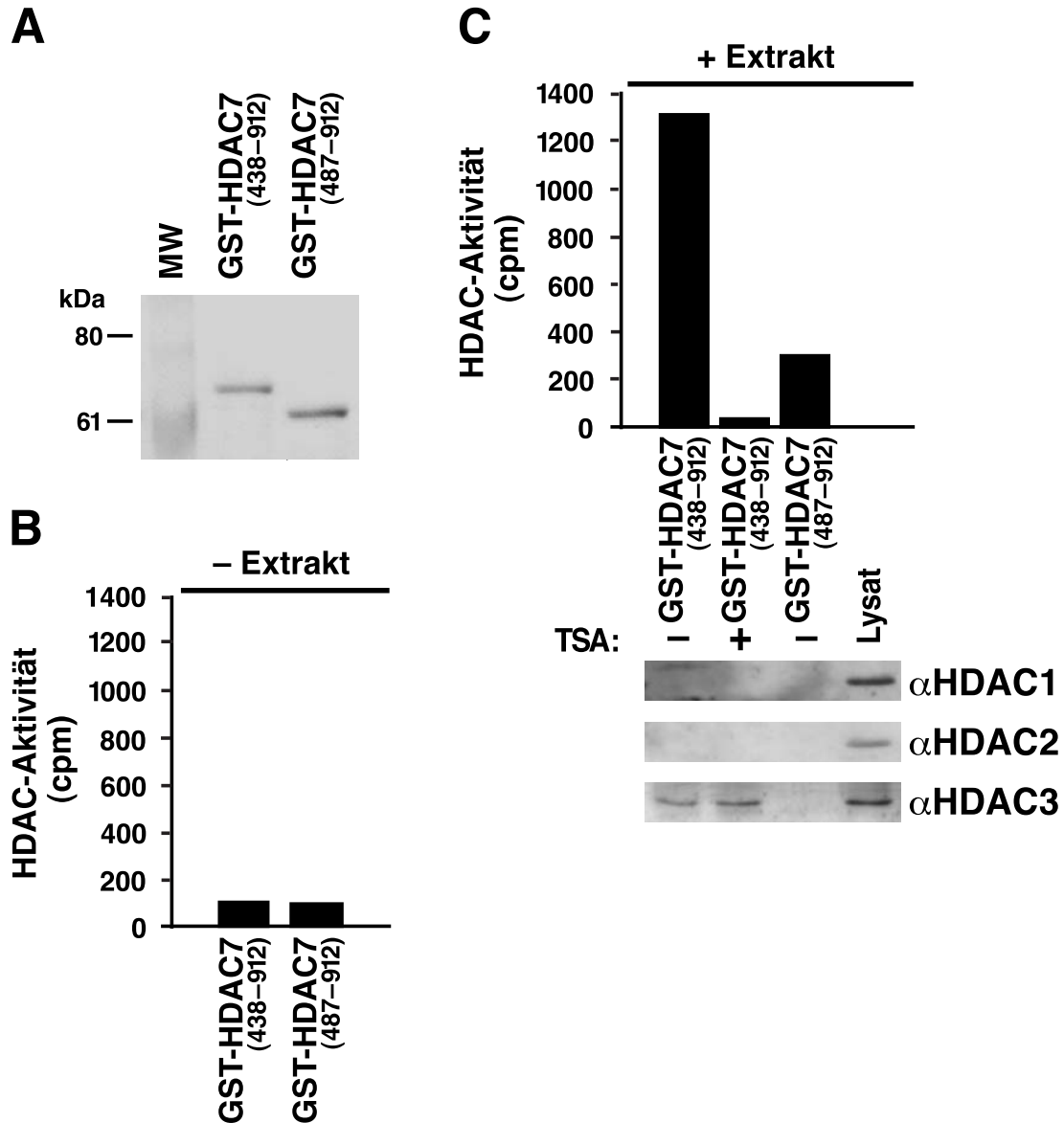
Zur weiteren Untersuchung der enzymatischen Aktivität von HDAC4 und HDAC7 wurden die katalytischen Domänen dieser beiden Faktoren [HDAC4(aa 612-1084) und HDAC7(aa 438-912)] und die entsprechenden inaktiven Deletionsfragmente [HDAC4(aa 662-1084) und HDAC7(aa 487-912)] als Fusionsproteine mit GST rekombinant in Bakterien exprimiert und aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.5). Trotz der Anwendung verschiedenster Aufreinigungsmethoden und -puffer konnten keine enzymatisch aktiven rekombinanten Fusionsproteine erhalten werden (Abbildungen 27 (-Extrakt) und 28B).



**Abbildung 27. Untersuchung der enzymatischen Aktivität rekombinanter GST-HDAC4-Fusionsproteine.** GST und die angegebenen GST-HDAC4-Fusionsproteine wurden in Bakterien exprimiert und an GSH-Agarose gebunden. Die enzymatische HDAC-Aktivität der immobilisierten rekombinanten Proteine wurde vor (-Extrakt) oder nach (+Extrakt) der Inkubation mit Kernextrakten von HeLa-Zellen gemessen (oben). Material, das spezifisch an die GST-HDAC4-Fusionsproteine gebunden war, wurde in Western Blots mit den angegebenen Antisera analysiert (unten). Der Stern markiert ein kontaminierendes bakterielles Protein, das unspezifisch vom *Anti*-HDAC3-Antiserum erkannt wird. 10% des für die Messungen eingesetzten Kernextrakts wurde als Kontrolle aufgetragen (Lysat).

10% des für die Messungen eingesetzten Kernextrakts wurde als Kontrolle aufgetragen (Lysat).

Da die korrespondierenden Proteinfragmente bei Expression in eukaryontischen Zellen jedoch enzymatisch aktiv waren (siehe Abschnitt 3.5.), wurde unter-



**Abbildung 28. Untersuchung der enzymatischen Aktivität rekombinanter GST-HADC7-Fusionsproteine.** Die angegebenen GST-HDAC7-Fusionsproteine wurden in Bakterien exprimiert und an GSH-Agarose gebunden. A, Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE der rekombinanten GST-HDAC7-Fusionsproteine (7,5%-iges Gel); B, enzymatische HDAC-Aktivitäten der immobilisierten rekombinanten Proteinpräparationen. (C) HDAC-Aktivität der rekombinanten Fusionsproteine nach Inkubation mit Kernextrakten von 293-Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von 400 nM TSA. Material, das an die GST-HDAC7-Fusionsproteine gebunden war, wurde in Western Blots mit *anti*-HDAC1-, *anti*-HDAC2-, und *anti*-HDAC3-spezifischen Antisera untersucht. 10% des für die Messungen eingesetzten Kernextrakts wurde als Kontrolle aufgetragen (Lysat).

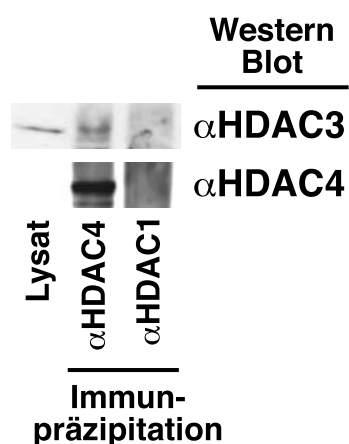
sucht, ob zellspezifische Cofaktoren für die enzymatische Aktivität von HDAC4 und HDAC7 nötig sind. Aufgereinigte GST-HDAC-Fusionsproteine wurden mit Kernextrakten von HeLa- oder 293-Zellen inkubiert und die enzymatische Aktivität des gebundenen Materials nach intensivem Waschen gemessen. Weder GST selbst noch die Fusionsproteine der in Zellkulturexperimenten nach Transfektion inaktiven Fragmente wiesen nach dieser Behandlung enzymatische Aktivität auf. Die Fusionsproteine der in Zellkulturexperimenten nach Transfektion aktiven Fragmente hingegen waren nach der Inkubation mit Kernextrakten enzymatisch aktiv (Abbildungen 27 (+Extrakt) und 28C), wobei die HDAC-Aktivität bei 400 nM TSA nahezu vollständig inhibiert war (Abbildungen 28C und weitere, nicht gezeigte). Diese Resultate lassen darauf schließen, daß ein oder mehrere zelluläre Cofaktoren an der enzymatischen Aktivität von HDAC4 und HDAC7 beteiligt sind.

### **3.6.2 Nachweis der spezifischen Interaktion von rekombinanten GST-HDAC4- und GST-HDAC7-Fusionsproteinen mit HDAC3**

Die HDACs der Klasse I, HDAC1 und HDAC2, wurden zusammen in denselben hochmolekularen Multiproteinkomplexen nachgewiesen und beide Faktoren sind für die enzymatische Aktivität dieser Komplexe essentiell (Zhang et al., 1997; Zhang et al., 1998b; Zhang et al., 1998c; Zhang et al., 1999). Da sowohl GST-HDAC4 als auch GST-HDAC7 nach Inkubation mit Kernextrakten enzymatisch aktiv waren, wurde untersucht, ob HDAC4 und HDAC7 mit anderen HDACs interagieren, um enzymatisch aktive Komplexe zu bilden. Zelluläres Material, das an die GST-HDAC Fusionsproteine gebunden hatte, wurde zu diesem Zweck mittels Western Blot auf HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC4 hin untersucht (Abbildungen 27 und 28C). Dabei wurde HDAC3 spezifisch in den enzymatisch aktiven Präparationen der HDAC4- und HDAC7-Fusionsproteine nachgewiesen (Abbildungen 27 und 28C). Weder GST selbst, noch inaktive Fusionsproteine hatten HDAC3 aus den Kernextrakten angereichert. Keines der rekombinanten Proteine hatte zelluläres HDAC1, HDAC2 oder HDAC4 gebunden. Die Bindung von HDAC3 an die enzymatisch aktiven Fusionsproteine ist daher offensichtlich hochspezifisch.

### 3.6.3 Nachweis der spezifischen Interaktion endogener HDAC4- und HDAC3-Proteine

Basierend auf der Beobachtung, daß rekombinante HDAC4- und HDAC7-Proteine in der Lage sind, HDAC3 spezifisch zu binden, wurde untersucht ob eine derartige Bindung physiologisch von Bedeutung ist, d.h. innerhalb der Zelle stattfindet. Natives, endogenes HDAC4 wurde mit dem spezifischen *Anti*-HDAC4-Antiserum aus Kernextrakten von HeLa-Zellen immunpräzipitiert. Nach intensivem Waschen wurden die aufgereinigten HDAC4-Immunkomplexe über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf das Vorhandensein von HDAC3 untersucht. HDAC3 wurde dabei spezifisch in *Anti*-HDAC4-Immunkomplexen nicht aber in *Anti*-HDAC1-Immunkomplexen nachgewiesen (Abbildung 29).



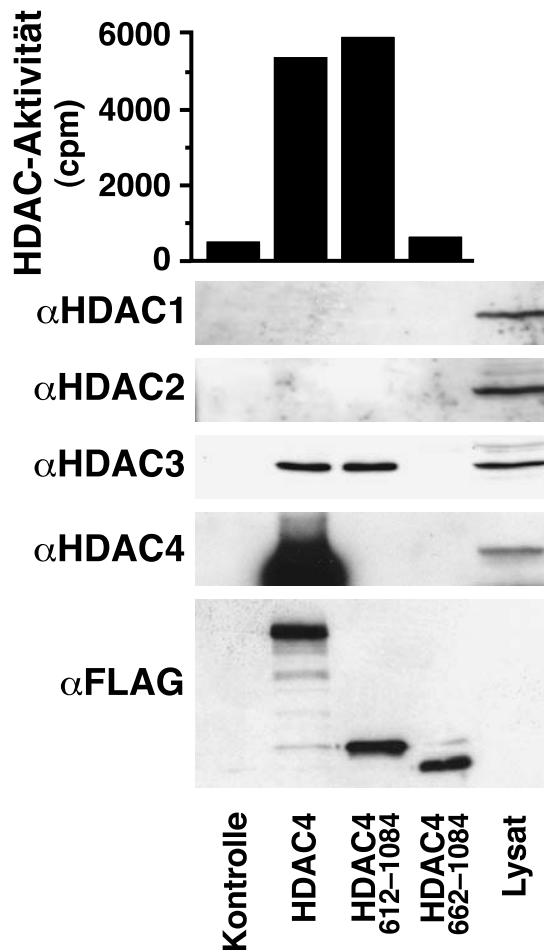
**Abbildung 29. Nachweis der spezifische Interaktion endogener HDAC4- und HDAC3-Proteine.** Proteine aus Kernextrakten von Hela-Zellen wurden mit spezifischen Antiseren gegen HDAC4 oder HDAC1 immunpräzipitiert. Das immunpräzipitierte Material wurde über SDS-PAGE (10%-iges Gel) aufgetrennt und in Western Blots mit *anti*-HDAC3- und *anti*-HDAC4-spezifischen Antiseren analysiert. Lysat, 2% des für die Immunpräzipitation eingesetzten Extrakts.

### 3.6.4 Nachweis der spezifischen Interaktion von konstitutiv überexprimiertem HDAC4-FLAG mit HDAC3

Zur weiteren Bestätigung der spezifischen Interaktion von HDAC4 mit HDAC3 wurden auf der Basis von 293-Zellen Zelllinien etabliert, die verschiedene Fragmente von HDAC4 als Fusionsproteine mit C-terminalem FLAG-Epitop konstitutiv exprimieren. Die Fusionsproteine und an diese fest gebundene zelluläre Faktoren wurden mittels eines für die FLAG-Sequenz spezifischen Antiserums immunpräzipitiert (Abbildung 30). Das auf diese Weise aufgereinigte Material wurde auf en-



zymatische HDAC-Aktivität und durch Western Blots auf HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC4 hin untersucht (Abbildung 30). In Bestätigung der mit endogenen und rekombinanten Proteinen gemachten Beobachtungen wurde HDAC3 spezifisch in den enzymatisch aktiven Präparationen gefunden. Weder HDAC1, HDAC2 noch HDAC4 konnten an HDAC4-FLAG-Fusionsproteine gebunden nachgewiesen werden.

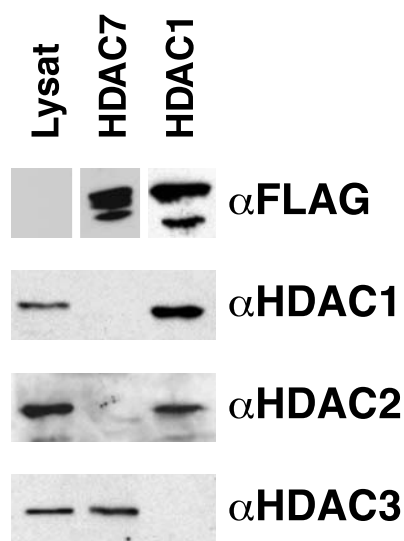


**Abbildung 30. Nachweise der spezifischen Interaktion von konstitutiv überexprimierten HDAC4-FLAG-Proteinen mit HDAC3.** 293-Zelllinien wurden etabliert, die die angegebenen HDAC4-FLAG-Konstrukte oder den entsprechenden leeren Vektor konstitutiv exprimieren. Zelluläre Proteine der unterschiedlichen Zelllinien wurden mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Immunpräzipitate wurden auf enzymatische Aktivität im HDAC-Aktivitätstest getestet (oben) oder über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit *anti*-HDAC1-, *anti*-HDAC2-, *anti*-HDAC3- und *anti*-HDAC4-spezifischen Antisera analysiert (unten). Lysat, 10% des für die Immunpräzipitation eingesetzten Gesamtzell-extrakts der Zelllinie, die den leeren Vektor konstitutiv exprimiert.

### 3.6.5 Nachweis der spezifischen Interaktion von transient überexprimiertem HDAC7-FLAG mit HDAC3

HDAC7-FLAG und HDAC1-FLAG wurden transient in 293-Zellen exprimiert. Nach der Transfektion wurden die Fusionsproteine und an dieses fest gebundene zelluläre Faktoren mittels eines für die FLAG-Sequenz spezifischen Antiserums immunpräzipitiert. Aufgereinigtes Material wurde in Western Blots auf

HDAC1, HDAC2 und HDAC3 hin untersucht (Abbildung 31). HDAC3 wurde spezifisch im *Anti*-HDAC7-FLAG-Immunpräzipitat nicht aber im *anti*-HDAC1-FLAG-Immunpräzipitat nachgewiesen. Weder HDAC1 noch HDAC2 waren an HDAC7-FLAG gebunden, konnten jedoch im *Anti*-HDAC1-FLAG-Immunpräzipitat in Bestätigung der beschriebenen Interaktion dieser beiden HDACs nachgewiesen werden (Zhang et al., 1997; Zhang et al., 1998b; Zhang et al., 1998c; Zhang et al., 1999). Diese Ergebnisse bestätigen eine spezifische Interaktion von HDAC7 mit HDAC3 innerhalb der Zelle.

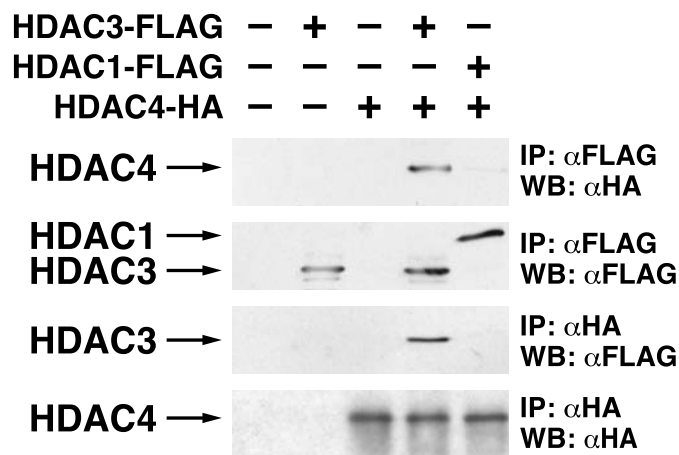


**Abbildung 31. Nachweis der spezifischen Interaktion von transient überexprimiertem HDAC7-FLAG mit HDAC3.** Plasmide, die für HDAC7-FLAG oder HDAC1-FLAG codieren wurden in 293-Zellen transfiziert. *Anti*-FLAG-Immunpräzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit den angegebenen spezifischen Antiseren analysiert. Lysat, 10% des für die Immunpräzipitation eingesetzten Gesamtzellextrakts, der mit HDAC7-FLAG transfizierten Zellen.

### 3.6.6 Untersuchung der Interaktion bei gleichzeitiger transienter Überexpression von HDAC4 und HDAC3

Die Spezifität der Bindung zwischen HDAC4 und HDAC3 wurde auch bei gleichzeitiger transienter Überexpression beider Proteine untersucht. Konstrukte, die für HDAC1-FLAG oder HDAC3-FLAG codieren, wurden alleine oder zusammen mit einem Konstrukt für HDAC4-HA in 293-Zellen transfiziert (Abbildung 32). Immunpräzipitate von HDAC3-FLAG oder HDAC1-FLAG wurden in Western Blots auf HDAC4-HA hin untersucht. Dabei wurde HDAC4-HA lediglich im Immunpräzipitat von HDAC3-FLAG, nicht aber im Immunpräzipitat von HDAC1-FLAG nachgewiesen. In einer reziproken Ausführung der Immunpräzipitation wurde zunächst HDAC4-HA aufgereinigt. Western Blotting mit *Anti*-FLAG-Antiserum bestätigte die

spezifische Bindung von HDAC3-FLAG an HDAC4-HA (Abbildung 32). Diese Experimente deuten auf eine hohe Spezifität der Interaktion von HDAC4 mit HDAC3 und bestätigen, daß HDAC1 nicht mit HDAC4 interagiert, obwohl HDAC3 und HDAC1 in ihrer Primärstruktur zu über 85% homolog sind (Emiliani et al., 1998).



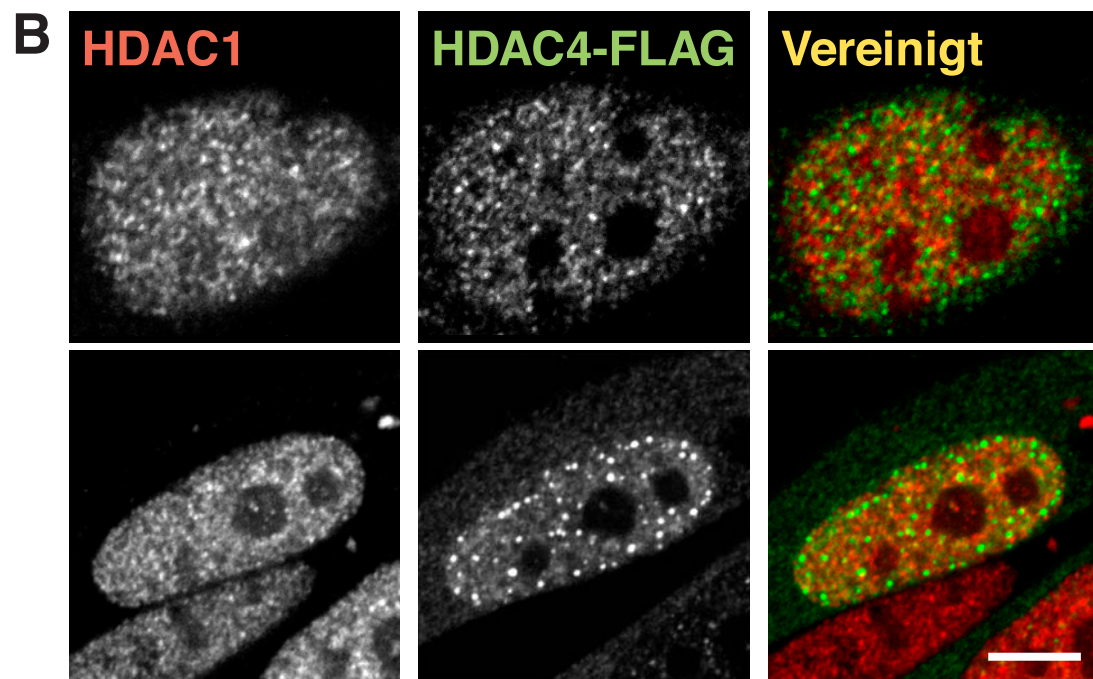
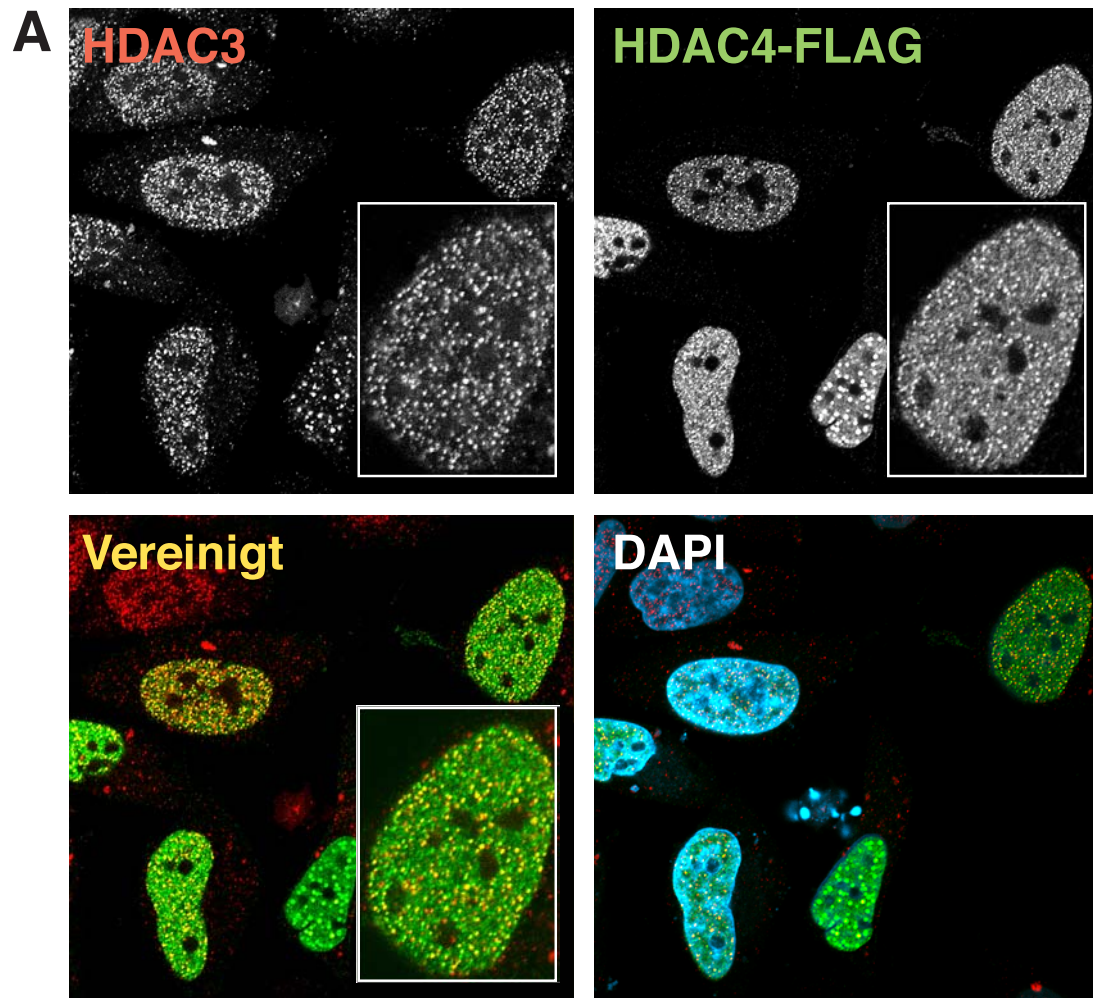
**Abbildung 32. Untersuchung der Spezifität der Interaktion von HDAC4 mit HDAC3.**

Konstrukte, die für HDAC1-FLAG, HDAC3-FLAG und HDAC4-HA codieren, wurden in den angegebenen Kombinationen in 293-Zellen transfiziert. Fusionsproteine wurden entweder mit für das HA-Epitop spezifischem Antiserum oder mit für das FLAG-

Epitop spezifischem Antiserum immunpräzipitiert (IP). Nach der Auftrennung der Immunpräzipitate über SDS-PAGE wurden Western Blots (WB) mit *anti*-HA- und *anti*-FLAG-spezifischen Antisera durchgeführt.

### 3.6.7 Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Colokalisation von HDAC4 und HDAC7 mit HDAC3 im Zellkern

HDAC4 und HDAC7 sollten zusammen mit HDAC3 im Zellkern gefunden werden, falls diese Faktoren funktionell miteinander interagieren. In Zusammenarbeit mit Dr. Michael Hendzel (Cross Cancer Institute, University of Alberta, Canada) wurde deshalb die Verteilung von exogenen, transient überexprimierten HDAC4- oder HDAC7-FLAG-Fusionsproteinen mit endogenem HDAC3 im Zellkern von HeLa-Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildungen 33 und 34). Wie bereits in Abschnitt 3.3 dargestellt, wiesen exogene HDAC4- und HDAC7-Fusionsproteine in der Mehrheit der untersuchten Zellen eine punktuelle Verteilung innerhalb des Zellkernes auf. Die Zelle unmittelbar links des Vergrößerungsfeldes in Abbildung 33A weist eine abweichende, unphysiologische Verteilung auf. Derartig große mit HDAC4 angereicherte Bereiche wurden auch von



anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Miska et al., 1999; Downes et al., 2000; Grozinger und Schreiber, 2000), werden jedoch nicht in Zellen gefunden, die nicht transfiziert wurden (siehe nicht-transfizierte Zelle in der linken oberen Ecke des Kastens; Kruhlak et al., 2000). Aus diesem Grund wurden vor allem Zellen analysiert, in denen HDAC4-FLAG in kleinen Zonen gefunden wurde, die wahrscheinlich der physiologischen Situation am nächsten kommen. Das Vergrößerungsfeld zeigt eine repräsentative Verteilung. Wenn die Fluoreszenzsignale von HDAC4-FLAG und HDAC3 vereinigt werden, ergibt sich eine gute Übereinstimmung an Zonen, die gleichzeitig beide Faktoren enthalten (Abbildung 33A, Vereinigt).

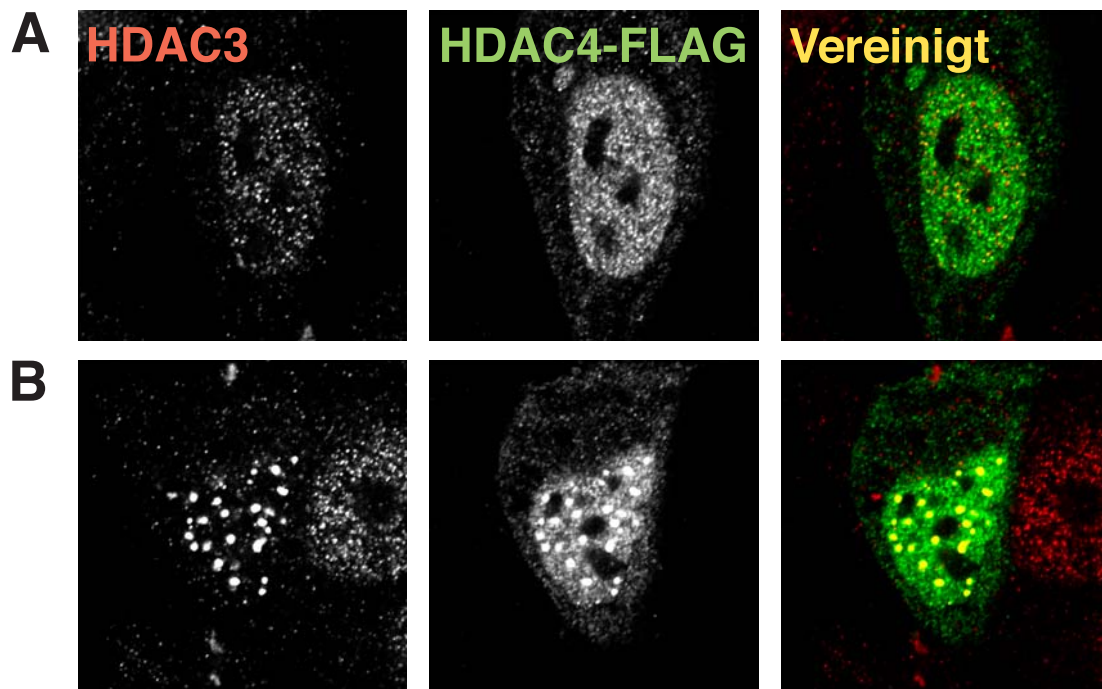
Um unspezifische Colokalisation oder gar zufällige Überlappung auszuschließen, wurde die Verteilung von HDAC4-FLAG auch mit der von endogenem HDAC1 verglichen. Zellen enthalten mehr HDAC1 als HDAC3 (Emiliani et al., 1998; Dr. Michael Hendzel Cross Cancer Institute, University of Alberta, Canada; persönliche Mitteilung). Falls die Übereinstimmung der Fluoreszenzsignale lediglich durch unabhängige und zufällig verteilte Proteine zustande kommt, sollte die Colokalisation von HDAC4 und HDAC1 stärker sein als die von HDAC4 und HDAC3. Wie erwartet wurde lediglich eine äußerst geringe Überlappung der Signale für HDAC4-FLAG und HDAC1 festgestellt (Abbildung 33B, Vereinigt). Außerdem wurden kaum Zonen gefunden, die gleichzeitig an HDAC4-FLAG und HDAC3 angereichert waren.

Eine ähnliche Colokalisation mit HDAC3 wurden auch für HDAC7-FLAG beobachtet (Abbildung 34). Allerdings war die Häufigkeit an Zonen, die gleichzeitig mit beiden Faktoren angereichert waren, geringer als für HDAC4-FLAG. Ähnlich der

---

**Abbildung 33. Colokalisation von HDAC4 und HDAC3 in diskreten Zonen des Zellkerns.** HeLa-Zellen wurden transient mit einem Plasmid transfiziert, das für HDAC4-FLAG codiert. A, endogenes HDAC3 wurde mit *anti*-HDAC3-spezifischem Antiserum in Verbindung mit einem mit Cy3-konjugierten sekundären Antikörper nachgewiesen (rot); HDAC4-FLAG wurde mittels *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum zusammen mit einem Alexa488-konjugierten sekundären Antikörper detektiert (grün); zur besseren Darstellung der Expressionsstärke der HDACs sind Aufnahmen in Schwarz und Weiß wiedergegeben; eine repräsentative Zelle ist vergrößert wiedergegeben; DNA im Zellkern wurde mit DAPI angefärbt; B, Analyse wie in (A), jedoch mit *Anti*-HDAC1-Antiserum anstelle von *Anti*-HDAC3-Antiserum; zwei Zellen mit unterschiedlicher Expressionsstärke des HDAC4-FLAG-Fusionsproteins sind gezeigt; der Balken entspricht 10 µm.

Überexpression von HDAC4 induziert die Überexpression von HDAC7-FLAG die Bildung großer Strukturen im Zellkern, die außerordentlich angereichert mit HDAC7-Protein sind. Obwohl derartige Zonen höchstwahrscheinlich artifiziell aufgrund der extremen Überexpression gebildet werden, wurde interessanterweise fast das gesamte endogene HDAC3 in diesen Bereichen angereichert (Abbildung 34 B).

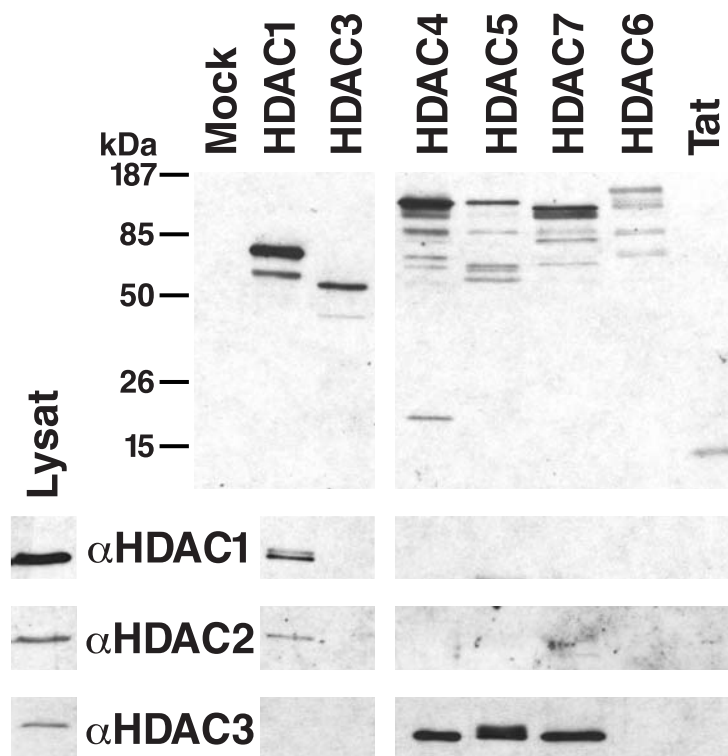


**Abbildung 34. Nachweis der Colokalisation von HDAC7 und HDAC3 im Zellkern von HeLa-Zellen.** HeLa-Zellen wurden transient mit einem Plasmid transfiziert, das für HDAC7-FLAG codiert. Endogenes HDAC3 wurde mit *anti*-HDAC3-spezifischen Antiserum in Verbindung mit einem mit Cy3-konjugierten sekundären Antikörper nachgewiesen (rot). HDAC7-FLAG wurde mittels *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum zusammen mit einem Alexa488-konjugierten sekundären Antikörper detektiert (grün). Zur besseren Darstellung der Expressionsstärke der HDACs sind Aufnahmen in Schwarz und Weiß wiedergegeben. Zwei Zellen mit unterschiedlicher Expressionsstärke des HDAC7-FLAG-Fusionsproteins sind gezeigt (A und B).

### 3.6.8 Untersuchung der Interaktion der HDACs der Klasse II, HDAC5 und HDAC6, mit HDAC3

Aufgrund der äußerst hohen Homologie der HDAC-Domänen von HDAC4, HDAC5, HDAC6 und HDAC7 (siehe Abschnitt 3.1.3), wurde untersucht, ob HDAC5

und HDAC6 ebenfalls mit HDAC3 interagieren. 293-Zellen wurden transient mit Kon-strukten transfiziert, die die Expression von Fusionsproteinen von HDAC1, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6 und dem HIV1 Protein Tat mit C-terminalem FLAG-Epi-top steuern (Abbildung 34). Immunpräzipitate der Fusionsproteine wurden mittels Western Blot analysiert. Der Western Blot mit *Anti*-HDAC3-Antiserum zeigte, daß das HDAC5-FLAG-Immunpräzipitat wie die Immunpräzipitate von HDAC4- und HDAC7-FLAG HDAC3 enthielt. Interessanterweise wurde kein HDAC3 im HDAC6-FLAG-Immunpräzipitat gefunden. HDAC6 ist ein besonderes Protein der HDACs der Klasse II, da es zwei HDAC-Domänen in Serie enthält (siehe Abschnitt 3.1.2). Genauere Untersuchungen zur Bedeutung der beiden HDAC-Domänen in HDAC6 und ihrer kovalenten Bindung sind unter Abschnitt 3.7 beschrieben. Das HDAC1-Immunpräzipitat enthielt, wie erwartet, HDAC2 (Zhang et al., 1997; Zhang



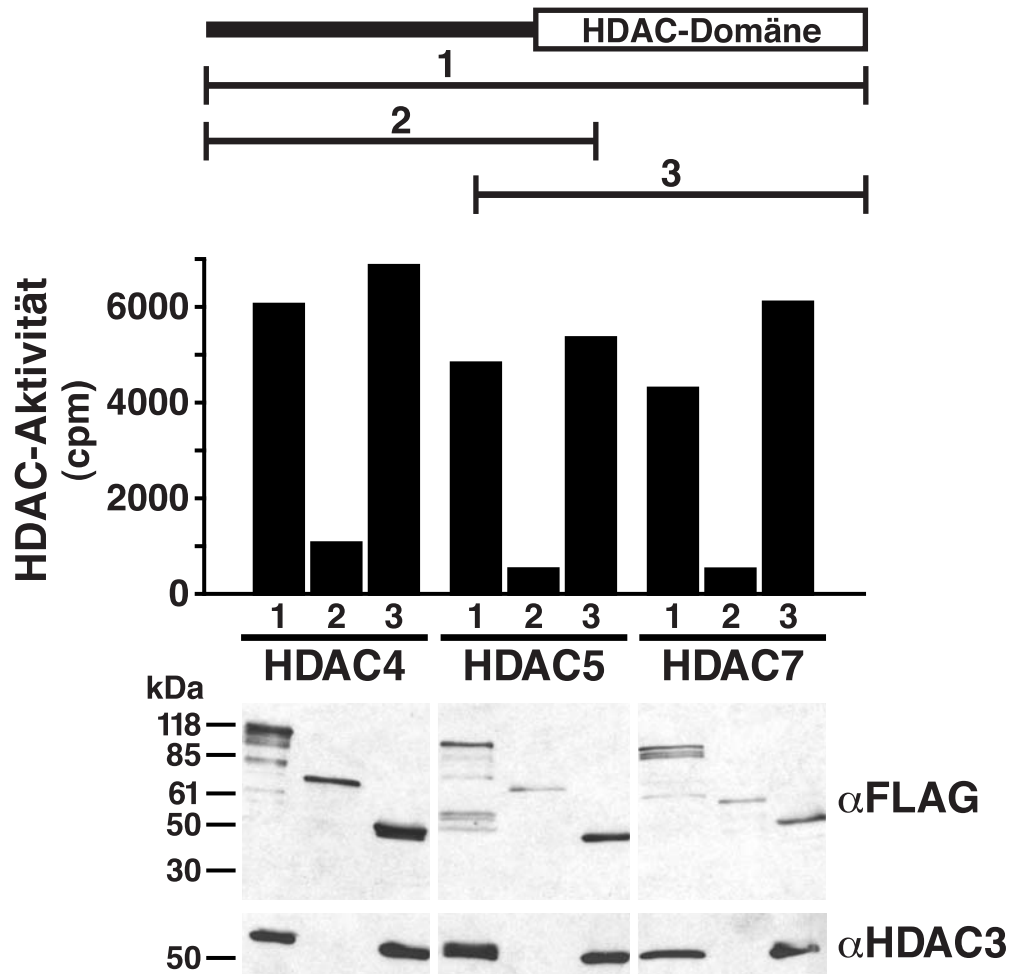
**Abbildung 35. Untersuchung der Interaktion der HDACs der Klasse II, HDAC5 und HDAC6, mit HDAC3.** Konstrukte, die die Expression von HDAC1, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7 und HIV1 Tat (alle mit C-terminalem FLAG-Epitop) steuern, wurden transient in 293-Zellen exprimiert. Die Fusionsproteine wurden mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert und die Immunpräzipitate in Western Blots mit den angegebenen spezifischen

Antisera analysiert. Mock, *Anti*-FLAG-Immunpräzipitation nicht-transfizierter Zellen; Lysat, 10% des für die Immunpräzipitation von nicht-transfizierten Zellen eingesetzten Gesamtzellextrakt. Die Molekulargewichte von Proteinstandards sind auf der linken Seite angegeben. Aufgrund der Interferenz des C-terminalen FLAG-Epitops mit den für die Herstellung der *Anti*-HDAC1- und *Anti*-HDAC3-Antisera verwendeten Epitope werden die entsprechenden immunpräzipitierten HDAC1- und HDAC3-FLAG Fusionsproteine nicht oder nur sehr schwach erkannt.



et al., 1998b; Zhang et al., 1998c; Zhang et al., 1999). Keine Bindung von endogenem HDAC1, HDAC2 oder HDAC3 an überexprimiertes HDAC3 wurde gefunden.

### 3.6.9 Nachweis der spezifischen Bindung von HDAC3 an die C-terminale HDAC-Domäne aller HDACs der Klasse II mit nur einer HDAC-Domäne



**Abbildung 36.** Nachweis der spezifischen Interaktion von HDAC3 mit der C-terminalen HDAC-Domäne der HDACs der Klasse II mit nur einer HDAC-Domäne. Konstrukte mit C-terminalen FLAG-Epitopen entsprechend HDAC4, HDAC5 und HDAC7 (1) oder der N-terminalen (2) oder C-terminalen (3) Domänen wurden transient in 293-Zellen exprimiert [(1) HDAC4(aa 118–1084), (2) HDAC4(aa 118–662), (3) HDAC4(aa 612–1084); (1) HDAC5(aa 131–1122), (2) HDAC5(aa 131–682), (3) HDAC5(aa 646–1122); (1) HDAC7(aa1-912), (2) HDAC7(aa 1-487), (3) HDAC7(aa 438-912)]. Mit *Anti-FLAG*-Antiserum immunpräzipitiertes Material wurde direkt auf enzymatische HDAC-Aktivität getestet (oben) oder in Western Blots mit *Anti-FLAG*- oder *anti-HDAC3*-spezifischen



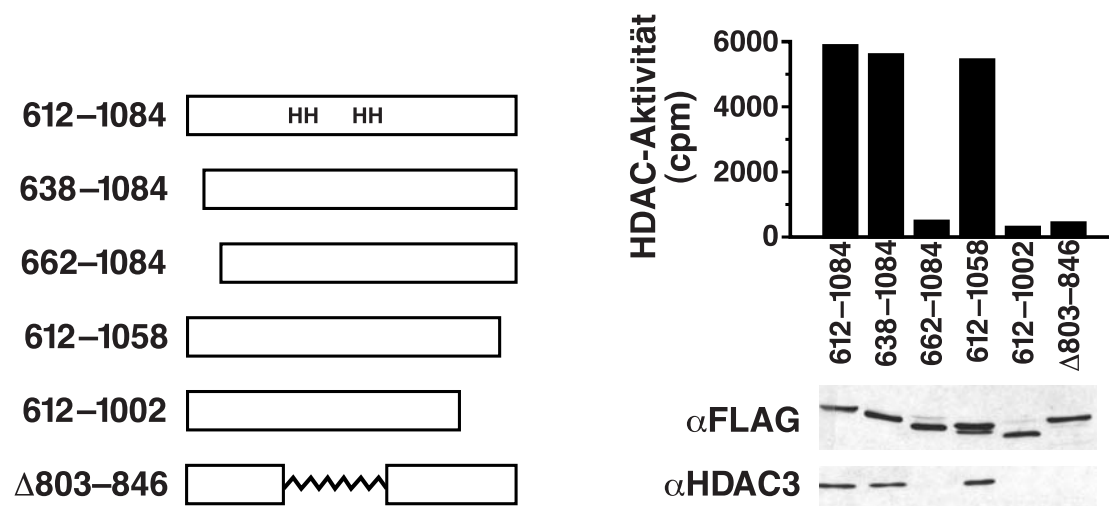
Antiseren analysiert (unten). Die Molekulargewichte (kDa) von Proteinstandards sind auf der linken Seite angegeben.

Deletionsmutanten von HDAC4, HDAC5 und HDAC7 wurden in transienten Transfektionsexperimenten mit anschließender Immunpräzipitation einander gegenübergestellt. Für alle drei HDACs wurde, wie erwartet, keine enzymatische Aktivität für die N-terminale Region gefunden. Volle enzymatische Aktivität, vergleichbar mit der Aktivität der ganzen Proteine, wurde hingegen in den Immunpräzipitaten der C-terminalen HDAC-Domänen gefunden. In *Anti*-HDAC3-Western Blots bestätigte sich, daß jeweils diese Domäne die Wechselwirkung mit HDAC3 vermittelt (Abbildung 36).

### **3.6.10 Detaillierte Untersuchung von HDAC4-Mutanten**

#### **3.6.10.1 Untersuchung von HDAC4-Deletionsmutanten**

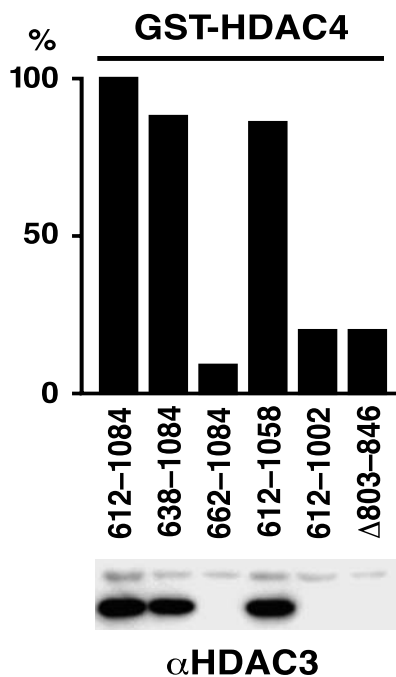
Zur weiteren Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Interaktion von HDACs der Klasse II mit HDAC3 wurde HDAC4 für weitergehende Studien als repräsentativer Faktor ausgewählt. Ausgehend von HDAC4(aa 612-1084) wurden weitere Deletionsmutanten mit C-terminalem FLAG-Epitop hergestellt und transient in 293-Zellen exprimiert (Abbildung 37). Untersuchung der Deletionsmutanten auf enzymatische Aktivität ergab eine minimale katalytisch aktive Domäne von HDAC4(aa 638-1058). Dieselbe minimale Region war auch nötig für die Wechselwirkung mit HDAC3 (Abbildung 37). Alle Deletionsmutanten, die am N- oder C-Terminus kürzer als diese Minimaldomäne waren, verloren gleichzeitig mit der enzymatischen Aktivität die Bindung zu HDAC3. Eine interne Deletion der am stärksten konservierten Region innerhalb des (aa 612-1084)-Fragments ( $\Delta$ 803-846) führte zum Verlust der enzymatischen Aktivität und parallel zum Verlust der Bindung zu HDAC3.



**Abbildung 37. Untersuchung von Deletionsmutanten der C-terminalen HDAC-Domäne in HDAC4.** Die auf der linken Seite schematisch dargestellten Konstrukte wurden mit C-terminalem FLAG-Epitop transient in 293-Zellen exprimiert. Die Fusionsproteine wurden aus Zellextrakten mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Immunpräzipitate wurden auf enzymatische Aktivität im HDAC-Aktivitätstest getestet (rechte Seite, oben) oder über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit *anti*-HDAC3- und *anti*-HDAC4-spezifischen Antiseren analysiert (rechte Seite, unten).

### 3.6.10.2 Untersuchung von rekombinanten HDAC4-Deletionsmutanten

HDAC4-Deletionsmutanten wurden auch als Fusionsproteine mit N-terminalem GST in rekombinanter Form in Bakterien exprimiert. Die über GSH-Affinitätssäulen aufgereinigten Fusionsproteine wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, HDAC3 aus HeLa-Zellextrakten zu binden und enzymatische HDAC-Aktivität zu erzeugen (Abbildung 38). In völliger Übereinstimmung mit den in Zellkulturrexperimenten nach Transfektion erhaltenen Resultaten war eine minimale Region von HDAC4 entsprechend aa 638-1058 nötig, HDAC3 zu binden und enzymatische Aktivität zu produzieren. Deletionsmutanten, die in Zellkulturrexperimenten nach Transfektion inaktiv waren und HDAC3 nicht banden, wiesen auch in rekombinanter Form keine enzymatische Aktivität auf und waren nicht in der Lage, HDAC3 aus dem Zellextrakt zu rekrutieren.



**Abbildung 38. Untersuchung von rekombinanten Deletionsmutanten der C-terminalen HDAC-Domäne in HDAC4.** Die in Abbildung 37 schematisch dargestellten HDAC4-Deletionsmutanten wurden als Fusionsproteine mit N-terminalem GST in Bakterien exprimiert. Die an GSH-Agarose immobilisierten Fusionsproteine wurden mit Kernextrakten von HeLa-Zellen inkubiert. Die enzymatische HDAC-Aktivität der rekombinanten HDAC4-Deletionsmutanten ist im Verhältnis zur Aktivität der HDAC4(aa 612-1084)-Deletionsmutanten (= 100%) als Durchschnitt von vier unabhängigen Experimenten angegeben (oben). An rekombinante GST-HDAC4-Fusionsproteine gebundenes zelluläres Material wurde im Western Blot mit *anti*-HDAC3-spezifischem Antiserum analysiert (unten).

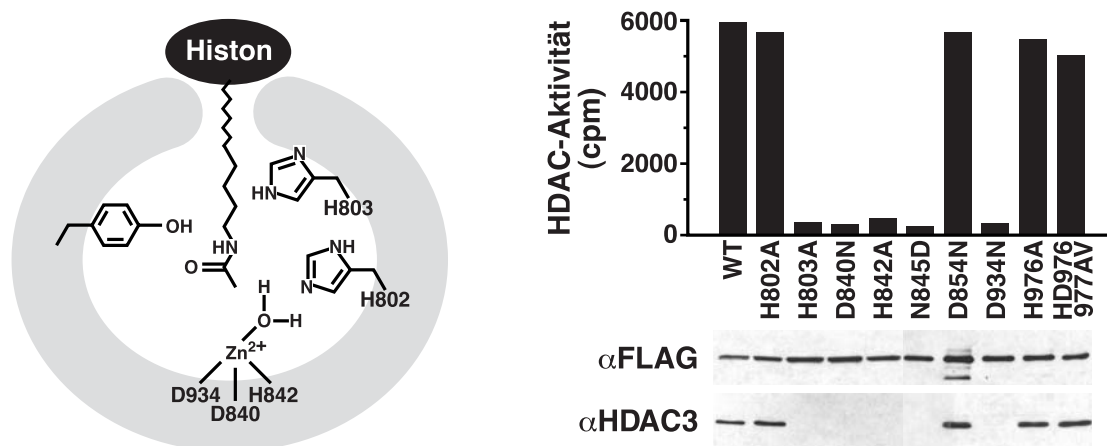
### 3.6.10.3 Untersuchung von HDAC4-Punktmutanten

Die primäre Sequenz der HDAC-Domänen der HDACs der Klasse II ist äußerst konserviert, nicht nur wenn einzelne Faktoren innerhalb dieser Familie miteinander verglichen werden, sondern auch im Vergleich zu HDACs der Klasse I und zu den Hefeproteinen yRPD3 und yHDA1 (Finnin et al., 1999; Fischle et al., 1999). Während der Durchführung dieser Arbeit wurde zudem die dreidimensionale Struktur eines prokaryontischen Proteins aufgeklärt, das eine hohe Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu HDACs aufweist. Obwohl Prokaryonten selbst keine Histoneproteine enthalten, konnte in enzymatischen Aktivitätstests tatsächlich eine schwache HDAC-Aktivität dieses Proteins nachgewiesen werden (*“histone deacetylase like protein”*, HDLP; Finnin et al., 1999).

Ausgehend von diesen Informationen wurden mehrere Punktmutanten von HDAC4 hergestellt, die einen Austausch von für den katalytischen Mechanismus potentiell wichtigen Aminosäuren darstellen (Abbildung 39). Alle Punktmutanten wurden mit C-terminalem FLAG-Epitop transient in 293-Zellen exprimiert und mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Immunpräzipitate wurden auf enzymatische HDAC-Aktivität und auf die Bindung von HDAC3 getestet. Austausch von Histidin in Aminosäureposition 803 (H803A) und Aspartat in Aminosäuren-

position 840 (D840A) von HDAC4 führte dabei zu einem totalen Verlust der HDAC-Aktivität. Ähnliche Ergebnisse wurden unabhängig von anderen Forschungsgruppen berichtet (Miska et al., 1999) und stimmen mit entsprechenden Resultaten orthologer Mutationen in HDAC1 und yRPD3 überein (Hassig et al., 1998; Kadosh und Struhl, 1998a). Interessanterweise führten diese Punktmutationen gleichzeitig zum Verlust der Bindung zu HDAC3. Die Punktmutanten H842A, N845D und D934N wiesen denselben Phenotyp auf: Verlust der enzymatischen Aktivität parallel zum Verlust der Bindung zu HDAC3. Tatsächlich war es nicht möglich, eine Punktmutation in HDAC4 zu finden, die nicht gleichzeitig zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität und der Bindung zu HDAC3 führte.

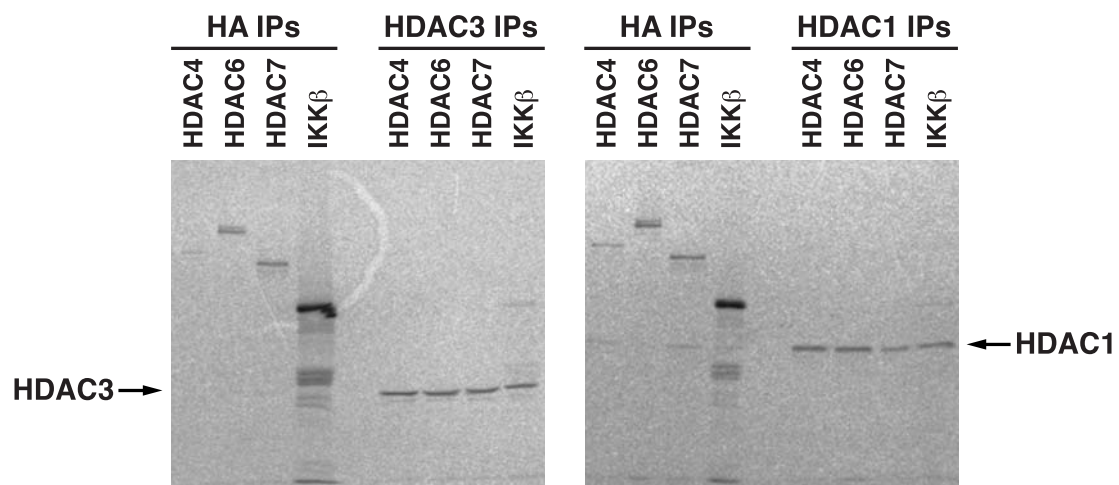
Die Punktmutationen H802A und D854N, die auf der Basis der dreidimensionalen Struktur und dem daraus abgeleiteten hypothetischen katalytischen Mechanismus von HDLP die enzymatische Aktivität von HDAC4 reduzieren sollten (Finnin et al., 1999), zeigten hingegen keinerlei Effekt. Diese Beobachtung ist in starkem Kontrast zu entsprechenden Mutationen in yRPD3 (H802 in HDAC4 entspricht H150 in yRPD3), die zum völligen Verlust der enzymatischen Aktivität dieses Faktors führen (Kadosh und Struhl, 1998a).



**Abbildung 39. Analyse von Punktmutanten der C-terminalen HDAC-Domäne in HDAC4.** Links, schematische Modellierung der HDAC4-Primärstruktur auf die dreidimensionale Struktur von HDLP (Finnin et al., 1999); rechts, HDAC4(aa 612-1084) (WT) oder diesem Konstrukt entsprechende HDAC4-Punktmutanten wurden mit C-terminalem FLAG-Epitop transient in 293-Zellen exprimiert. Mit *Anti-FLAG*-Antiserum immunpräzipitiertes Material wurde direkt auf enzymatische HDAC-Aktivität getestet (oben) oder in Western Blots mit *anti-FLAG*- oder *anti-HDAC3*-spezifischen Antisera analysiert (unten).

### 3.6.11 Bindungsstudien rekombinanter HDAC4- und HDAC7-Proteine mit rekombinantem HDAC3

Anhand rekombinanter Proteine wurde untersucht, ob HDAC4 und HDAC7 HDAC3 direkt binden. HDAC4-HA, HDAC6-HA, HDAC7-HA und IKK $\beta$ -HA (eine zytoplasmatische Kinase, die an der Regulation inflammatorischer Reaktionen beteiligt ist) sowie HDAC1 und HDAC3 wurden im Retikulozytenlysat in Gegenwart von [ $^{35}$ S]-Methionin hergestellt. Die Translationsreaktionen von HDAC4-HA, HDAC6-HA, HDAC7-HA und IKK $\beta$ -HA wurden anschließend jeweils mit den Translationsreaktionen für HDAC3 oder HDAC1 versetzt und die HA-Fusionsproteine mittels *anti*-HA-spezifischem Antiserum sowie HDAC1 und HDAC3 mittels den für diese Faktoren spezifischen Antiseren immunpräzipitiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die präzipitierten Immunkomplexe über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels  $^{35}$ S-Autoradiographie analysiert (Abbildung 40). Trotz mehrfacher Versuche mit getrennter und kombinierter Translation, unterschiedlichen Mischverhältnissen



**Abbildung 40. Bindungsstudien von HDAC4 und HDAC7 mit HDAC3.** cDNAs für HDAC4, HDAC6, HDAC7 und IKK $\beta$  mit C-terminalem HA-Epitop wurden im Retikulozytenlysat in Gegenwart von [ $^{35}$ S]-Methionin translatiert. Die Translationsreaktionen wurden entweder mit im Retikulozytenlysat-translatiertem HDAC1 (rechte Seite) oder HDAC3 (linke Seite) gemischt. Rekombinante Proteine wurden mit *anti*-HA-spezifischem Antiserum (HA IPs), *anti*-HDAC1-spezifischem Antiserum (HDAC1 IPs) oder *anti*-HDAC3-spezifischem Antiserum (HDAC3 IPs) immunpräzipitiert. Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und über  $^{35}$ S-Autoradiographie analysiert. Die HDAC1 und HDAC3 entsprechenden Banden sind durch Pfeile markiert.

nissen der rekombinanten Proteine, sowie verschiedenen Bindungs- und Waschpuffern konnte keine spezifische Bindung von HDAC3 an HDAC4 oder HDAC7 erhalten werden. Bei reduzierter Stringenz der Bindungs- und Waschbedingungen wurde vielmehr eine Assoziation von HDAC1 mit HDAC4 und HDAC7 beobachtet (Abbildung 40). Da in Zellkulturexperimenten unter verschiedensten Bedingungen keinerlei Bindung von HDAC1 an diese HDACs der Klasse II beobachtet wurde (siehe Abschnitte 3.6.3 - 3.6.6) und außerdem bei gleichen Bedingungen überhaupt keine Bindung mit HDAC3 erhalten wurde, wird angenommen, daß diese Interaktion ein Potential zur gegenseitigen Bindung unterschiedlicher HDACs indizieren könnte, jedoch im Kontext der durchgeführten Untersuchungen unspezifisch ist.

### **3.6.12 Identifizierung zellulärer Faktoren, die die Bindung von HDAC4 und HDAC7 mit HDAC3 vermitteln**

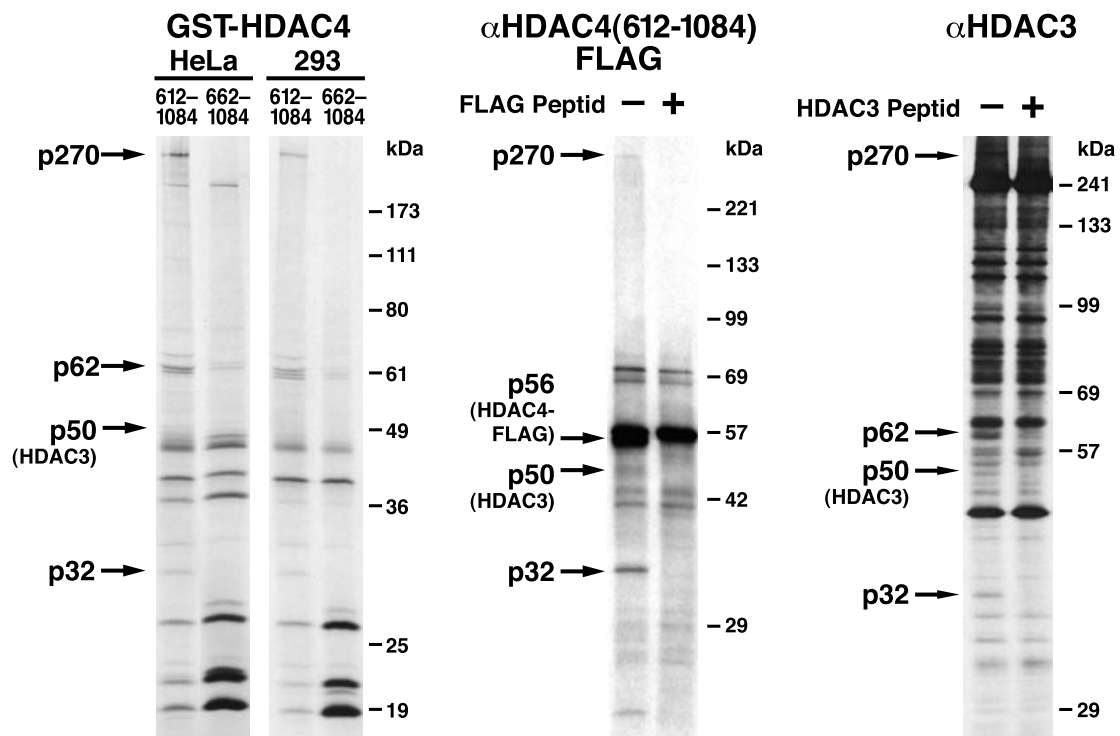
#### **3.6.12.1 Affinitätschromatographische Identifizierung von Proteinen, die HDAC4 und HDAC3 spezifisch binden**

Da Versuche, eine direkte Bindung zwischen HDAC4- und HDAC3-Proteinen nachzuweisen, scheiterten, und es nicht möglich war, einen enzymatisch aktiven HDAC4/HDAC3-Komplex aus rekombinanten Proteinen herzustellen, wurde angenommen, daß zusätzliche Faktoren und/oder spezifische posttranslationale Modifizierungen für die Bildung funktionell aktiver Komplexe nötig sein könnten. Um Komponenten der enzymatisch aktiven HDAC4-Komplexe zu identifizieren, wurden diese über Affinitätschromatographie aufgereingt. Dabei wurden sowohl rekombinante GST-HDAC4-Fusionsproteine als auch spezifische Antiseren eingesetzt (Abbildung 41).

Zellextrakte metabolisch mit [<sup>35</sup>S]-Methionin und [<sup>35</sup>S]-Cystein markierter HeLa- und 293-Zellen wurden auf GST-HDAC4(aa 612-1084)- oder GST-HDAC4(aa 662-1084)-Affinitätssäulen aufgetragen. Nach intensivem Waschen wurden gebundene Proteine direkt mit Laemmli-Probenpuffer eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Drei Polypeptide, p270, p62 und p32, wurden sowohl aus HeLa- als auch aus 293-Zellextrakten spezifisch an das enzymatisch aktive Fragment GST-HDAC4(aa

612-1084) gebunden. Nach längerer Exposition des Filmes konnten noch weitere schwächere Banden identifiziert werden, darunter ein Polypeptid von 50 kDa, das höchstwahrscheinlich HDAC3 entspricht.

Neben GST-Fusionsproteinen wurde auch eine Zelllinie verwendet, die das enzymatisch aktive Fragment von HDAC4, HDAC4(aa 612-1084), mit C-terminaler



**Abbildung 41. Nachweis der spezifischen Bindung zellulärer Proteine an HDAC4 und HDAC3.** 293- und HeLa-Zellen sowie 293-Zellen, die HDAC4(aa 612-1084)-FLAG konstitutiv exprimieren, wurden metabolisch mit [<sup>35</sup>S]-Methionin und [<sup>35</sup>S]-Cystein markiert. Links, Gesamtzellextrakte von HeLa- und 293-Zellen wurden mit GST-HDAC4(aa 612-1084) und GST-HDAC4(aa 662-1084) inkubiert; Mitte, HDAC4(aa 612-1084)-FLAG wurde aus Extrakten der Zelllinie, die dieses Fusionsprotein konstitutiv exprimiert, mit *anti*-FLAG-spezifischen Antiserum immunpräzipitiert (-FLAG Peptid); zur Kontrolle der Spezifität der Immunpräzipitation wurde das *anti*-FLAG-spezifische Antiserum mit einem molaren Überschuß an FLAG-Peptid blockiert (+FLAG Peptid); rechts, *Anti*-HDAC3-Immunpräzipitation aus HeLa-Zellextrakten (-HDAC3-Peptid); zur Kontrolle der Spezifität der Immunpräzipitation wurde das *anti*-HDAC3-spezifische Antiserum mit einem molaren Überschuß an Peptid blockiert, das für die Herstellung des Antiserums verwendet worden war (+HDAC3 Peptid). Die <sup>35</sup>S-Autoradiogramme der über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, die an die jeweiligen Affinitätsmaterialien gebunden hatten, sind gezeigt. Proteine, die spezifisch gebunden waren, sind anhand ihres Molekulargewichts indiziert. Die Molekulargewichte (kDa) von Proteinstandards sind jeweils auf der rechten Seite angegeben.

FLAG-Sequenz konstitutiv exprimiert. Zelluläre Proteine dieser Zelllinie wurden metabolisch mit [<sup>35</sup>S]-Methionin und [<sup>35</sup>S]-Cystein markiert. Gesamtzellextrakte wurden entweder auf eine Säule mit kovalent gebundenen *Anti*-FLAG-Antikörpern oder auf einer Säule, bei der die *Anti*-FLAG-Antikörper durch einen molaren Überschuß an FLAG-Peptid blockiert waren, aufgetragen. Nach dem Waschen der Säulen wurden gebundene Proteine mit Laemmli-Probenpuffer eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurden dieselben Polypeptide, die spezifisch an GST-HDAC4(aa 612-1084) gebunden hatten, als Bindungspartner von HDAC4(aa 612-1084)-FLAG durch Vergleich der blockierten und nicht blockierten Immunaффinitätsaufreinigungen im <sup>35</sup>S-Autoradiogramm nachgewiesen (Abbildung 41).

Um zu untersuchen, ob dieselben Polypeptide auch an HDAC3 binden, wurden Gesamtzellextrakte metabolisch mit [<sup>35</sup>S]-Methionin und [<sup>35</sup>S]-Cystein markierter HeLa-Zellen mit *anti*-HDAC3-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Zur Kontrolle der Spezifität der Immunpräzipitation wurde das *anti*-HDAC3-spezifische Antiserum mit einem molaren Überschuß an Peptid blockiert, das für die Herstellung des Antiserums verwendet worden war. Die Immunpräzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und über <sup>35</sup>S-Autoradiographie analysiert. Da das *Anti*-HDAC3-Antiserum im Gegensatz zum monoklonalen *Anti*-FLAG-Antiserum polyklonalen Ursprungs ist, wurden weit mehr unspezifisch bindende Proteine nachgewiesen. Derartig unspezifisch gebundene Faktoren ließen sich jedoch relativ leicht durch Vergleich der blockierten und nicht blockierten Immunaффinitätsaufreinigungen identifizieren. Polypeptide von 270, 62 und 32 kDa waren spezifisch an HDAC3 gebunden. Die Übereinstimmung der Molekulargewichte der an GST-HDAC4(aa 612-1084), HDAC4(aa 612-1084)-FLAG und HDAC3 gebundenen Polypeptide läßt darauf schließen, daß es sich bei einem oder mehreren dieser Faktoren um an der Bindung von HDAC3 und HDAC4 beteiligte Faktoren handeln könnte.

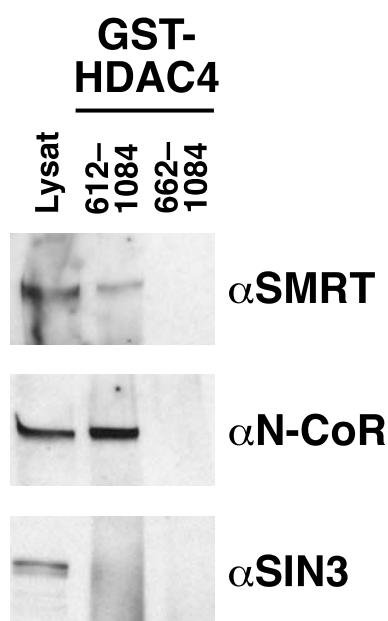
### **3.6.12.2 Immunchemische Identifizierung der gleichzeitig von HDAC4 und HDAC3 gebundenen hochmolekularen Faktoren**

Zur weiteren Identifizierung der Faktoren, die gleichzeitig HDAC4 und HDAC3 binden, wurde die GST-HDAC4-Aффinitätschromatographie in größerem



Maßstab durchgeführt. Erste Versuche waren vielversprechend und erlaubten den Nachweis zumindest des p270-Proteins nach Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen (Abbildung nicht gezeigt). Dabei konnte eine Menge dieses Faktors angereichert werden, die vermutlich ausgereicht hätte, das Protein über MALDI TOF-Analyse (“*matrix assisted laser desorption ionization time of flight masspectrometry*”) kombiniert mit der Suche in Datenbanken zu identifizieren. Während diese experimentellen Ansätze verfolgt wurden, zeigten unabhängig von diesen Untersuchungen durchgeführte Studien, daß HDAC3 ein Bestandteil hochmolekularer Proteinkomplexe der Corepressorproteine N-CoR und SMRT ist (Guenther et al., 2000; Li et al., 2000; Underhill et al., 2000; Urnov et al., 2000; Wen et al., 2000). Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß HDAC4, HDAC5 und HDAC7 an eben diese Corepressorproteine binden (Huang et al., 2000; Kao et al., 2000). N-CoR und SMRT sind äußerst große Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 270 kDa.

Aufgrund dieser Resultate lag es nahe, direkt zu testen, ob es sich bei dem unbekanntem Faktor p270 um N-CoR oder SMRT handeln könnte. Proteine aus HeLa-Zellextrakten, die von GST-HDAC4(aa 612-1084) oder GST-HDAC4(aa 662-1084) gebunden wurden, wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit *anti-N-CoR*-, *anti-SMRT*- und *anti-SIN3*-spezifischen Antiseren analysiert (Abbildung 42). SIN3 ist ein weiteres hochmolekulares Corepressorprotein, das unter anderem in Multiproteinkomplexen gefunden wurde, die sowohl HDAC1 als auch HDAC2

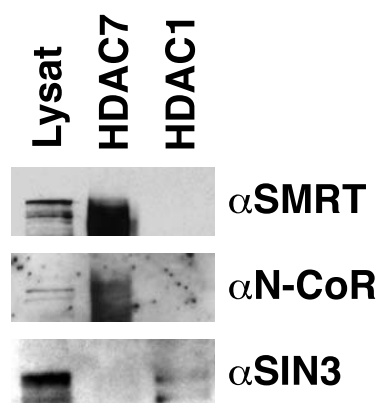


**Abbildung 42. Identifizierung der spezifisch mit HDAC4 und HDAC3 interagierenden Faktoren als N-CoR und SMRT.** Die angegebenen GST-HDAC4-Fusionsproteine wurden in Bakterien exprimiert und an GSH-Agarose gebunden. Nach der Inkubation mit Kernextrakten von HeLa-Zellen wurden Proteine, die von den GST-HDAC4-Fusionsproteinen gebunden wurden, in Western Blots mit *anti-N-CoR*-, *anti-SMRT*- und *anti-SIN3*-spezifischen Antiseren analysiert. Lysat, 10% des für die Bindungsstudien eingesetzten Kernextrakts.

enthalten (Laherty et al., 1997; Zhang et al., 1997). N-CoR und SMRT wurden spezifisch von GST-HDAC4(aa 612-1084) gebunden, nicht aber von GST-HDAC4(aa 662-1084). SIN3 hingegen interagiert weder mit GST-HDAC4(aa 612-1084) noch mit GST-HDAC4(aa 662-1084). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß es sich bei p270 um die beiden Corepressorproteine N-CoR und SMRT handelt.

### 3.6.13 Untersuchung der Bindung von SMRT und N-CoR an HDAC7

Da die enzymatische Aktivität von HDAC7 ebenfalls von HDAC3 abhängig ist, wurde untersucht ob HDAC7 auch an N-CoR und SMRT bindet. HDAC7-FLAG und HDAC1-FLAG wurden transient in 293-Zellen exprimiert. Die Fusionsproteine wurden mittels *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert und gebundene Proteine mittels Western Blot analysiert (Abbildung 43). N-CoR und SMRT wurden spezifisch in Immunpräzipitaten von HDAC7-FLAG nachgewiesen, nicht aber in Immunpräzipitaten von HDAC1-FLAG. SIN3 hingegen wurde lediglich im HDAC1-FLAG-Immunpräzipitat gefunden.

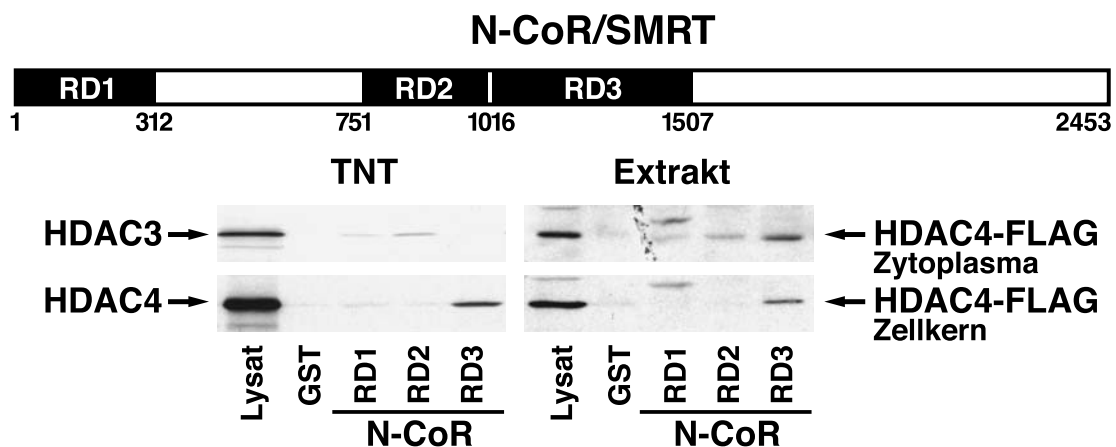


**Abbildung 43. Nachweis der spezifischen Interaktion von HDAC7-FLAG mit N-CoR und SMRT.** Plasmide, die für HDAC7-FLAG oder HDAC1-FLAG codieren wurden in 293-Zellen transfiziert. *Anti*-FLAG-Immunpräzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit den angegebenen spezifischen Antiseren analysiert. Lysat, 10% des für die Immunpräzipitation eingesetzten Gesamtzell-extrakts der mit HDAC7-FLAG transfizierten Zellen.

### 3.6.14 Bestimmung der HDAC4- und HDAC3-Bindungsdomänen in N-CoR

Das N-CoR Corepressorprotein enthält drei separate Domänen (sogenannte Repressordomänen RD1, RD2 und RD3), die unabhängig voneinander in der Lage sind, die Transkription von Zielgenen zu inhibieren (Abbildung 44; Horlein et al.,

1995; Ordentlich et al., 1999; Park et al., 1999; Huang et al., 2000). Diese Domänen wurden zunächst funktionell in sogenannten Reporter-“Assays” definiert (Horlein et al., 1995; Ordentlich et al., 1999; Park et al., 1999). Später konnte unabhängig gezeigt werden, daß diese Domänen in der Lage sind, HDACs zu binden (Guenther et al., 2000; Huang et al., 2000; Kao et al., 2000). Um zu testen, ob diese Domänen an der Vermittlung der Bindung zwischen HDAC4 und HDAC3 beteiligt sind, wurden RD1, RD2, und RD3 als rekombinante Fusionsproteine mit N-terminalem GST in Bakterien exprimiert und durch GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt. HDAC4 und HDAC3 wurden in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin im Retikulozytenlysat translatiert und mit den rekombinanten RD-Fusionsproteinen inkubiert. Nach intensivem Waschen wurde das gebundene Material mit SDS-Laemmli-Probenpuffer eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 44). Rekombinantes HDAC3 wurde dabei mit größerer Affinität von GST-RD2 als GST-RD1 gebunden. Keine Bindung wurde hin-



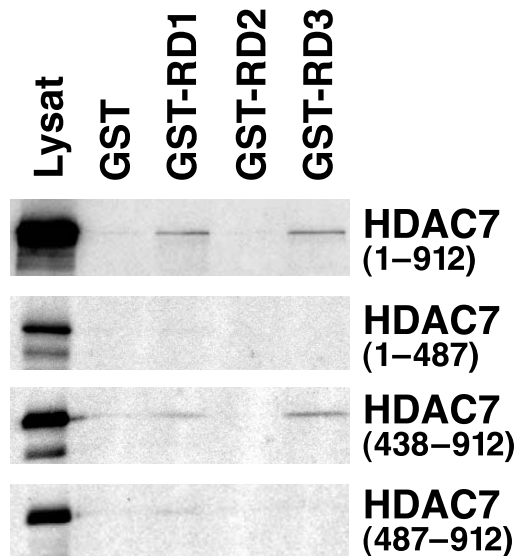
**Abbildung 44. Schematische Darstellung der N-CoR/SMRT Corepressorproteine und Bindungsstudien von HDAC4 und HDAC3 an verschiedene Domänen von N-CoR.** TNT, HDAC3 und HDAC4 wurden in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin im Retikulozytenlysat translatiert und mit rekombinanten GST-Fusionsproteinen der Repressordomänen von N-CoR inkubiert (RD1, RD2 und RD3); gebundenes Material wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels <sup>35</sup>S-Autoradiographie analysiert; Lysat, jeweils 10% der für die Bindungsstudien eingesetzten Translationsreaktionen; Extrakt, Zytoplasma- oder Kernextrakte einer 293-Zelllinie, die HDAC4-FLAG konstitutiv exprimiert, wurden mit GST-RD1, GST-RD2 oder GST-RD3 inkubiert; spezifisch an die GST-Fusionsproteine gebundenes Material wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum analysiert; Lysat, jeweils 10% der für die Bindungsstudien eingesetzten subzellulären Extrakte.

gegen an GST-RD3 nachgewiesen. Rekombinantes HDAC4 wurde effizient lediglich von GST-RD3 gebunden. Die schwächere Bindung an GST-RD1 und GST-RD2 muß als unspezifisch gelten, da unter den gewählten Bedingungen auch eine ähnlich schwache Bindung an GST festgestellt wurde.

Zur weiteren Analyse der Bindung von HDAC4 an N-CoR und speziell an die RD3-Domäne dieses Corepressorproteins wurden die rekombinanten GST-RD-Fusionsproteine mit Kern- oder Zytoplasmaextrakten einer 293-Zelllinie inkubiert, die HDAC4-FLAG konstitutiv exprimiert. Die Analyse der Bindung erfolgte hierbei mittels Western Blot mit einem für das FLAG-Epitop spezifischen Antiserum (Abbildung 45). Natives, zelluläres HDAC4 aus den subzellulären Extrakten wurde lediglich von der RD3-Domäne mit guter Effizienz gebunden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß HDAC4 und HDAC3 gleichzeitig über verschiedene Domänen an N-CoR gebunden sein könnten.

### **3.6.15 Identifizierung der HDAC7-bindenden Domänen in N-CoR**

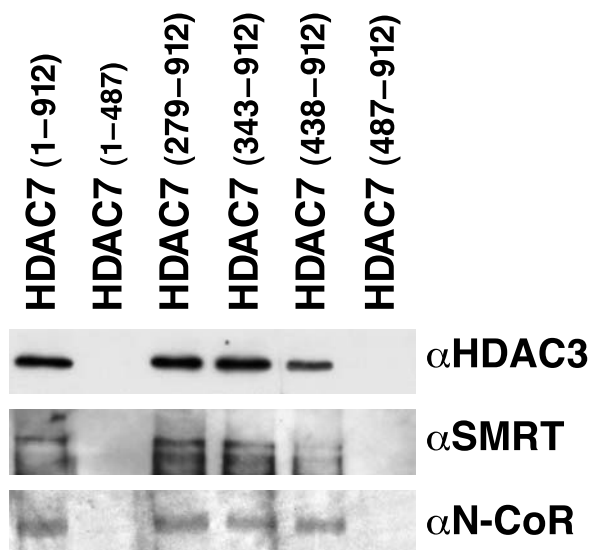
Die Domäne N-CoRs, die HDAC7 bindet, wurde ebenfalls in Experimenten mit rekombinanten GST-RD-Fusionsproteinen bestimmt (siehe vorherigen Abschnitt 3.6.14). HDAC7(aa 1-912), die N-terminale Region HDAC7(aa 1-487), die enzymatisch aktive C-terminale Region HDAC7(aa 438-912), sowie die enzymatisch inaktive C-terminale Region HDAC7(aa 487-912) wurden in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin im Retikulozytenlysat translatiert und mit den rekombinanten GST-RD-Fusionsproteinen oder GST inkubiert. Spezifisch gebundenes Material wurde mit SDS-Laemmli-Probenpuffer eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 45). Lediglich HDAC7-Fusionsproteine, welche die für die enzymatische Aktivität essentielle C-terminale Domäne (aa 438-912) enthalten [HDAC7(aa 1-912) und HDAC7(aa 438-912)], wurden von GST-RD1 und GST-RD3 gebunden. Eine Bindung rekombinanter HDAC7-Proteine an die HDAC3-bindende RD2-Domäne konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit der Hypothese, daß N-CoR (und SMRT) die funktionelle Bindung zwischen HDAC7 und HDAC3 vermitteln könnten, wurde keine Bindung der N-terminalen oder der enzymatisch inaktiven C-terminalen Regionen von HDAC7 an N-CoR-RD-Domänen festgestellt.



**Abbildung 45. Untersuchung der Interaktion rekombinanter N-CoR- und HDAC7-Proteine.** cDNAs, die für die angegebenen HDAC7-Proteine codieren wurden in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin im Retikulozytenlysat translatiert und mit rekombinanten GST-RD1-, GST-RD2- und GST-RD3-Fusionsproteinen inkubiert. Gebundenes Material wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels <sup>35</sup>S-Autoradiographie analysiert. Lysat, jeweils 10% der für die Bindungsstudien eingesetzten Translationsreaktionen.

### 3.6.16 Untersuchung der Bindung von HDAC7-Deletionsmutanten an N-CoR und SMRT

Zur weiteren Untersuchung der Bindung von HDAC7 an N-CoR und SMRT wurden folgende HDAC7-Konstrukte mit C-terminalem FLAG-Epitop transient in 293-Zellen exprimiert (siehe Abschnitt 3.5.2): HDAC7(aa 1-912), HDAC7(aa 1-487), HDAC7(aa 279-912), HDAC7(aa 343-912), HDAC7(aa 438-912) und HDAC7(aa 487-912). Die Fusionsproteine und an diese fest gebundene zelluläre Faktoren wur-

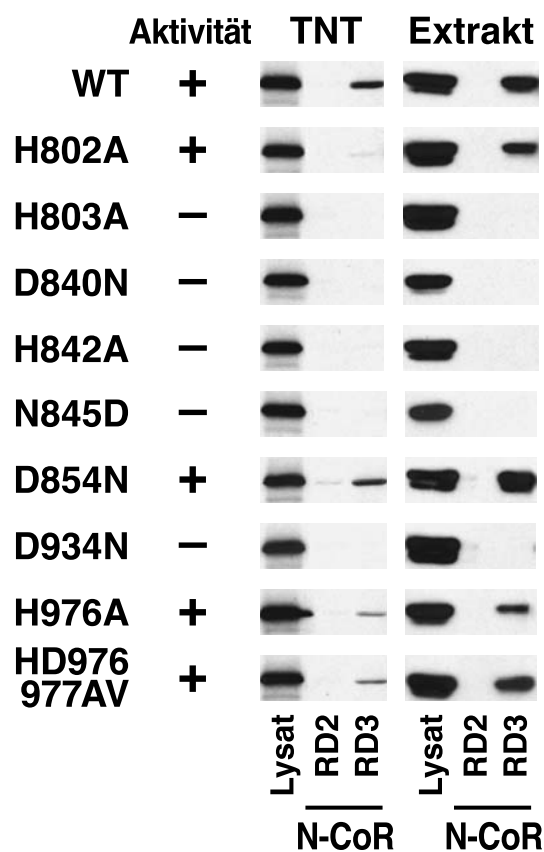


**Abbildung 46. Untersuchung der Bindung von HDAC7-Deletionsmutanten an HDAC3, SMRT und N-CoR.** Plasmide, die für die angegebenen Fragmente von HDAC7 (alle mit C-terminalem FLAG-Epitop) codieren, wurden in 293-Zellen transfiziert. Anti-FLAG-Immupräzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit den angegebenen spezifischen Antisera analysiert.

den mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit *anti*-HDAC3-, *anti*-SMRT- und *anti*-N-CoR-spezifischen Antiseren analysiert (Abbildung 46). Alle Fusionsproteine, die die für die enzymatische Aktivität notwendige Minimaldomäne HDAC7(aa 438-912) enthielten (siehe Abschnitt 3.5.2) interagierten sowohl mit HDAC3 als auch mit SMRT und N-CoR. Die N-terminale Region HDAC7(aa 1-487) oder die enzymatisch inaktive C-terminale Domäne HDAC7(aa 487-912) hingegen hatten weder HDAC3, SMRT noch N-CoR gebunden.

### 3.6.17 Untersuchung der Bindung von HDAC4-Punktmutanten an N-CoR

Der Zusammenhang zwischen der enzymatischen Aktivität von HDACs der



**Abbildung 47. Untersuchung der Bindung von HDAC4-Punktmutanten an N-CoR.** HDAC4(aa 612-1084) (WT) oder die diesem Konstrukt entsprechenden HDAC4-Punktmutanten wurden mit C-terminalem FLAG-Epitop entweder in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin im Retikulozytenlysat translatiert (TNT) oder transient in 293-Zellen exprimiert (Extrakt). Die Translationsreaktionen oder Gesamtzellextrakte der transienten Expression wurden mit rekombinanten GST-RD2(N-CoR)- und GST-RD3(N-CoR)-Proteinen inkubiert. Spezifisch an die GST-Fusionsproteine gebundenes Material wurde mit Laemmli-Probenpuffer eluiert und über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Analyse der Bindung erfolgte entweder über <sup>35</sup>S-Autoradiographie (TNT) oder durch Western Blots mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum (Extrakt). Lysat, 10% der jeweils für die Bindungsstudien eingesetzten Translationsreaktionen oder Zellextrakte.

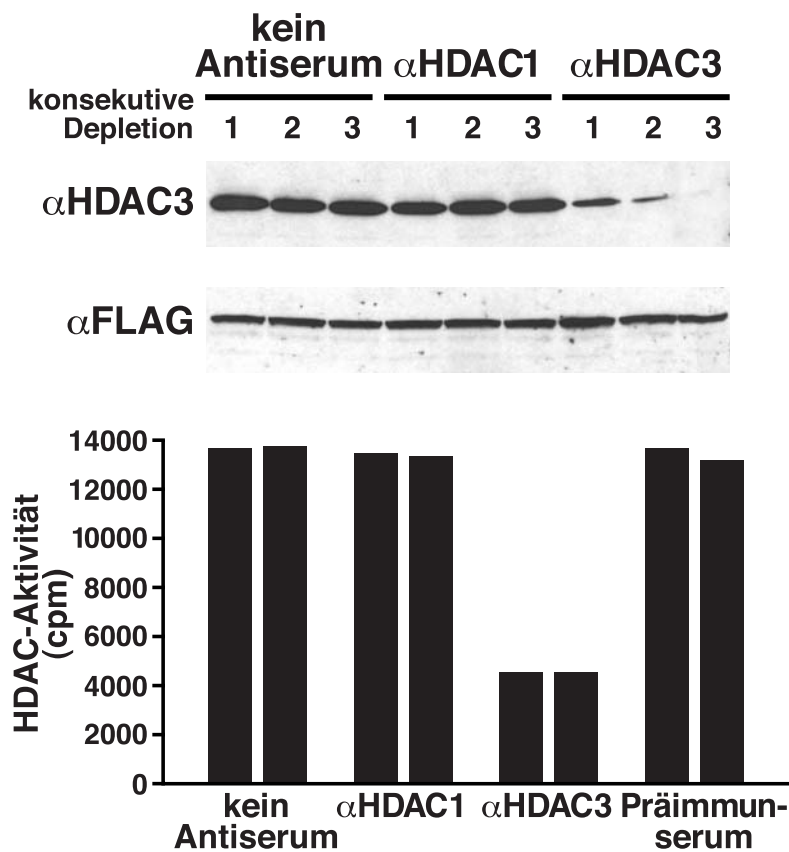
Klasse II, der Bindung zu HDAC3 und der Brückenfunktion der Corepressorproteine SMRT und N-CoR wurde außerdem mittels HDAC4-Punktmutanten untersucht. Die unter Abschnitt 3.6.10.2 beschriebenen HDAC4-Punktmutanten mit C-terminalem FLAG-Epitop wurden entweder in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin im Retikulozytenlysat translatiert oder transient in 293-Zellen exprimiert. Die Translationsreaktionen (TNT) oder zelluläre Extrakte der transienten Expression (Extrakt) wurden mit rekombinanten GST-RD2- und GST-RD3-Proteinen inkubiert. Spezifisch an die GST-Fusionsproteine gebundenes Material wurde mit Laemmli-Probenpuffer eluiert und über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Analyse der Bindung erfolgte entweder über <sup>35</sup>S-Autoradiographie (rekombinante <sup>35</sup>S-markierte Proteine) oder durch Western Blots mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum (transient in 293-Zellen exprimierte Proteine). In Übereinstimmung mit einer Rolle der Corepressorproteine N-CoR und SMRT bei der Vermittlung der Bindung zwischen HDAC4 und HDAC3 und damit der enzymatischen Aktivität von HDAC4 wurden alle Punktmutanten, die enzymatische Aktivität aufweisen (H802A, D854N, H976A, HD976977AV), von GST-RD3 gebunden (Abbildung 47). Diese Bindung war von der Natur der eingesetzten Proteine (rekombinant oder transient in Zellkultur exprimiert) unabhängig. Keine der Punktmutanten, die enzymatisch nicht aktiv sind (H803A, D840N, H842A, N845D, D934N), zeigten hingegen irgendwelche Bindung an GST-RD3.

### **3.6.18 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von HDAC4 in Abwesenheit von HDAC3**

Die bisher geschilderten Untersuchungen zeigen, daß HDAC4 spezifisch mit HDAC3 interagiert und daß HDAC3 eine wesentliche Rolle für die enzymatische Aktivität von HDAC4 spielt. Zur weiteren Untersuchung der enzymatischen Aktivität der HDACs der Klasse II und besonders von HDAC4 war es erstrebenswert, Methoden und Verfahren zu entwickeln, die eine Analyse der enzymatischen Aktivität dieses Faktors in Abwesenheit von HDAC3 ermöglichen.

### 3.6.18.1 HDAC3-Immundepletion

Gesamtzellextrakte einer 293-Zelllinie, die HDAC4-FLAG konstitutiv exprimiert, wurden wiederholt mit *anti*-HDAC3- oder *anti*-HDAC1-spezifischen Antisera immunpräzipitiert. Zur Kontrolle wurden ebenso Immunpräzipitationen mit *Anti*-HDAC3-Präimmunsereum oder ohne Antiserum durchgeführt (Abbildung 48). Die nach der Immunpräzipitation in den Extrakten verbleibende Menge an HDAC3 wurde in Western Blots mit *anti*-HDAC3-spezifischem Antiserum bestimmt. Nach drei sequentiellen *Anti*-HDAC3-Immunpräzipitationen war der Gehalt an HDAC3 im



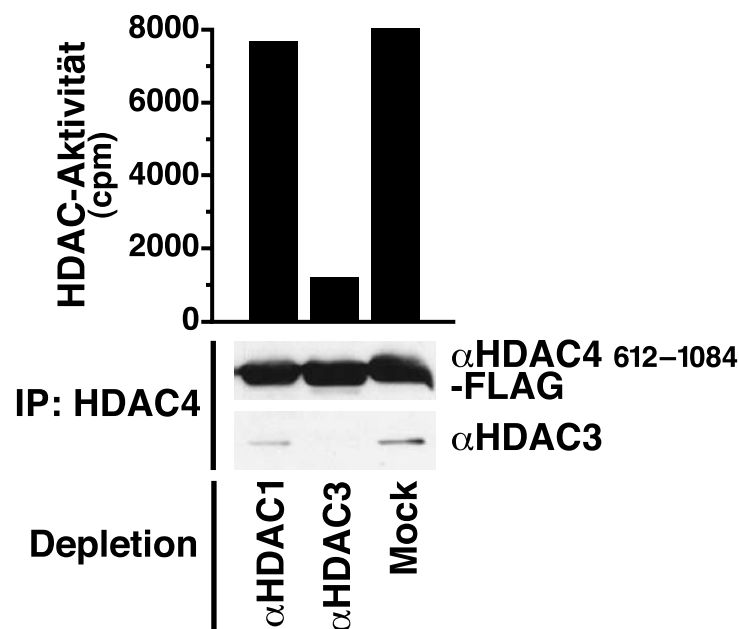
**Abbildung 48.** Untersuchung der enzymatischen Aktivität von HDAC4 nach Immundepletion von HDAC3. Gesamtzellextrakte einer 293-Zelllinie, die HDAC4-FLAG konstitutiv exprimiert, wurden wiederholten Immunpräzipitationen mit den angegebenen Antisera unterworfen (konsequente Depletion; Präimmunsereum, Serum des für die Herstellung des *Anti*-HDAC3-Antisera verwendeten Kaninchens vor der Immunisierung). Der Ge-

halt der Extrakte an HDAC3 und HDAC4-FLAG wurde in Western Blots mit *anti*-HDAC3- und *anti*-FLAG-spezifischen Antisera bestimmt (oben). Die extrem hohe Menge an Kaninchen-IgG in den Extrakten, die mit Präimmunsereum immunpräzipitiert worden waren, machte einen *Anti*-HDAC3-Western Blot dieser Extrakte unmöglich. Nach der dritten konsekutiven Depletion wurde HDAC4-FLAG mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert und die enzymatische Aktivität der Immunpräzipitate über die Desacetylierung des H4-Substratpeptids bestimmt. Die enzymatische Aktivität jeweils zweier unabhängiger Immunpräzipitationen ist angegeben (unten).



Extrakt stark reduziert. Keine Reduzierung des HDAC3-Gehaltes wurde hingegen nach Immunpräzipitationen mit *anti*-HDAC1-spezifischem Antiserum oder nach Kontrollimmunpräzipitationen ohne Zugabe von Antiserum festgestellt (Abbildung 48,  $\alpha$ HDAC3). *Anti*-FLAG-Western Blots der derartig behandelten Extrakte wiesen hingegen einen nahezu gleichbleibenden Gehalt an HDAC4-FLAG auf (Abbildung 48,  $\alpha$ FLAG). Zur Bestimmung der verbleibenden enzymatischen Aktivität von HDAC4 wurde HDAC4-FLAG aus den jeweiligen Extrakten mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Die mit HDAC4-FLAG assoziierte enzymatische HDAC-Aktivität war dabei nach *Anti*-HDAC3-Immunpräzipitation deutlich niedriger als nach *Anti*-HDAC1- oder Mock-Immunpräzipitationen (kein Antiserum, Präimmunserum).

Ähnliche Ergebnisse wurden mit Gesamtzellextrakten einer Zelllinie, die lediglich die enzymatisch aktive Domäne von HDAC4 konstitutiv exprimiert [HDAC4(aa 612-1084)-FLAG], erhalten (Abbildung 49). *Anti*-FLAG-Western Blots bestätigten dabei, daß die HDAC4-FLAG-Fusionsproteine aus den unterschiedlich behandelten Extrakten mit der gleichen Effizienz über das *anti*-FLAG-spezifische Anti-



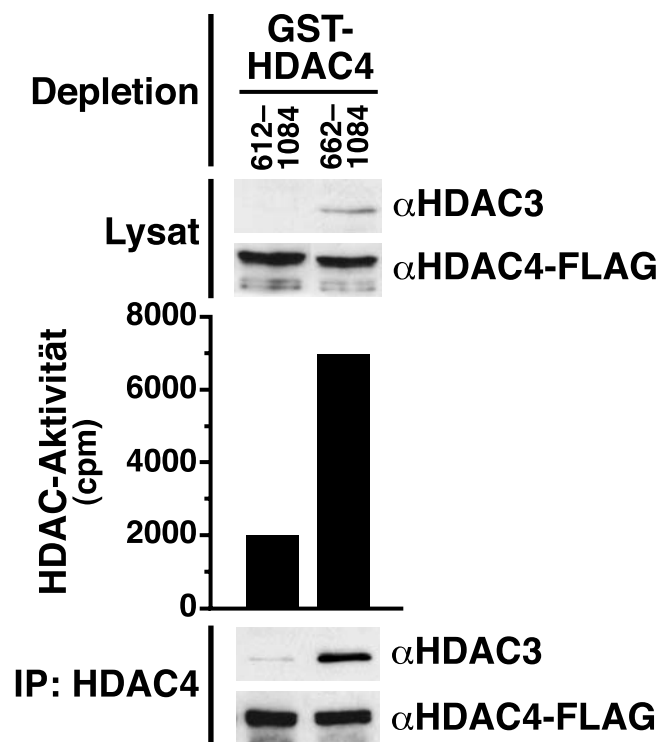
**Abbildung 49. Untersuchung der enzymatischen Aktivität von HDAC4(aa 612-1084)-FLAG nach Immundepletion von HDAC3.** Gesamtzellextrakte einer 293-Zelllinie, die HDAC4(aa 612-1084)-FLAG konstitutiv exprimiert, wurden wiederholt mit *anti*-HDAC1- und *anti*-HDAC3-spezifischen Antiseren oder ohne Zugabe von Antiserum (Mock) immunpräzipitiert. Nach Depletion wurde HDAC4(aa 612-1084)-

FLAG aus den Extrakten mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert, und die enzymatische Aktivität der Immunpräzipitate über die Desacetylierung des H4-Substratpeptids bestimmt (oben). *Anti*-FLAG-Immunpräzipitate (IP: HDAC4) wurden in Western Blots mit *anti*-FLAG- und *anti*-HDAC3-spezifischen Antiseren analysiert (unten).

serum immunpräzipitiert wurden. Wie der *Anti*-HDAC3-Western Blot dokumentiert, führt der Verlust von HDAC3 im HDAC4-FLAG-Immunpräzipitat zu einer dramatischen Verringerung der mit HDAC4 assoziierten enzymatischen Aktivität.

### 3.6.18.2 Depletion von HDAC3 mit GST-HDAC4

Wie unter Abschnitt 3.6.2 beschrieben, bindet rekombinantes GST-HDAC4(aa 612-1084) HDAC3 aus Zellextrakten mit hoher Affinität. Zur Eliminierung von HDAC3 aus Zellextrakten wurden daher neben dem spezifischen *Anti*-HDAC3-Antiserum auch GST-HDAC4(aa 612-1084)-Affinitätssäulen verwendet (Abbildung 50). Extrakte einer 293-Zelllinie, die HDAC4-FLAG konstitutiv exprimiert, wurden wiederholt über GST-HDAC4(aa 612-1084)- und GST-HDAC4(aa 662-1084)-Affinitätssäulen aufgereinigt. Inkubation der Extrakte mit GST-HDAC4(aa 612-1084)



**Abbildung 50. Untersuchung der enzymatischen Aktivität von HDAC4 nach Depletion von HDAC3 mittels GST-HDAC4.** Gesamtzellextrakte einer 293-Zelllinie, die HDAC4-FLAG konstitutiv exprimiert, wurden wiederholt über GST-HDAC4(aa 612-1084)- und GST-HDAC4(aa 662-1084)-Affinitätssäulen geleitet. Nach der sequentiellen Inkubation mit den rekombinanten GST-HDAC4-Fusionsproteinen (Depletion), wurde HDAC4-FLAG mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert (IP: HDAC4). Die enzymatische Aktivität der Immunpräzipitate wurde über die Desacetylierung des H4-Substratpeptids bestimmt. Der Gehalt der unterschiedlich behandelten Zellextrakte (Depletion) und der entsprechenden *Anti*-FLAG-Immunpräzipitate (IP: HDAC4) an HDAC3 und HDAC4-FLAG wurde in Western Blots mit *anti*-HDAC3- und *anti*-FLAG-spezifischen Antiseren verglichen.

Der Gehalt der unterschiedlich behandelten Zellextrakte (Depletion) und der entsprechenden *Anti*-FLAG-Immunpräzipitate (IP: HDAC4) an HDAC3 und HDAC4-FLAG wurde in Western Blots mit *anti*-HDAC3- und *anti*-FLAG-spezifischen Antiseren verglichen.

nicht aber GST-HDAC4(aa 662-1084) führte zu einer spezifischen Reduktion des HDAC3-Gehaltes. Im Gegensatz dazu blieb der HDAC4-FLAG-Gehalt in den unterschiedlich behandelten Extrakten auf gleichem Niveau (Abbildung 50, Lysat). *Anti-FLAG*-Immunpräzipitate der über GST-HDAC4(aa 612-1084)-Affinitätssäulen aufgereinigten Extrakte wiesen eine deutliche Reduktion der enzymatischen Aktivität auf. Western Blot-Analyse der *Anti-FLAG*-Immunpräzipitate der über GST-HDAC4(aa 612-1084)-Affinitätssäulen geleiteten Extrakte mit *anti*-HDAC3-spezifischem Antiserum bestätigte, daß nahezu kein HDAC3 an HDAC4-FLAG gebunden war. Dabei war aus den unterschiedlich behandelten Extrakten eine vergleichbare Menge an HDAC4-FLAG immunpräzipitiert worden wie der Western Blot mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum bestätigte (Abbildung 50, IP: HDAC4).

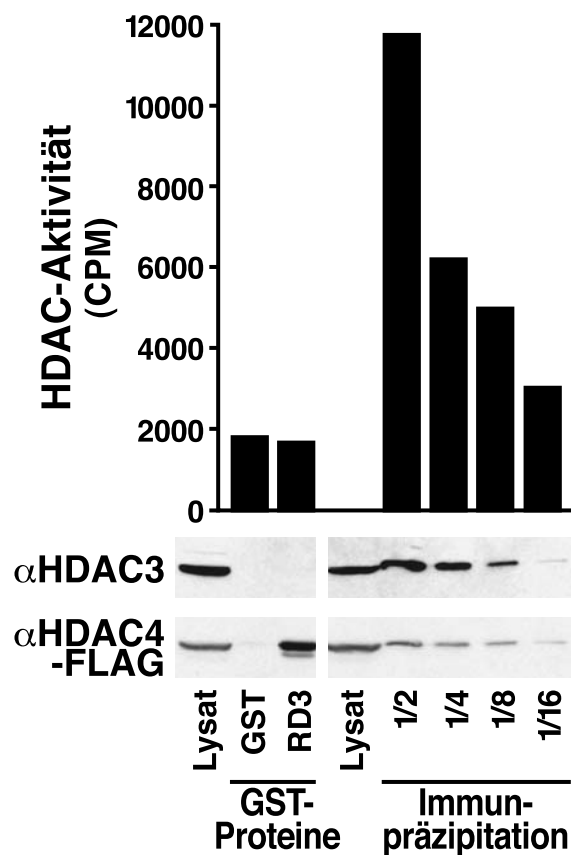
### **3.6.19 Affinitätsaufreinigung von HDAC4**

Sowohl rekombinantes als auch zellulär exprimiertes HDAC4 wird von rekombinantem GST-RD3(N-CoR) gebunden (siehe Abschnitt 3.6.14). Da die Bindungsaffinitäten von rekombinantem HDAC4 und zellulärem HDAC4 vergleichbar waren, ist anzunehmen, daß diese Bindung unabhängig von HDAC3 ist. Basierend auf dieser Beobachtung wurde ein Affinitätsverfahren entwickelt, das die Aufreinigung von zellulärem HDAC4 unabhängig von HDAC3 ermöglichte.

#### **3.6.19.1 Affinitätsaufreinigung von enzymatisch inaktivem überexprimiertem HDAC4-FLAG**

Ein aufgereinigtes, rekombinantes Fusionsprotein der RD3-Domäne von N-CoR, das an GSH-Agarose gebunden war, wurde mit Gesamtzellextrakten einer 293-Zelllinie inkubiert, die HDAC4-FLAG konstitutiv exprimiert. Parallel wurde HDAC4-FLAG aus demselben Extrakt mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Nach intensivem Waschen wurden jeweils Western Blot-Analysen mit *anti*-HDAC3- und *anti*-FLAG-spezifischen Antiseren durchgeführt. Außerdem wurde die enzymatische HDAC-Aktivität des immunpräzipitierten oder an GST-RD3 gebundenen Materials gemessen (Abbildung 51). HDAC4-FLAG wurde an GST-RD3

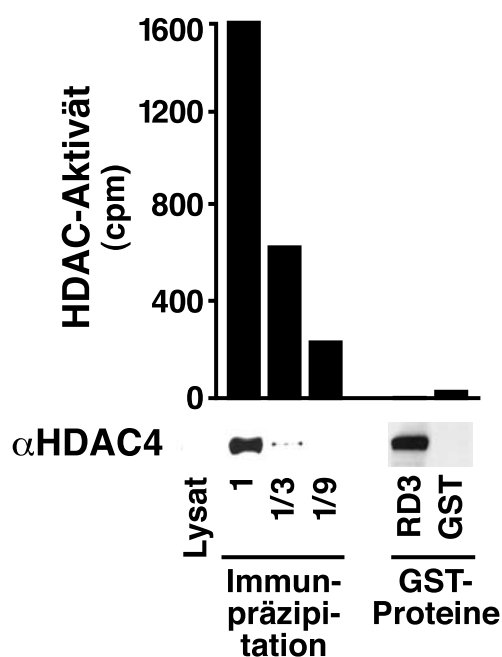
unabhängig von HDAC3 gebunden. Dieses an GST-RD3 gebundene HDAC4-FLAG, das nicht mit HDAC3 komplexiert war, war enzymatisch völlig inaktiv. Demgegenüber wies HDAC4, das über das FLAG-Epitop immunpräzipitiert worden war, hohe enzymatische Aktivität auf. Wie der Western Blot bestätigte, war HDAC3 an diese enzymatisch aktive HDAC4-Species gebunden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß in der Zelllinie, die HDAC4-FLAG konstitutiv überexprimiert, zwei voneinander unabhängige HDAC4-Formen existieren: Eine mit HDAC3 komplexierte Form ist enzymatisch aktiv, kann jedoch nicht an GST-RD3 binden. Eine nicht mit HDAC3 komplexierte Form ist hingegen in der Lage an GST-RD3 zu binden, ist jedoch enzymatisch völlig inaktiv.



**Abbildung 51. Affinitätsaufreinigung von enzymatisch inaktivem überexprimiertem HDAC4-FLAG.** HDAC4-FLAG einer 293-Zelllinie, die dieses Fusionsprotein konstitutiv exprimiert, wurde entweder an rekombinantes GST-RD3(N-CoR) gebunden (linke Seite, GST-Proteine, RD3) oder direkt mittels *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Immunpräzipitiertes Material wurde dabei, wie angegeben, seriell verdünnt (rechte Seite, Immunpräzipitation). Zur Kontrolle der Bindung an rekombinantes GST-RD3 wurde rekombinante GST eingesetzt (linke Seite, GST-Proteine, GST). Immunpräzipitiertes oder an rekombinante GST-Fusionsproteine gebundenes Material wurde in Western Blots mit *anti*-HDAC3- und *anti*-FLAG-spezifischen Antiseren analysiert (unten). Außerdem wurde die enzymatische HDAC-Aktivität über die Desacetylierung des H4-Substratpeptids bestimmt (oben). Lysat, jeweils 10% des für die Bindung an rekombinante GST-Fusionsproteine oder für die *Anti*-FLAG-Immunpräzipitation eingesetzten Gesamtzell-extrakts.

### 3.6.19.2 Affinitätsaufreinigung von enzymatisch inaktivem endogenem HDAC4

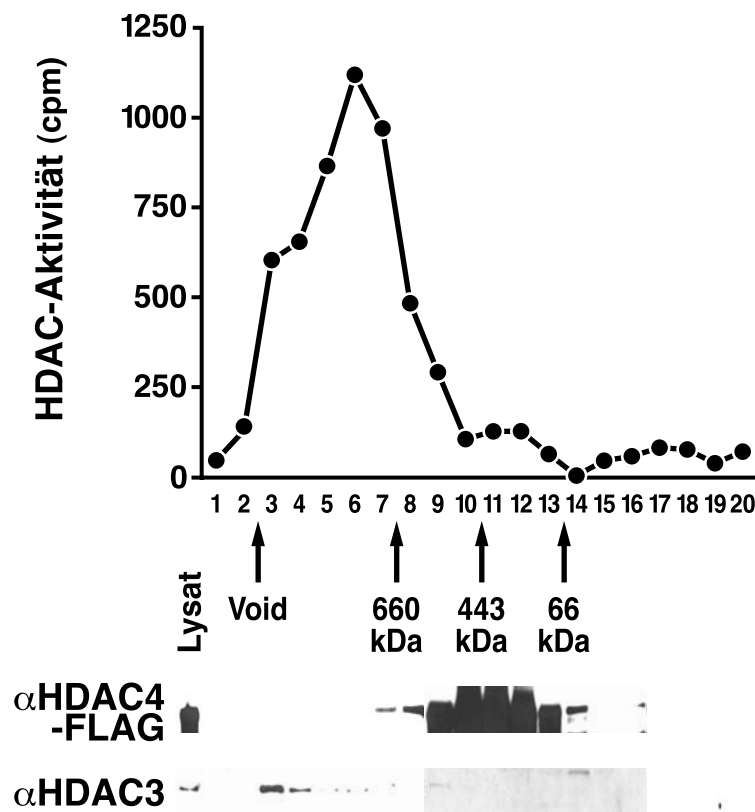
Um auszuschließen, daß die konstitutive Überexpression von HDAC4-FLAG artifiziell zur Bildung inaktiver HDAC4-Species führte, wurde auch endogenes HDAC4 anhand der im vorigen Abschnitt beschriebenen Methode unter Verwendung eines rekombinanten GST-RD3(N-CoR)-Fusionsproteins aufgereinigt. Wie der *Anti*-HDAC4-Western Blot in Abbildung 52 zeigt, konnte endogenes HDAC4 effizient an rekombinantes GST-RD3 gebunden werden. Das auf diese Weise aufgereinigte HDAC4 war enzymatisch völlig inaktiv. Eine ähnliche HDAC4-Menge, die direkt mit *anti*-HDAC4-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert worden war, zeigte hingegen deutlich enzymatische Aktivität. Diese Resultate weisen darauf hin, daß lediglich HDAC4, das mit HDAC3 komplexiert ist, enzymatisch aktiv ist.



**Abbildung 52. Affinitätsaufreinigung von enzymatisch inaktivem endogenem HDAC4.** Gesamtzellextrakte von 293-Zellen wurden mit rekombinanter GST oder einem rekombinanten GST-RD3(N-CoR)-Fusionsprotein inkubiert (rechte Seite, GST-Proteine). Endogenes HDAC4 wurde parallel mittels *anti*-HDAC4-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurde wie angegeben seriell verdünnt (linke Seite, Immunpräzipitation). Immunpräzipitiertes oder an rekombinante GST-Fusionsproteine gebundenes Material wurde in Western Blots mit *anti*-HDAC4-spezifischem Antiserum analysiert (unten). Außerdem wurde die enzymatische HDAC-Aktivität über die Desacetylierung des H4-Substratpeptids bestimmt (unten). Lysat, jeweils 10% des für die Bindung an rekombinante GST-Fusionsproteine oder für die *Anti*-HDAC4-Immunpräzipitation eingesetzten Extrakts.

### 3.6.20 Chromatographische Auftrennung aktiver und inaktiver HDAC4-Komplexe

Bestehen in einer Zelle gleichzeitig enzymatisch aktive und inaktive HDAC4-Komplexe, sollten sich diese chromatographisch auftrennen lassen. Extrakte einer 293-Zelllinie, die HDAC4-FLAG konstitutiv exprimiert, wurden zunächst mit DNase I behandelt, um hochmolekulare Komplexe, die unspezifisch über DNA oder Chromatin aneinander gebunden waren, zu spalten. Danach wurde das Lysat über eine Gelfiltrationssäule mit sehr hohem Auflösungsvermögen (Superose 6) aufgetrennt. HDAC4-FLAG wurde aus den Fraktionen der Gelfiltration über *anti*-FLAG-spezifisches Antiserum immunpräzipitiert und auf enzymatische HDAC-Aktivität unter-



**Abbildung 53. Chromatographische Auftrennung aktiver und inaktiver HDAC4-Komplexe.** Gesamtzellextrakte einer 293-Zelllinie, die HDAC4-FLAG konstitutiv exprimiert, wurden über eine Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Säule: Pharmacia Superose 6 HR 10/30 (10 mmID x 300 mmL); Flußrate: 0,15 ml/min; Detektion: Absorption bei 280 nm (nicht gezeigt); Mobile Phase: IPLS-Puffer; Fraktionsgröße: 0,8 ml. HDAC4-FLAG wurde aus 3/4 jeder

Fraktion mittels *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Die enzymatische Aktivität der Immunpräzipitate wurde über die Desacetylierung eines H4-Substratpeptids bestimmt (oben). 1/4 jeder Fraktion wurde auf SDS-PAGE-Gele aufgetragen (7,5%) und in Western Blots mit *anti*-HDAC3- und *anti*-FLAG-spezifischen Antiseren analysiert (unten). Die Elutionspositionen von Markerproteinen unter den gewählten Chromatographiebedingungen sind angegeben; Void: Ausschlußvolumen. Lysat, 2% des auf die Säule aufgetragenen Materials.

sucht. Außerdem wurden die Fraktionen durch Western Blots mit *anti*-FLAG- und *anti*-HDAC3-spezifischen Antiseren analysiert (Abbildung 53). Die mit HDAC4-FLAG assoziierte HDAC-Aktivität eluierte von der Säule als breite Peakfraktion zwischen Fraktion 2 (entspricht dem Ausschlußvolumen der Säule von ca. 2 MDa) und Fraktion 10 (entspricht ca. 0,5 MDa) mit einem Aktivitätsmaximum bei ca. 1 MDa (Fraktion 6). Der Großteil an HDAC4-FLAG-Protein hingegen wurde in den Fraktionen 10, 11 und 12 (entspricht ca. 0,4 MDa) gefunden. Diese HDAC4-Spezies ist offensichtlich enzymatisch inaktiv. Eine weitaus geringere Menge an HDAC4-FLAG eluierte zusammen mit der hochmolekularen enzymatischen Aktivität (weniger als 5% der Gesamtmenge). HDAC3 wurde ausschließlich in hochmolekularen Fraktionen nachgewiesen. Kein HDAC3 wurde in den niedermolekularen inaktiven Fraktionen gefunden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit endogenem HDAC4 erhalten (Abbildung nicht gezeigt) und bestätigen die Existenz zweier unterschiedlicher Formen von zellulärem HDAC4: hochmolekular, komplexiert mit HDAC3 und enzymatisch aktiv sowie niedermolekular, nicht komplexiert mit HDAC3 und enzymatisch inaktiv.

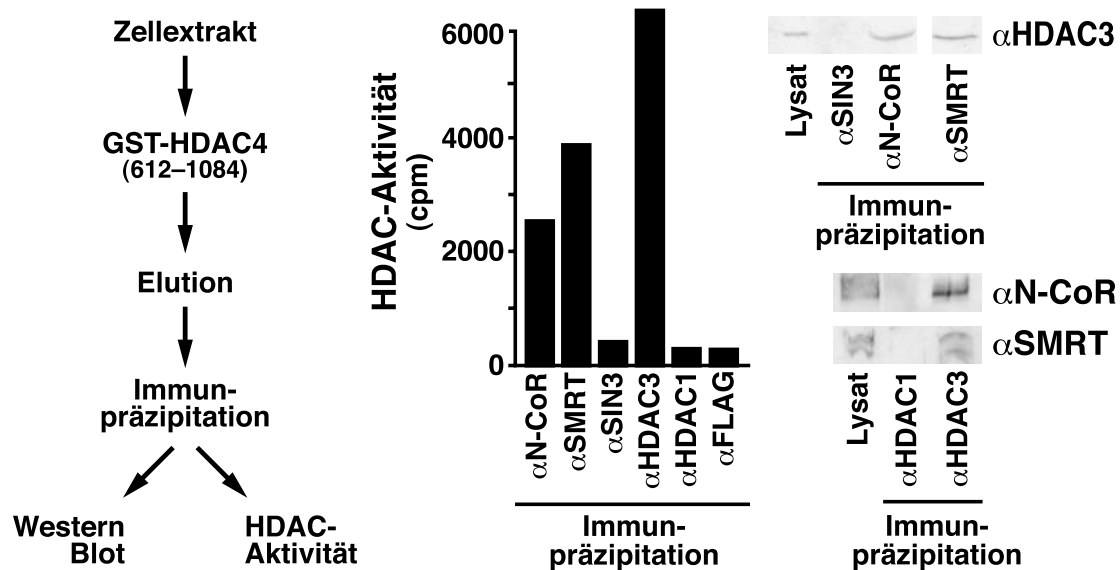
### **3.6.21 Nachweis enzymatisch aktiver HDAC4-HDAC3-SMRT/N-CoR-Komplexe**

Zum Nachweis enzymatisch aktiver HDAC4-HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexe wurde Kernextrakt von HeLa-Zellen zunächst an rekombinantes GST-HDAC4(aa 612-1084), das an GSH-Agarose immobilisiert war, gebunden (siehe Abschnitt 3.6.2). Nach intensivem Waschen wurde das gebundene Material mittels GSH kompetitiv eluiert. Das Eluat wurde aufgeteilt und Immunpräzipitationen mit den folgenden Antiseren durchgeführt: *anti*-N-CoR, *anti*-SMRT, *anti*-SIN3, *anti*-HDAC1, *anti*-HDAC3 und *anti*-FLAG. Immunpräzipitationen wurden entweder für enzymatische HDAC-Aktivitätstests eingesetzt oder auf SDS-PAGE Gele aufgetragen und mittels Western Blots analysiert (siehe schematischen Versuchsablauf in Abbildung 54).

Signifikante enzymatische HDAC-Aktivität wurde in den *Anti*-N-CoR-, *Anti*-SMRT- und *Anti*-HDAC3-Immunpräzipitaten gemessen (Abbildung 54). Dabei war die enzymatische Aktivität im *Anti*-HDAC3-Immunpräzipitat reproduzierbar größer als die in den *Anti*-N-CoR- und *Anti*-SMRT-Immunpräzipitaten. Diese Beobachtung stimmt mit der Annahme überein, daß HDAC4 sowohl über SMRT als auch über N-

CoR mit HDAC3 assoziiert. Keine enzymatische Aktivität wurde hingegen in den Immunpräzipitaten mit *anti-SIN3*-, *anti-HDAC1*- und *anti-FLAG*-spezifischen Antisera gefunden.

Der *Anti-HDAC3*-Western Blot der *Anti-N-CoR*- und *Anti-SMRT*-Immunpräzipitate des über GST-HDAC4(aa 612-1084) affinitätsaufgereinigten Materials wies HDAC3 nach, während kein HDAC3 mit dem *Anti-SIN3*-Antiserum assoziiert war. Wenn das affinitätsaufgereinigte Material jedoch mit *anti-HDAC3*-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert wurde, wurden in entsprechenden Western Blots sowohl SMRT als auch N-CoR nachgewiesen. Diese Faktoren konnten hingegen aus dem Eluat der GST-HDAC4(aa 612-1084)-Säule nicht durch *anti-HDAC1*-spezifisches Antiserum immunpräzipitiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die HDAC4-, HDAC3- und N-CoR/SMRT-Proteine in gemeinsamen Komplexen mit enzymatischer Aktivität existieren.

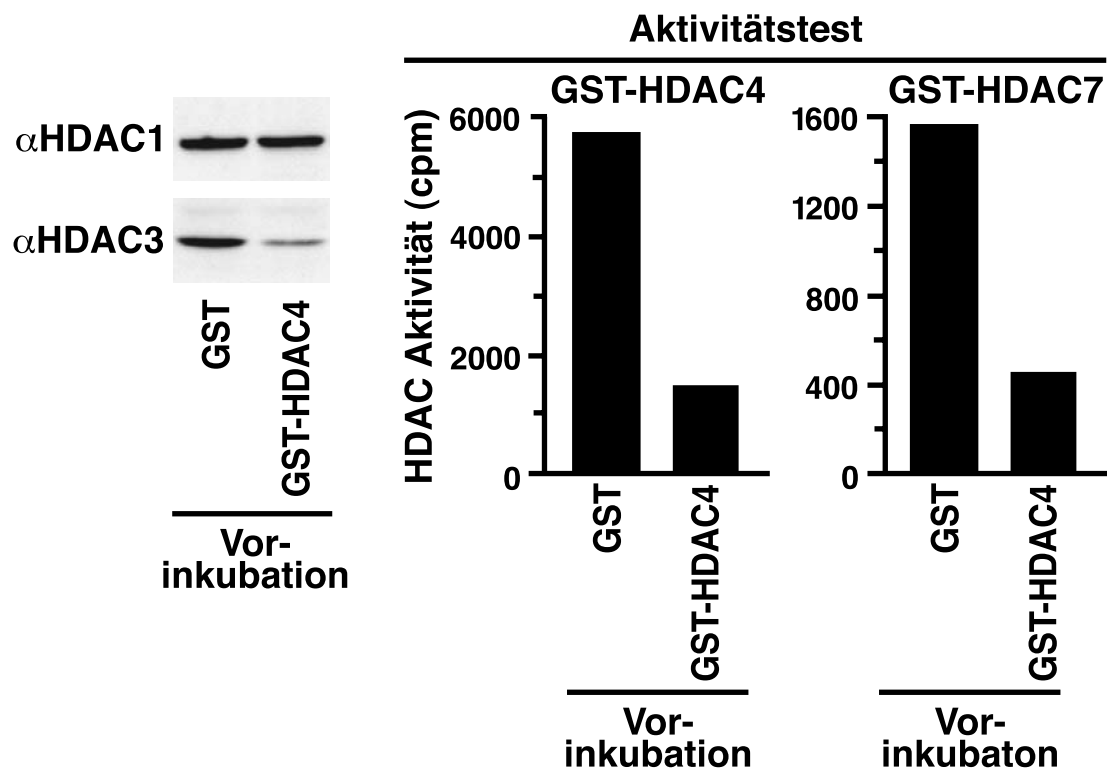


**Abbildung 54.** Nachweis enzymatisch aktiver HDAC4-HDAC3-SMRT/N-CoR-Komplexe. Links, schematischer Versuchsablauf; Kernextrakte von HeLa-Zellen wurden mit rekombinantem GST-HDAC4(aa 612-1084), das an GSH-Agarose gebunden war, inkubiert; spezifisch gebundenes Material wurde mit löslichem GSH eluiert und mit *anti-N-CoR*-, *anti-SMRT*-, *anti-SIN3*-, *anti-HDAC3*-, *anti-HDAC1*- oder *anti-FLAG*-spezifischen Antisera immunpräzipitiert; Mitte, die enzymatische HDAC-Aktivität der Immunpräzipitate wurde über die Desacetylierung des H4-Substratpeptids gemessen; rechts, die angegebenen Immunpräzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit *anti-N-CoR*-, *anti-SMRT*-, oder *anti-HDAC3*-spezifischen Antisera analysiert; Lysat, 10% des für die Immunpräzipitation eingesetzten Eluats der GST-HDAC4(aa 612-1084)-Affinitätssäule.



### 3.6.22 Nachweis der Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von HDAC4 und HDAC7 von denselben Cofaktoren

Sowohl rekombinante GST-HDAC4- als auch rekombinante GST-HDAC7-Fusionsproteine binden HDAC3 (siehe Abschnitt 3.6.2). Die vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Corepressorproteine SMRT und N-CoR diese für die enzymatische Aktivität der HDACs der Klasse II essentielle Bindung vermitteln. In Konkurrenzexperimenten wurde untersucht, ob die enzymatischen Aktivitäten von HDAC4 und HDAC7 tatsächlich von denselben Faktoren abhängen. Gesamtzell-extrakte von 293-Zellen wurden wiederholt über GST-HDAC4(aa 612-1084)- oder GST-Affinitätssäulen gereinigt (Abbildung 55). Anschließend wurden Aliquots der Extrakte mittels Western Blot auf HDAC1 und HDAC3 hin untersucht. Extrakte, die

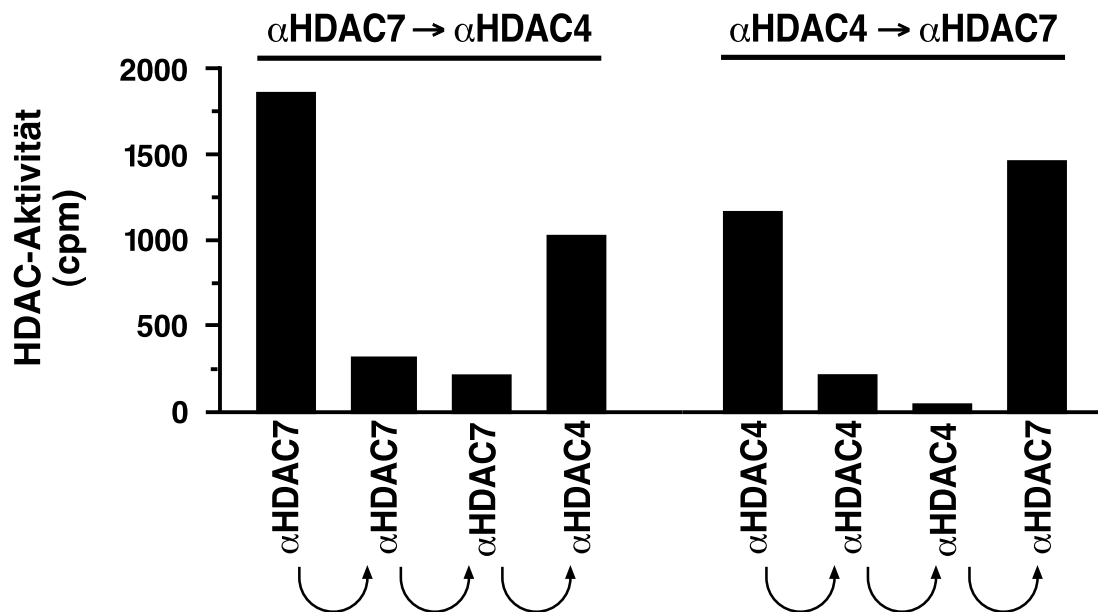


**Abbildung 55.** Nachweis der Abhängigkeit der enzymatische Aktivität von HDAC4 und HDAC7 von denselben Cofaktoren. Gesamtzell-extrakte von 293-Zellen wurden wiederholt über GST- oder GST-HDAC4(aa 612-1084)-Affinitätssäulen geleitet (Vorinkubation). Links, Western Blot-Analyse der über die Affinitätssäulen gereinigten Extrakte mit *anti*-HDAC1- und *anti*-HDAC3-spezifischen Antisera; rechts, HDAC-Aktivitätstest von GST-HDAC4(aa 612-1084) und GST-HDAC7(aa 438-912) nach Inkubation mit den über die Affinitätssäulen gereinigten Extrakten.

über GST-HDAC4(aa 612-1084)-Affinitätssäulen gereinigt worden waren, wiesen dabei eine 70-80%-ig geringere Menge an HDAC3 auf als Extrakte, die über GST-Affinitätssäulen gereinigt worden waren. Die Menge an HDAC1 blieb hingegen in beiden Extrakten konstant. GST-HDAC4(aa 612-1084) oder GST-HDAC7(aa 438-912) zeigten nach Inkubation mit dem über GST-HDAC4(aa 612-1084)-Affinitätssäulen gereinigten Extrakt nur ca. 20-30% der enzymatischen HDAC-Aktivität, die nach Inkubation mit dem Kontrolleextrakt erhalten wurde (GST-Affinitätssäule). Die mit GST-HDAC4 assoziierte HDAC-Aktivität war ca. dreimal höher als die mit GST-HDAC7 assoziierte. Dies läßt darauf schließen, daß HDAC4 und HDAC7 Cofaktoren mit unterschiedlicher Affinität binden.

### **3.6.23 Untersuchung der gegenseitigen Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der HDAC4- und HDAC7-Komplexe**

Wie im vorigen Abschnitt 3.6.22 gezeigt, hängen die enzymatischen Aktivitäten von HDAC4 und HDAC7 von denselben Cofaktoren ab. Um zu untersuchen, ob voneinander unabhängige, enzymatisch aktive HDAC4- und HDAC7-Komplexe in der Zelle coexistieren, wurden sequentielle Immunpräzipitationen durchgeführt. HDAC7 wurde wiederholt aus Zellextrakten von SupTI-Zellen mit dem *anti*-HDAC7-spezifischen Antiserum immunpräzipitiert (Abbildung 56). Nach der dritten Immunpräzipitation wurden lediglich 15% der ursprünglichen enzymatischen HDAC7-Aktivität gemessen (100% entspricht der ersten Immunpräzipitation). Aus dem wiederholt mit *anti*-HDAC7-spezifischen Antiserum behandelten Extrakt konnte jedoch immer noch aktives HDAC4 immunpräzipitiert werden, wie der Vergleich mit einer entsprechenden *Anti*-HDAC4-Immunpräzipitation von nicht vorbehandeltem Extrakt zeigte (Abbildung 56, rechte Seite). Wurde die Aufeinanderfolge der Immunpräzipitationen umgekehrt und zunächst HDAC4 und danach HDAC7 immunpräzipitiert, ergab sich ein ähnliches Bild. Wiederholte Immunpräzipitation von HDAC4 führte zu einer 90%-igen Reduktion der mit dem *anti*-HDAC4-spezifischen Antiserum assoziierten enzymatischen HDAC-Aktivität, wohingegen die enzymatische Aktivität von HDAC7 nahezu unverändert blieb.



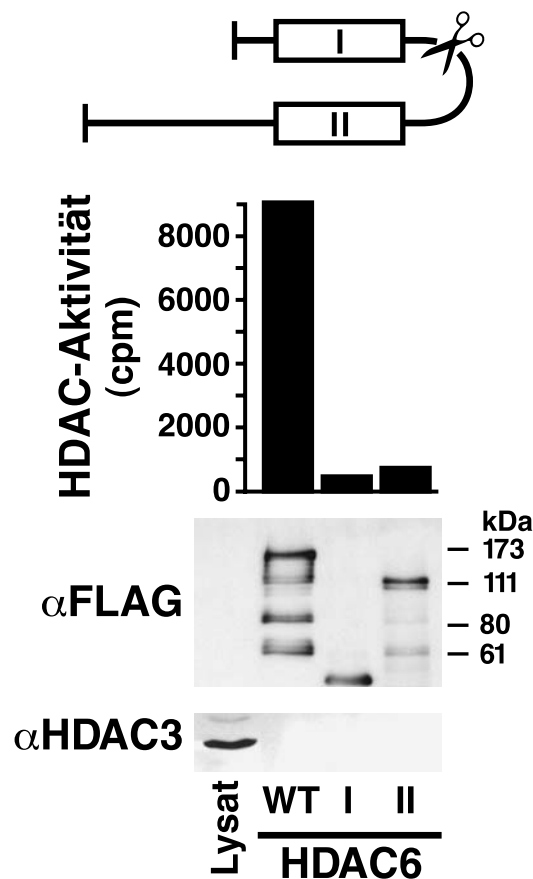
**Abbildung 56. Untersuchung der gegenseitigen Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der HDAC4- und HDAC7-Komplexe.** Gesamtzellextrakte von SupTI-Zellen wurden wiederholt mit *anti*-HDAC7- und *anti*-HDAC4-spezifischen Antisera inkubiert. Die enzymatische HDAC-Aktivität der jeweiligen Immunpräzipitate wurde über Desacetylierung des H4-Substratpeptids bestimmt. Links, enzymatische Aktivität von drei sequentiellen *Anti*-HDAC7-Immunpräzipitationen gefolgt von einer *Anti*-HDAC4-Immunpräzipitation; rechts, enzymatische Aktivität von drei sequentiellen *Anti*-HDAC4-Immunpräzipitationen gefolgt von einer *Anti*-HDAC7-Immunpräzipitation.

### 3.7 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität einer HDAC der Klasse II mit zwei HDAC-Domänen, HDAC6

Die HDAC-Domänen der HDACs der Klasse II sind offensichtlich enzymatisch nicht selbständig. Die HDAC-Domänen in HDAC4, HDAC5 und HDAC7 sind vielmehr von der Wechselwirkung mit HDAC3 abhängig. HDAC6 ist ein einzigartiges Protein, da es zwei kovalent miteinander verbundene HDAC-Domänen in Serie enthält (siehe Abschnitt 3.1.3). Um zu untersuchen, ob HDAC-HDAC Wechselwirkungen für die enzymatische Aktivität von HDAC-Komplexen essentiell sind, wurde die enzymatische Aktivität von HDAC6 und der HDAC-Domänen in HDAC6 näher analysiert.

### 3.7.1 Untersuchung der enzymatischen Aktivität der HDAC-Domänen in HDAC6

Die Versuche mit HDAC4 und HDAC7 hatten gezeigt, daß die HDAC-Domänen dieser Faktoren gegenüber dem Verlust nur weniger Aminosäuren am N- oder C-terminalen Ende äußerst sensitiv sind (siehe Abschnitt 3.6.10). Um sicherzustellen, daß nicht zu kleine Regionen entsprechend den HDAC-Domänen in HDAC6 für die Untersuchung der HDAC-Aktivität dieses Faktors ausgewählt wurden, wurde zunächst ein Sequenzvergleich mit den HDAC-Domänen von HDAC4 und HDAC7 durchgeführt [(HDAC4(aa 612-1084), HDAC7(aa 438-912)]. Ausgehend von diesen Überlegungen wurden entsprechend große HDAC6-Fragmente kloniert (HDAC6-I, aa 1-488 und HDAC6-II, aa 409-1214) und mit C-terminalem FLAG-Epitop transient in 293-Zellen exprimiert (Abbildung 57). *Anti-FLAG*-Immunpräzipitate wurden entweder direkt auf enzymatische HDAC-Aktivität untersucht oder über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit *anti-FLAG*- oder *anti-HDAC3*-spezifischem Antiserum analysiert.

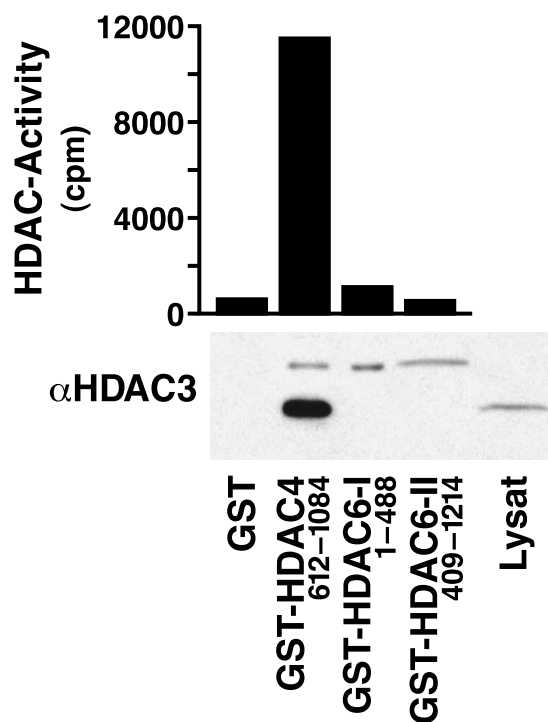


**Abbildung 57. Untersuchung der enzymatischen Aktivität der HDAC-Domänen in HDAC6.** HDAC6 (WT), die N-terminale HDAC-Domäne in HDAC6 (HDAC6-I, aa 1-488) sowie die C-terminale HDAC-Domäne in HDAC6 (HDAC6-II, aa 409-1214) wurden als Fusionsproteine mit C-terminalem FLAG-Epitop transient in 293-Zellen exprimiert. Mit *Anti-FLAG*-Antiserum immunpräzipitiertes Material wurde direkt auf enzymatische HDAC-Aktivität getestet (oben) oder in Western Blots mit *anti-FLAG*- oder *anti-HDAC3*-spezifischen Antiseren analysiert (unten). Lysat, 10% des für die Immunpräzipitation eingesetzten Gesamtzellextrakts.

Während HDAC6 selbst hohe enzymatische Aktivität aufwies, waren weder die N- noch die C-terminalen HDAC-Domänen dieses Faktors alleine enzymatisch aktiv (Abbildung 57). Der *Anti*-FLAG-Western Blot der Immunpräzipitate bestätigte, daß die Fusionsproteine ähnlich exprimiert und immunpräzipitiert worden waren. Wie bereits unter Abschnitt 3.6.8 beschrieben, war endogenes HDAC3 nicht an HDAC6 gebunden. Ebenso wurde keine Interaktion der getrennten HDAC-Domänen von HDAC6 mit HDAC3 gefunden (Abbildung 57).

### 3.7.2 Untersuchung der enzymatischen Aktivität rekombinanter HDAC6-Proteinfragmente

Die HDAC-Domänen von HDAC6 wurden auch nach Expression in Bakterien auf enzymatische Aktivität untersucht. Hierzu wurden HDAC6(aa 1-488) [HDAC6-I] und HDAC6(aa 409-1214) [HDAC6-II] als Fusionsproteine mit N-terminalem GST in Bakterien exprimiert und über GSH-Agarose aufgereinigt. Auch nach Inkubation dieser rekombinanten HDAC6-Fragmente mit Gesamtzellextrakten von HeLa-Zellen konnte keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 58).

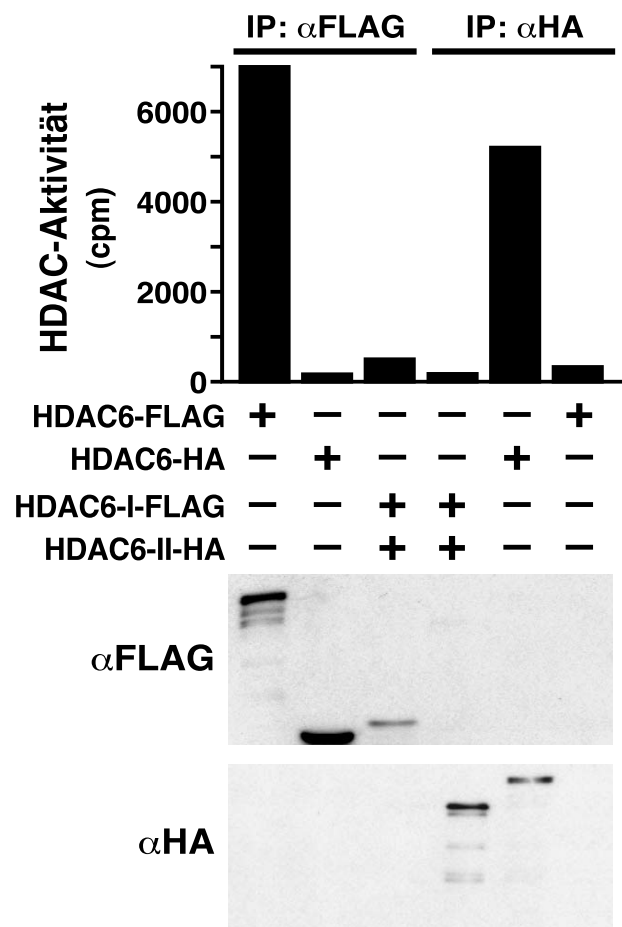


**Abbildung 58. Untersuchung der enzymatischen Aktivität rekombinanter HDAC6-Proteinfragmente.** GST und die angegebenen GST-HDAC4- und GST-HDAC6-Fusionsproteine wurden in Bakterien exprimiert und an GSH-Agarose gebunden. Die enzymatische HDAC-Aktivität der immobilisierten rekombinanten Proteine wurde nach der Inkubation mit Gesamtzellextrakten von HeLa-Zellen gemessen (oben). Material, das an die GST-HDAC4-Fusionsproteine gebunden war, wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot mit *anti*-HDAC3-spezifischem Antiserum untersucht (unten). Lysat, 10% des eingesetzten Extrakts.

Außerdem assoziierten die HDAC-Domänen in HDAC6 nicht wie die HDAC-Domäne in HDAC4 (und HDAC7) mit zellulärem HDAC3. Aufgrund der Größe des HDAC6-Proteins (1214 aa) gelang es nicht, dieses als Fusionsprotein mit N-terminaler GST in Bakterien zu exprimieren (das theoretische Molekulargewicht eines GST-HDAC6-Fusionsproteins liegt bei über 160 kDa). Falls die kovalente Verbindung der beiden HDAC-Domänen in HDAC6 für die enzymatische Aktivität dieses Faktors ausreichend ist, sollte rekombinantes HDAC6 alleine, ohne Inkubation mit Zellextrakten und ohne Bindung von HDAC3, enzymatisch aktiv sein.

### 3.7.3 Bindungsstudien der isolierten HDAC-Domänen von HDAC6

Es wurde auch untersucht, ob die beiden HDAC-Domänen von HDAC6 miteinander interagieren und dabei enzymatisch aktive Komplexe bilden können. Die



**Abbildung 60. Bindungsstudien der isolierten HDAC-Domänen von HDAC6.** HDAC6 sowie die N- und C-terminalen HDAC-Domänen von HDAC6 (HDAC6-I, aa 1-488, HDAC6-II, aa 409-1214) wurden mit C-terminalem FLAG- oder HA-Epitop in den angegebenen Kombinationen transient in 293-Zellen exprimiert. Fusionsproteine wurden mit *anti*-FLAG- oder *anti*-HA-spezifischen Antisera immunpräzipitiert (IP) und auf enzymatische HDAC-Aktivität untersucht (oben). Alternativ wurden die Immunpräzipitate über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit *anti*-FLAG- oder *anti*-HA-spezifischen Antisera analysiert (unten).

N-terminale HDAC-Domäne von HDAC6 mit C-terminalem FLAG-Epitop wurde zusammen mit der C-terminalen HDAC-Domäne von HDAC6 mit C-terminalem HA-Epitop transient in 293-Zellen exprimiert. Die Fusionsproteine wurden sowohl mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum als auch mit *anti*-HA-spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Immunpräzipitate wurden direkt auf enzymatische HDAC-Aktivität untersucht und nach der Auftrennung über SDS-PAGE in Western Blots mit *anti*-FLAG- und *anti*-HA-spezifischen Antiseren analysiert. Als Kontrolle wurde HDAC6 mit C-terminalem FLAG- oder HA-Epitop verwendet. Wie Abbildung 60 zeigt, interagierten die getrennten HDAC-Domänen von HDAC6 unter Bedingungen, bei denen HDAC6 selbst enzymatisch aktiv ist, nicht miteinander. Wie bereits unter Abschnitt 3.7.1 beschrieben, waren die getrennten HDAC-Domänen von HDAC6 enzymatisch nicht aktiv.

## 4 DISKUSSION

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß Chromatin nicht von rein statischer Natur ist. Es dient nicht nur passiv zum Schutz und zur Kompaktierung der DNA sondern ist vielmehr aktiv an der Steuerung von Transkriptionsprozessen beteiligt. Tatsächlich werden dynamische Veränderungen der Chromatinstruktur mehr und mehr als wichtige Regulationsmechanismen der Genexpression erkannt. Vor allem die posttranslationale Modifizierung der “Core”-Histone durch Acetylierung und Desacetylierung ist von großem Interesse. Obwohl langjährige Untersuchungen bereits viele indirekte Hinweise auf eine Korrelation derartiger Modifikationen, der Veränderung der Chromatinstruktur und der transkriptionellen Aktivität vieler Gene erbracht hatten, war lange Zeit nicht klar, ob diese die Folge oder Ursache der transkriptionellen Aktivität diskreter Regionen des Genoms sind. Ein eindeutig kausaler Zusammenhang konnte erst mit der Klonierung und dem Studium der enzymatischen Histon-Acetyltransferase- und Histon-Desacetylaseaktivitäten hergestellt werden (Struhl, 1998; Workman und Kingston, 1998; Kornberg und Lorch, 1999).

In *S. cerevisiae* wurden zwei unabhängige Multiproteinkomplexe mit enzymatischer HDAC-Aktivität beschrieben (Rundlett et al., 1996): der HDA-Komplex mit der katalytischen Komponente yHDA1 und der HDB-Komplex mit der katalytischen Komponente yRPD3. Dieser Faktor war zuvor bereits in genetischen Studien als transkriptioneller Regulator identifiziert worden (Vidal und Gaber, 1991). In höheren Organismen wurden bereits drei Faktoren mit Homologie zu yRPD3, HDAC1, HDAC2 und HDAC3, gefunden. HDAC1 und HDAC2 sind beide in den sogenannten SIN3-Corepressorkomplex, der ortholog zum HDB-Komplex in *S. cerevisiae* ist, eingebunden. Außerdem gibt es Hinweise, daß weitere hochmolekulare Multiproteinkomplexe der yRPD3-ähnlichen Faktoren, die ausschließlich in höheren Organismen vorkommen und die in diesen unter anderem bei der hormonell-gesteuerten Regulation der Transkription von Bedeutung sind. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß die Biologie der HDACs in höheren, mehrzelligen Organismen um einiges komplexer als im Einzeller Hefe ist. Darüber hinaus werden vermehrt Anzeichen gefunden, daß Veränderungen der Chromatinstruktur als Folge desregulierter HDACs eine wichtige Rolle bei der Entstehung und malignen Transformation einer Vielzahl von Tumoren spielen (Fenrick und Hiebert, 1998; Archer



und Hodin, 1999; Marks et al., 2000). Zum besseren Verständnis der Bedeutung der Acetylierung von Histonen bei der Entstehung von Tumoren, der Rolle von HDACs bei der transkriptionellen Regulation und der biologischen Bedeutung der unterschiedlichen HDACs, ist es nötig, die beteiligten Faktoren, deren enzymatische Aktivitäten und Regulation im Detail zu charakterisieren.

Im Gegensatz zu yRPD3 sind bisher keine homologen Faktoren oder Komplexe zur zweiten HDAC in *S. cerevisiae*, yHDA1, in höheren Organismen beschrieben worden. Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Gruppe von humanen Faktoren, die Ähnlichkeit zu dieser Hefe-HDAC aufweisen, erstmalig kloniert und charakterisiert. Die detaillierte Untersuchung der katalytischen Domänen dieser neuen Faktoren führte zum überraschenden Ergebnis, daß diese keine intrinsische enzymatische Aktivität aufweisen, sondern vielmehr von der Wechselwirkung mit einer weiteren HDAC, HDAC3, abhängig sind. Dabei ist die Bindung zu HDAC3 nicht direkt, sondern wird von den Corepressorproteinen N-CoR und SMRT vermittelt. Außerdem wurden Hinweise gefunden, daß zwei HDAC-Domänen innerhalb ein und desselben Proteins die Bildung eines aktiven HDAC-Enzyms vermitteln könnten. Die gewonnen Erkenntnisse deuten darauf hin, daß die enzymatische Aktivität von HDAC-Komplexen von der Wechselwirkung unterschiedlicher HDACs oder HDAC-Domänen abhängig sein könnten.

#### **4.1 Eine neue Klasse humaner HDACs, HDACs der Klasse II**

Das Durchsuchen unterschiedlicher Datenbanken mit einer yHDA1-Minimalsequenz führte zur Identifikation von vier humanen Faktoren, die Ähnlichkeit zu dieser Hefe-HDAC aufwiesen, HDAC4, HDAC5, HDAC6 und HDAC7. Unter Zuhilfenahme unterschiedlicher molekularbiologischer Methoden konnten cDNAs entsprechend diesen Proteinen kloniert werden. Die Analyse der klonierten cDNAs weist darauf hin, daß mit großer Wahrscheinlichkeit vollständige Lesereihen erhalten wurden. Die korrespondierenden Proteine sind deutlich größer als die humanen Homologe von yRPD3 (912 aa für HDAC7 bis 1214 aa für HDAC6 gegenüber 428 aa für HDAC3 bis 488 aa für HDAC2). Ein Vergleich der Primärstrukturen zeigt, daß HDAC4, HDAC5 und HDAC7 ähnlich aufgebaut sind. Einer N-

terminalen Domäne geringerer Homologie und ohne bekannte Proteinmotife von ca. 400-600 aa folgt eine C-terminale Domäne von ca. 450 aa, die große Ähnlichkeit zu yHDA1 aufweist (HDAC-Domäne). Diese Region ist unter diesen Faktoren äußerst konserviert. HDAC6 hingegen ist ein besonderes Protein. Es ist der erste und bisher einzige Faktor mit zwei HDAC-Domänen in Serie. Aufgrund der Ähnlichkeit dieser neu gefundenen Proteine untereinander und vor allem ihrer HDAC-Domänen zu yHDA1 werden sie als HDACs der Klasse II bezeichnet (Fischle et al., 1999; Grozinger et al., 1999). Die yRPD3-ähnlichen Proteine, HDAC1, HDAC2 und HDAC3, werden hingegen zur Klasse I der HDACs zusammengefaßt.

Die Analyse des Expressionsmusters von HDAC4 und HDAC7 mittels Northern Blot ergab, daß diese nicht in allen Zelltypen und Geweben gleichermaßen exprimiert werden. So zeigen HDAC4 und vor allem HDAC7 eine hohe Expression in Thymusgewebe, wohingegen sie in der Niere und in Testes nur in geringer Konzentration vorkommen. Ein ähnlich begrenztes Expressionsmuster wurde auch für die anderen HDACs der Klasse II, HDAC5 und HDAC6, beschrieben (Grozinger et al., 1999). Das begrenzte Vorkommen der HDACs der Klasse II steht in starkem Kontrast zur nahezu ubiquitären Expression aller HDACs der Klasse I (Emiliani et al., 1998). Aufgrund des selektiven Expressionsprofils der HDACs der Klasse II kann angenommen werden, daß diese spezifische Aufgaben innerhalb der Differenzierung bestimmter Gewebe ausüben. So konnte beispielsweise bereits gezeigt werden, daß HDAC4 und HDAC5 bei der Differenzierung von Myoblasten in Myocyten und Muskelfasern eine wichtige Rolle spielen (Lu et al., 2000; McKinsey et al., 2000).

In Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden HDAC4- und HDAC7-Proteine überwiegend im Zellkern einer Reihe von eukaryontischen Zelllinien gefunden. Eine derartige subzelluläre Verteilung stimmt mit der Annahme überein, daß diese Faktoren an transkriptionellen Regulationsvorgängen beteiligt sind. Dabei akkumulieren die HDAC-Proteine innerhalb des Zellkerns in diskreten Zonen, die von den Nukleoli, in denen die Synthese der rRNA und deren Einbindung in Ribosomen stattfindet, ausgeschlossen sind. Ähnliche Chromatin-freie Zonen wurden auch für HDACs der Klasse I sowie für einige Transkriptionsfaktoren beschrieben (Henzel et al., 1998; Fischle et al., 1999). Solche subnukleäre Strukturen könnten eine wichtige Funktion bei der Steuerung der Transkription sowie dem Reifeprozess der RNA

ausüben, da essentielle Faktoren für diese Prozesse in derartigen Zonen angereichert zu sein scheinen (Misteli, 2001).

HDAC7 (und HDAC4, Dr. Michael Hendzel, Cross Cancer Institute, University of Alberta, Canada; persönliche Mitteilung) wurde aber nicht nur im Zellkern sondern auch im Zytoplasma nachgewiesen. Diese Beobachtung steht in starkem Gegensatz zum Verhalten der HDACs der Klasse I, die bisher ausschließlich im Zellkern gefunden wurden (Emiliani et al., 1998; Dr. Michael Hendzel, Cross Cancer Institute, University of Alberta, Canada; persönliche Mitteilung). Unterschiede hinsichtlich der Verteilung im Zellkern und im Zytoplasma innerhalb verschiedener Zelllinien sowie vorläufige Resultate mit Toxinen, die den Proteinexport aus dem Zellkern inhibieren, lassen vermuten, daß HDAC7 zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma in einem dynamischen Gleichgewicht ausgetauscht werden kann. Ein derartiger nukleo-zytoplasmatischer Austausch könnte einen wichtigen Regulationsmechanismus für die biologische Aktivität von HDACs der Klasse II darstellen und wurde inzwischen in separaten Studien zumindest für HDAC4 und HDAC5 nachgewiesen (Grozinger und Schreiber, 2000; McKinsey et al., 2000; Wang et al., 2000).

## 4.2 Enzymatische Aktivität der HDACs der Klasse II

Drei unabhängige Ergebnisse deuten darauf hin, daß HDAC4 und HDAC7 tatsächlich mit enzymatischer HDAC-Aktivität assoziieren. (a) Antiseren gegen HDAC4 oder HDAC7 immunpräzipitieren aus unterschiedlichen Zelllinien spezifisch Aktivitäten, die in der Lage sind, ein peracetyliertes Peptid, das der N-terminalen Region des humanen Histons H4 entspricht, zu desacetylieren. Diese HDAC-Aktivität wird von TSA, einem Toxin, das zur Hyperacetylierung der Histone verschiedenster Zelllinien führt, inhibiert. Dabei wird ähnlich der HDACs der Klasse I eine nahezu vollständige Inhibierung bei 400 nM TSA beobachtet. (b) Exogene Fusionsproteine von HDAC4 und HDAC7 mit C-terminalem FLAG-Epitop, die transient in 293-Zellen exprimiert werden, zeigen in Immunpräzipitaten mit *anti*-FLAG-spezifischem Antiserum ebenfalls TSA-sensitive HDAC-Aktivität. Dabei sind die enzymatischen Aktivitäten von HDAC4 und HDAC7 in diesen transienten Überexpressions-

experimenten mit denen der HDACs der Klasse I vergleichbar. (c) Rekombinante, in Bakterien produzierte Fusionsproteine von HDAC4 und HDAC7 mit GST bilden spezifisch enzymatisch aktive HDAC-Komplexe, wenn sie mit Extrakten verschiedener Zelllinien inkubiert werden.

Da der vorliegende Aktivitätstest auf einer Endpunktsbestimmung des gesamten während der Reaktion freigesetzten Acetats beruht, konnte bisher nicht analysiert werden, ob HDACs der Klasse II spezifisch für bestimmte Lysinreste innerhalb der N-terminalen Domäne von H4 sind. Versuche mit Histonen, Nukleosom-“Core“-Komplexen und Oligonukleosomen als Substrat sowie die Anwendung spezifischer Antiseren, die den Acetylierungszustand einzelner Lysinreste spezifisch erkennen, sollen in Zukunft hierüber Aufschluß bringen (Zhang et al., 1998b).

Wie aufgrund der Homologie zu yHDA1 zu erwarten war, wurde in Studien mit Deletionsmutanten C-terminale Regionen in HDAC4, HDAC5 und HDAC7 als katalytische Domänen identifiziert. Diese Regionen von ca. 450 aa waren in transienten Überexpressionsexperimenten nötig und ausreichend für die enzymatische Aktivität der HDACs dieser Klasse II. Hingegen gelang es trotz etlicher Ansätze mit unterschiedlichen Versuchsprotokollen nicht, rekombinante Fusionsproteine dieser Domänen in HDAC4 und HDAC7 mit N-terminaler GST in aktiver Form in Bakterien herzustellen. Derartige Schwierigkeiten bei der Erzeugung rekombinanter aktiver Proteine in bakteriellen oder bakuloviralen Expressionssystemen wurden auch bei der Untersuchung anderer HDACs beschrieben (Hassig et al., 1998; Hu et al., 2000). Sie könnten auf generelle Probleme bei der Faltung der Proteine in Abwesenheit entsprechender Chaperone oder auf das Fehlen essentieller Cofaktoren für die enzymatische Aktivität zurückzuführen sein. Außerdem könnte die Fusion der HDAC-Domänen an andere Proteine und Aminosäuresequenzen, die eingesetzt werden, um die Erkennung und Aufreinigung zu erleichtern, artifiziell die Faltung und/oder Aktivität der HDAC-Proteine negativ beeinflussen.

Inkubation der rekombinanten GST-HDAC-Fusionsproteine mit Zellextrakten zeigte jedoch, daß diese biologisch nicht völlig inaktiv sind. Die in Zellkultur-experimenten nach Transfektion aktiven C-terminalen Fragmente von HDAC4 und HDAC7 [GST-HDAC4(aa 612-1084) und GST-HDAC7(aa438-912)] nicht aber entsprechende Fusionsproteine der in Zellkulturexperimenten nach Transfektion inaktiven Mutanten waren in der Lage auf diese Weise, TSA-sensitive HDAC-Aktivität

zu bilden. Die Analyse der an die aktiven Fusionsproteine gebundenen, offensichtlich für die enzymatische Aktivität essentiellen Cofaktoren ergab dabei völlig unerwartet eine spezifische Interaktion mit HDAC3. Um auszuschließen, daß es sich um eine artifizielle Rekrutierung handelte, wurde diese Interaktion direkt innerhalb von Zellen untersucht. So wurde gefunden, daß die aktiven Formen von HDAC4, HDAC5 und HDAC7 ebenfalls immer mit HDAC3 komplexiert sind. Die Bindung zwischen endogenen nicht-modifizierten HDAC4- und HDAC3-Proteinen sowie der Umstand, daß die Fusionen mit dem FLAG-Epitop oder mit GST sowohl C- als auch N-terminal vorgenommen wurden, läßt es unwahrscheinlich erscheinen, daß die Hybridproteine durch Fusion selbst inaktiviert wurden, jedoch wie das native Protein die Eigenschaft, mit HDAC3 zu interagieren, beibehalten haben. Vielmehr deuten die Ergebnisse auf einen physiologischen Zusammenhang dieser Wechselwirkung mit der enzymatischen HDAC-Aktivität von HDACs der Klasse II hin.

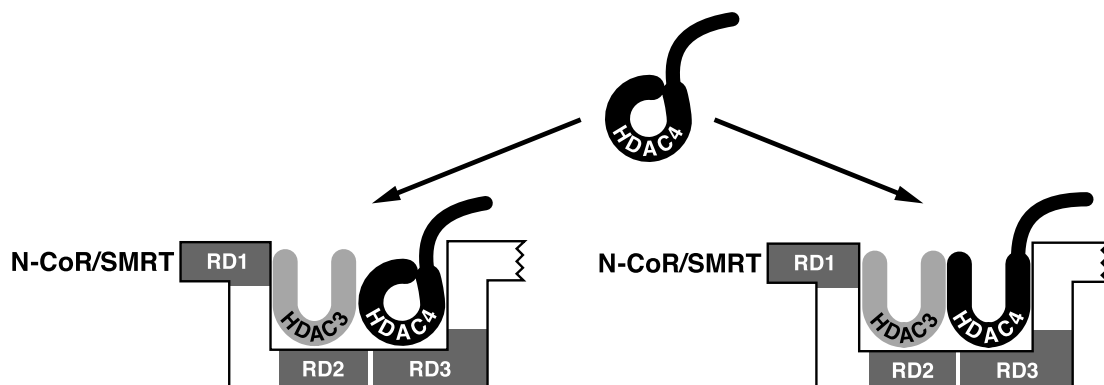
Eine der wenigen in rekombinanter Form aktiven HDACs, yHOS3, wurde, sowohl aus *S. cerevisiae* als auch Bakterien aufgereinigt, in Form von Homodimeren gefunden (Carmen et al., 1999). Ebenso sind sowohl HDAC1 als auch HDAC2 in einem enzymatisch aktiven HDAC-Minimalkomplex enthalten (Zhang et al., 1999). In HDAC6 sind zwei HDAC-Domänen direkt kovalent miteinander verbunden. Bisher war jedoch nicht klar, welche Funktion zwei HDAC-Domänen innerhalb derselben HDAC-Komplexe ausüben. Durch detaillierte Analyse von HDAC4-Punkt- und Deletionsmutanten konnte zum ersten Mal ein direkter Zusammenhang zwischen einer enzymatischen HDAC-Aktivität und der Interaktion von HDAC-Domänen hergestellt werden: Alle Mutationen von HDAC4, die einen Verlust der Aktivität zur Folge haben, führen gleichzeitig zu einem Verlust der Bindung zu HDAC3. Außerdem kann von Zellextrakten, die an HDAC3 verarmt sind, nur eine sehr viel geringere HDAC4-Aktivität erhalten werden. Chromatographische Fraktionierung bestätigte, daß es innerhalb der Zelle zwei unterschiedliche HDAC4-Formen gibt: Enzymatisch aktiv, im Komplex mit HDAC3 und enzymatisch inaktiv als niedermolekularer Fraktionen.

Die Wechselwirkung dieser beiden HDACs ist jedoch nicht direkt. Alle Versuche, eine direkte Bindung dieser beiden Faktoren und damit enzymatisch aktive Komplexe unter Verwendung von rekombinanten Proteinen zu reproduzieren, scheiterten, selbst wenn die beiden HDACs gleichzeitig zusammen hergestellt wurden. Die

genaue Analyse der Bindung führte vielmehr zur Identifizierung zweier ähnlicher hochmolekularer Faktoren, N-CoR und SMRT, die die Wechselwirkung von HDAC4 (und HDAC7) mit HDAC3 vermitteln. Diese Faktoren wurden bereits mit der Repression zahlreicher Gene in Verbindung gebracht (Cress und Seto, 2000).

Es konnte gezeigt werden, daß N-CoR (und SMRT) eine Brückenfunktion ausüben, indem sie HDAC4 oder HDAC7 sowie HDAC3 an unterschiedliche Domänen binden. Diese HDAC-Bindungsdomänen sind von großem Interesse, da sie bereits unabhängig mit der Repression unterschiedlicher Gene in Verbindung gebracht wurden (Horlein et al., 1995; Ordentlich et al., 1999; Park et al., 1999). Da HDACs der Klasse II auch in der Gegenwart von TSA mit HDAC3 interagieren, ist die enzymatische HDAC-Aktivität selbst für die gegenseitige Wechselwirkung der HDACs und für die Bindung an N-CoR/SMRT nicht nötig.

Zwei unterschiedliche Modelle können die enzymatische Aktivität der HDACs der Klasse II mit nur einer HDAC-Domäne erklären (Abbildung 62). (a) HDAC4, HDAC5 und HDAC7 sind selbst inaktiv. Sie sind keine funktionellen



**Abbildung 62. Modell des enzymatisch aktiven HDAC4-HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexes.** HDAC4 existiert in der Zelle in zwei unterschiedlichen Formen. Freies HDAC4 ist nicht mit HDAC3-N-CoR/SMRT assoziiert und ist enzymatisch nicht aktiv (repräsentiert durch die geschlossene katalytische Domäne). Nach der Bindung von HDAC4 an den HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplex bestehen theoretisch zwei Möglichkeiten: Links, HDAC4 trägt nicht zur enzymatischen Aktivität des HDAC4-HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexes bei und ist ein konstitutiv inaktiver Faktor; die Aktivität des Komplexes wird lediglich von aktivem HDAC3 vermittelt; rechts, die Bindung von HDAC4 an den HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplex führt zur allosterischen Aktivierung der enzymatischen Aktivität von HDAC4 (induzierte konformative Veränderung der Tertiärstruktur, repräsentiert durch die geöffnete katalytische Domäne). Ähnliche Überlegungen gelten auch für die anderen HDACs der Klasse II mit nur einer HDAC-Domäne, HDAC5 und HDAC7.

Enzyme und tragen auch nicht zur enzymatischen Aktivität der diese Faktoren enthaltenden Multiproteinkomplexe bei. Diese HDACs binden vielmehr an enzymatisch aktive HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexe und sind in ihrer Funktion von diesen abhängig (Guenther et al., 2000; Li et al., 2000; Underhill et al., 2000; Urnov et al., 2000; Wen et al., 2000). Die biologische Bedeutung der HDACs der Klasse II könnte dann vor allem darin bestehen, die Verbindung zwischen den HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexen und anderen Faktoren herzustellen. Für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen stellt dabei vor allem die N-terminale Domäne eine günstige Plattform dar. So wurden Interaktionen der N-terminalen Region von HDAC4 und HDAC5 mit Faktoren der MEF2-Familie (“*myocyte enhancer factor 2*”) von Transkriptionsregulatoren beschrieben (Miska et al., 1999; Wang et al., 1999). Durch gleichzeitige Bindung an derartige Transkriptionsfaktoren und die HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexe über unterschiedliche Domänen könnte enzymatische HDAC-Aktivität an Regionen des Genoms rekrutiert werden, die entsprechende Erkennungssequenzen aufweisen. (b) HDAC4, HDAC5 und HDAC7 existieren in zwei unterschiedlichen funktionellen Zuständen; nicht-gebunden an die HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexe und enzymatisch inaktiv sowie enzymatisch aktiv nach Bindung an diese Komplexe. Die HDACs der Klasse II werden im Context der HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexe entweder durch strukturelle Veränderungen (allosterische Regulation) oder/und eine posttranslationale Modifikation, die durch einen Cofaktor in diesem Komplex vermittelt wird, aktiviert.

Die bislang gewonnenen Erkenntnisse sind leider nicht ausreichend, zwischen diesen beiden Modellen mit Sicherheit zu entscheiden. Mehrere Beobachtungen und Überlegungen scheinen jedoch darauf hinzudeuten, daß sowohl die HDACs der Klasse II als auch HDAC3 innerhalb der N-CoR/SMRT-Corepressorkomplexe aktive Enzyme sind. (I) Die Primärstruktur der C-terminalen Domäne der HDACs der Klasse II ist äußerst konserviert, nicht nur innerhalb dieser Gruppe von Proteinen und im Vergleich zu yHDA1, sondern auch relativ zu HDACs der Klasse I und yRPD3 (Leipe und Landsman, 1997; Finnin et al., 1999). (II) Die Aminosäuresequenzen der HDACs der Klasse II können ohne Schwierigkeiten auf die prototypische röntgenkristallographische Struktur eines bakteriellen, HDAC-ähnlichen Proteins modelliert werden (“*histone desacetylase like protein*”, HDLP; Finnin et al., 1999). Obwohl Prokaryonten selbst keine Histonproteine enthalten, konnte in enzymatischen Ak-

tivitätstests mit Histonen und Histonpeptidfragmenten tatsächlich eine schwache TSA-sensitive HDAC-Aktivität dieses Proteins nachgewiesen werden (Finnin et al., 1999). (III) Punktmutationen in HDAC4, die zum Austausch von Aminosäureresten führen, die im hypothetischen Katalysemechanismus des HDLP-Proteins eine wichtige Rolle spielen, führen zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität von HDAC4 (Finnin et al., 1999). (IV) Die HDAC-Domänen in HDAC6 sind im isolierten Zustand alleine nicht aktiv und interagieren weder untereinander noch mit HDAC3. Diese Beobachtungen indizieren, daß die Notwendigkeit zweier unabhängiger, sich ergänzender HDAC-Domänen in HDAC6 durch kovalente Bindung gelöst ist. HDACs der Klasse II mit lediglich einer HDAC-Domäne sind hingegen von der Rekrutierung einer weiteren HDAC, HDAC3, über die vermittelnde Aktivität von Cofaktoren (N-CoR/SMRT) abhängig. (V) Der Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb der HDAC-Domäne von HDAC4 führt direkt zu einem Verlust der Bindung zu N-CoR/SMRT. Dies deutet auf eine strukturelle Verknüpfung des katalytischen Zentrums und der Interaktionsoberfläche für die Wechselwirkung mit N-CoR/SMRT in HDAC4 hin. Umgekehrt könnte die Bindung des HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexes eine Änderung der Konformation von HDAC4 induzieren, die zur Aktivierung des katalytischen Zentrums führt. Derartige, durch die Bindung anderer Faktoren induzierte, Konformationsänderungen weisen im Allgemeinen auf allosterische Regulationsmechanismen hin (Boyer, 1970). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß die Inkubation von HDLP mit TSA nicht nur zur Blockierung des pseudo-katalytischen Zentrums, sondern auch zu einer Veränderung der Konformation einiger Bereiche an der Oberfläche dieses Faktors führt (Finnin et al., 1999).

### **4.3 Corepressorkomplexe und HDAC-Aktivität**

Die nukleären Proteine N-CoR und SMRT waren ursprünglich als essentielle Cofaktoren der durch Steroidhormonrezeptoren und den Thyroidhormonrezeptor vermittelten transkriptionellen Regulation entdeckt worden (Chen und Evans, 1995; Horlein et al., 1995). Sie wurden in der Folgezeit mit den Repressionsmechanismen einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren in Verbindung gebracht. Ein Umstand, der wesentlich zum Begriff der Corepressoren beziehungsweise der Corepression bei-



trug (Xu et al., 1999; Glass und Rosenfeld, 2000). Beide Faktoren haben ein hohes Molekulargewicht (ca. 270 kDa) und stellen eine ideale Plattform für den Aufbau und Zusammenhalt hochmolekularer Multiproteinkomplexe dar. Obwohl bereits frühzeitig sogenannte Repressordomänen (RD) in der N-terminalen Region dieser Proteine beschrieben wurden (Horlein et al., 1995; Ordentlich et al., 1999), war lange Zeit unklar, auf welche Weise N-CoR und SMRT zur Repression zahlreicher Zielgene beitragen. Ein erster Hinweis auf den Wirkungsmechanismus dieser Proteine konnte erhalten werden, als die durch diese Faktoren vermittelte Corepression mit der Desacetylierung von Histonen und dem SIN3/HDAC1/HDAC2-Komplex in Verbindung gebracht werden konnte (Alland et al., 1997; Heinzel et al., 1997; Nagy et al., 1997; Laherty et al., 1998; Xu et al., 1998). Allerdings waren biochemische und Immunaffinitätsaufreinigungen nicht in der Lage, eine stabile Bindung des SIN3/HDAC1/HDAC2-Komplexes an N-CoR oder SMRT nachzuweisen (Guenther et al., 2000; Huang et al., 2000; Li et al., 2000; Urnov et al., 2000; Wen et al., 2000).

Innerhalb dieser Arbeit wurden N-CoR und SMRT als essentielle Faktoren für die Vermittlung der Bindung der HDACs der Klasse II mit einer HDAC-Domäne und HDAC3 entdeckt. Diese Bindung ist für die enzymatische Aktivität der HDACs der Klasse II unabdingbar. HDAC3 und HDAC4 oder HDAC7 binden an unterschiedliche RD-Domänen von N-CoR und die Existenz enzymatisch aktiver Komplexe dieser Faktoren konnte nachgewiesen werden. Innerhalb der Zelle sind die enzymatischen Aktivitäten von HDAC4 und HDAC7 voneinander unabhängig. Beide HDACs sind jedoch auf die Bindung derselben Cofaktoren einschließlich HDAC3 und N-CoR/SMRT angewiesen. Da sowohl überexprimierte als auch rekombinante HDAC4-, HDAC5- und HDAC7-Proteine in der Lage sind, sehr effizient hohe HDAC-Aktivität in Abhängigkeit der Rekrutierung von HDAC3 zu bilden, ist zu vermuten, daß bereits vorgebildete HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexe rekrutiert werden. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, daß die Mehrheit endogenen N-CoRs und SMRTs in einem stabilen Komplex mit HDAC3 vorliegt (Li et al., 2000).

Innerhalb der Zelle liegen demnach zwei Formen der HDACs der Klasse II mit einer HDAC-Domäne vor: enzymatisch aktiv, komplexiert mit HDAC3-N-CoR/SMRT und nicht an HDAC3-N-CoR/SMRT gebunden und enzymatisch inaktiv. Die relativ geringe Ausbeute an endogenem HDAC3 bei der Immunpräzipitation von endogenem HDAC4 läßt darauf schließen, daß unter

Normalbedingungen lediglich eine relativ geringe Fraktion des endogenen HDAC4 (oder HDAC5 oder HDAC7) an HDAC3-N-CoR/SMRT gebunden ist (Huang et al., 2000; Kao et al., 2000). Die Funktion der überwiegenden Menge an HDAC-Protein der Klasse II, das in freier Form oder komplexiert mit anderen Faktoren vorliegt, ist hingegen unbekannt. Die Entdeckung eines nukleo-zytoplasmatischen Austausches der Klasse II-Proteine stellt in diesem Zusammenhang eine wichtige Regulationsmöglichkeit der Aktivität dieser Faktoren dar (diese Arbeit; Grozinger und Schreiber, 2000; McKinsey et al., 2000; Wang et al., 2000). Es ist anzunehmen, daß posttranslationale Modifikationen der Corepressoren und/oder HDACs als Folge spezifischer Signale die Bildung der Multiproteinkomplexe induzieren oder blockieren. Ebenso könnte diese in ihrer Zusammensetzung reguliert werden. Freie HDACs der Klasse II könnten aus dem Zellkern durch spezifischen Export entfernt werden und im Zytoplasma für eine nachfolgende Aktivierung zur Verfügung gehalten werden.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Aktivität und Bedeutung der HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexe, wenn keine HDAC der Klasse II gebunden ist. Werden derartige Komplexe erst durch die Bindung von HDACs der Klasse II aktiviert oder besitzen sie von diesen unabhängige Funktionen? Da es bisher nicht möglich war, enzymatisch aktive Komplexe mit rekombinanten HDAC3-, HDAC4- und N-CoR- oder SMRT-Proteinen herzustellen (Dr. Franck Dequiedt, Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California, San Francisco, USA; persönliche Mitteilung), stellt sich weiterhin die Frage, welche zusätzlichen Faktoren für die Aktivität und Funktionalität dieser HDAC-Corepressor-komplexe nötig sind. Die Identifizierung und Charakterisierung der p32 und p62 Proteine ist hierbei von großer Wichtigkeit. Ebenso stellt die direkte biochemische Aufreinigung und Darstellung der aktiven Komplexe eine große Herausforderung dar.

Für die enzymatische Aktivität der HDACs der Klasse II scheinen N-CoR und SMRT weitgehend dieselbe Funktion auszuüben, und zahlreiche Transkriptionsfaktoren können an beide Corepressoren gleichermaßen binden (Xu et al., 1999). Dennoch ist es unwahrscheinlich, daß N-CoR und SMRT und die von ihnen abgeleiteten Komplexe innerhalb der Zelle identische und redundante Funktionen wahrnehmen. Mausnullmutanten in N-CoR-Genen zeigen sehr detaillierte embryonale Entwicklungsstörungen (Jepsen et al., 2000) und neutralisierende Antikörper gegen N-CoR oder SMRT rufen spezifische zelluläre Defekte hervor (Glass und Rosenfeld,

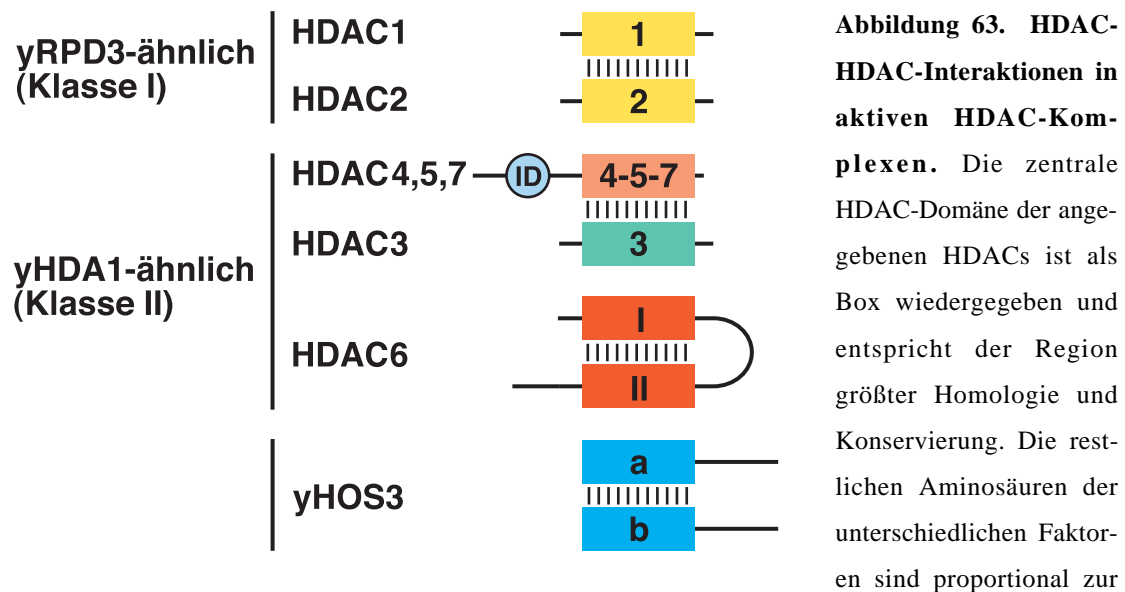
2000). Die induzierte Bindung einer spezifischen HDAC der Klasse II an das eine oder andere Corepressorprotein könnte einen wichtigen Regulationsmechanismus für deren biologische Aktivität darstellen. Es ist anzunehmen, daß Komplexe unterschiedlicher Zusammensetzung zu bestimmten Zeitpunkten an verschiedene Stellen des Genoms rekrutiert werden und auf diese Weise spezielle Transkriptionsmuster steuern.

#### **4.4 HDACs und HDAC-Aktivität**

Es ist auffallend, daß alle bisher analysierten HDAC-Komplexe in höheren Eukaryonten mehr als eine HDAC-Domäne enthalten. Sowohl der SIN3- als auch der NURD/Mi-2-Corepressorkomplex enthalten die yRPD3-ähnlichen HDACs, HDAC1 und HDAC2 (Zhang et al., 1998b; Zhang et al., 1998c). Beim Versuch, enzymatisch aktive Minimalkomplexe unter Verwendung rekombinanter Proteine zu rekonstituieren, waren sowohl diese beiden HDACs als auch zusätzliche Cofaktoren notwendig (Zhang et al., 1999). Innerhalb dieser Arbeit konnte eine neue Gruppe von HDACs, die von yHDA1 in *S. cerevisiae* abgeleitet sind, kloniert und enzymatisch analysiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß HDAC4, HDAC5 und HDAC7, die lediglich eine einzige Region mit Ähnlichkeit zu yHDA1 aufweisen, von der Bildung eines Komplexes, der HDAC3, eine HDAC der Klasse I, enthält, abhängig sind. HDAC6, ein weiteres Protein, das Homologie zu yHDA1 besitzt, ist einzigartig, da es zwei yHDA1-ähnliche Domänen in Serie enthält. Das yHOS3-Protein aus *S. cerevisiae*, die einzige HDAC, die in phylogenetischen Sequenzanalysen weder der Klasse I noch der Klasse II von HDACs zugeordnet werden kann (Grozinger et al., 1999), wurde enzymatisch aktiv sowohl in nativer Form aus Hefezellen als auch in rekombinanter Form aus Bakterienzellen in Form von Homodimeren aufgereinigt (Carmen et al., 1999). Zusammengenommen lassen diese Beobachtungen auf ein generelles hypothetisches Modell schließen, bei dem mehr als eine HDAC-Domäne für die enzymatische Aktivität von HDACs nötig ist und bei dem die Aktivitäten der HDACs durch allosterische Wechselwirkungen reguliert werden (Abbildung 63).

Dabei erhebt sich die Frage, in welcher Weise zwei HDAC-Domänen miteinander kooperieren können. Die am höchsten konservierten Regionen in nahezu

allen HDACs können auf die monomere Struktur von HDLP zurückgeführt werden (Finnin et al., 1999). Deshalb scheint es unwahrscheinlich, daß zwei HDAC-Domänen dimerisieren, um eine einziges katalytisches Zentrum zu bilden. Interessanterweise wurde eine Dimerisierung über offensichtlich flexible Kontaktflächen an der Oberfläche von HDLP beobachtet, wenn das aufgereinigte rekombinante Protein mit dem HDAC-Inhibitor TSA inkubiert wurde (Finnin et al., 1999). Dies könnte darauf hinweisen, daß die Dimerisierung dieses nur sehr schwach als HDAC aktiven Faktors, die durch einen Pseudosubstratinhibitor wie TSA, hervorgerufen wird, zur Induktion einer funktionelleren Konformation führt. Ähnliche allosterische Mechanismen könnten die Aktivität der HDACs bei der Bildung von Komplexen mit zwei HDAC-Domänen induzieren. Die Entwicklung von einfacheren und sensitiveren enzymatischen Aktivitätstests, die eine detaillierte kinetische Analyse der Aktivität von HDAC-Komplexen unter verschiedenen Bedingungen ermöglichen, sollen in Zukunft



Größe dieser Domäne als Linien dargestellt. Aufgrund von Sequenzanalysen auf der Basis phylogenetischer Beziehungen kann yHOS3 keiner der beiden Klassen der HDACs zugeordnet werden (Grozinger et al., 1999). HDACs der Klasse I: HDAC1, HDAC2, HDAC3; HDACs der Klasse II: HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7. ID, Interaktionsdomäne in der N-terminalen Region von HDAC4, HDAC5 und HDAC7 für die Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren (zum Beispiel MEF2). HDAC1 und HDAC2 wurden in denselben hochmolekularen Multiproteinkomplexen gefunden. HDAC4, HDAC5 und HDAC7 rekrutieren HDAC3 für enzymatische Aktivität. Beide HDAC-Domänen in HDAC6 (I und II) sind für die Aktivität dieses Faktors nötig. yHOS3 bildet enzymatisch aktive Homodimere (a und b, Carmen et al., 1999).

Aufschluß über die Regulation der einzelnen HDACs innerhalb unterschiedlicher HDAC-Komplexe bringen.

#### **4.5 Ausblick**

Zum besseren Verständnis der Bedeutung der Modifizierung der Chromatinstruktur und besonders der Acetylierung von Histonen für zelluläre Regulationsmechanismen ist es nötig, die beteiligten Enzyme und enzymatischen Aktivitäten im Detail zu charakterisieren. Innerhalb dieser Arbeit konnten vier neue HDACs identifiziert und erstmalig kloniert werden (HDACs der Klasse II). Wie die Untersuchung des Expressionsmusters zweier dieser neuen Faktoren ergab, sind diese nicht in allen Geweben und Zelltypen gleichermaßen exprimiert. Sie weisen vielmehr eine begrenzte Verteilung auf, die auf eine Rolle bei zellspezifischen Differenzierungsprozessen hindeutet. Weitere Studien sollten in Zukunft Aufschluß darüber geben, ob und welche speziellen Funktionen die HDACs der Klasse II innerhalb verschiedener Gewebe und Zelltypen ausüben. Für derartige Untersuchungen stehen nun nicht nur molekularbiologische Reagenzien (cDNAs, Plasmide, Sonden etc.) sondern auch hochspezifische Antiseren gegen HDAC4 und HDAC7 zur Verfügung.

Die anfängliche Untersuchung der enzymatischen Aktivität der HDACs der Klasse II ergab einen gemeinsamen Mechanismus für die Faktoren, die nur eine HDAC-Domäne aufweisen, der von der Komplexbildung mit HDAC3 und den Corepressoren N-CoR oder SMRT abhängig ist. Auf der Basis der vorgelegten Studien und des neu entwickelten Testsystems unter Verwendung rekombinanter Proteine sollte es in naher Zukunft möglich sein, nicht nur alle Komponenten der enzymatisch aktiven HDAC-Komplexe zu identifizieren, sondern auch enzymatische HDAC-Aktivität direkt auf der Basis rekombinanter Proteine zu erzeugen. Die Etablierung derartiger experimenteller Systeme sollte es schließlich erlauben, die Bedeutung und Wechselwirkung unterschiedlicher HDAC-Domänen in den enzymatisch aktiven HDAC-Corepressorkomplexen aufzuklären und die Reaktions- und Regulationsmechanismen dieser HDACs genau zu analysieren. Ebenso ist aus derartigen Ansätzen in Verbindung mit röntgenkristallographischen Strukturanalysen zu erwar-

ten, daß exogene Steuerungsmöglichkeiten der HDACs beispielsweise unter Einsatz Isoenzym-spezifischer Inhibitoren erkannt werden.

Obwohl HDAC4, HDAC5 und HDAC7 Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Interaktion mit den Corepressorproteinen N-CoR und SMRT aufweisen, ist anzunehmen, daß jeder dieser Faktoren und auch HDAC6 sehr spezielle Funktionen innerhalb der Zelle wahrnimmt. Der Identifizierung von Faktoren, die mit der einen oder anderen HDAC der Klasse II spezifisch wechselwirken, kommt dabei große Bedeutung zu. Vor allem ist zu erwarten, daß die weniger konservierten N-terminale Region von HDAC4, HDAC5 und HDAC7 eine wichtige Interaktionsdomäne darstellt. Außerdem sollte untersucht werden, ob und wie die Funktion der HDACs der Klasse II durch posttranslationale Modifikationen sowohl innerhalb dieser Region als auch der C-terminalen katalytischen Domäne gesteuert wird. Neben der Kontrolle der Bildung von hochmolekularen HDAC-Corepressorkomplexen könnte zum Beispiel der nukleo-zytoplasmatische Austausch dieser Faktoren durch spezifische Signale und Signaltransduktionswege geregelt werden.

Sowohl N-CoR als auch SMRT interagieren mit allen HDACs der Klasse II mit nur einer HDAC-Domäne und HDAC3. Die bisherigen Untersuchungen zeigen eine gewisse Redundanz dieser beiden Faktoren hinsichtlich der Vermittlung der enzymatischen Aktivität der HDACs der Klasse II. Obwohl ebenso mehrere Transkriptionsfaktoren an beide Corepressorproteine gleichermaßen binden können (Xu et al., 1999) deuten erste genetische Analysen darauf hin, daß jeder dieser Faktoren sehr spezifische Funktionen innerhalb der Zelle ausübt (Jepsen et al., 2000). In Zusammenhang mit der Bedeutung dieser Corepressorkomplexe bei der Umsetzung hormoneller Signale ist von weiteren Studien zu erwarten, daß die spezifischen Funktionen des einen oder anderen HDAC-Corepressorkomplexes innerhalb zellulärer und entwicklungsbiologischer Regulationsmechanismen erkannt werden. Vor allem vor dem Hintergrund der sich mehr und mehr abzeichnenden Rolle von pathologischen Veränderungen der Chromatindynamik und -struktur bei der Entstehung und Malignisierung von Tumoren ist zu erwarten daß die detaillierte Kenntnis der Funktionsweise von Chromatin-modifizierenden Enzymkomplexen neue Ansätze zur Behandlung derartiger Krankheiten aufzeigt.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Computer-unterstützte Datenbanksuchen in Sequenzbibliotheken humaner DNAs, abgeleitet sowohl von genomischen Klonen als auch von mRNAs, wurden mit einer Sonde entsprechend einer HDAC in *S. cerevisiae*, yHDA1, durchgeführt. Auf diese Weise konnten vier neue Faktoren, HDAC4, HDAC5, HDAC6 und HDAC7, erstmalig identifiziert werden. cDNAs für alle diese Faktoren konnten unter Verwendung unterschiedlicher auf PCR-basierender Techniken kloniert werden. Die funktionelle und Computer-unterstützte Analyse der klonierten Sequenzen deutet darauf hin, daß dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit jeweils vollständige Leserahmen erhalten wurden. Der HDAC4-Leserahmen von 3255 nt codiert für ein Polypeptid von 1084 aa mit einem theoretischen Molekulargewicht von 119 kDa; der HDAC5-Leserahmen von 3369 nt codiert für ein Polypeptid von 1122 aa mit einem theoretischen Molekulargewicht von 122 kDa; der HDAC6-Leserahmen von 3645 nt codiert für ein Polypeptid von 1214 aa mit einem theoretischen Molekulargewicht von 131 kDa und der HDAC7-Leserahmen von 2739 nt codiert für ein Polypeptid von 912 aa mit einem theoretischen Molekulargewicht von 99 kDa.

Die HDAC4-, HDAC5- und HDAC7-Proteine sind ähnlich aufgebaut. Eine Region von ca. 450 aa mit großer Ähnlichkeit zur Primärsequenz der für die Datenbanksuche eingesetzten yHDA1-Domäne befindet sich in Nähe des C-Terminus. Davor befinden sich N-terminale Regionen unterschiedlicher Länge (460 aa in HDAC7 bis 670 aa in HDAC5). Der schematische Aufbau von HDAC6 unterscheidet sich hingegen signifikant von HDAC4, HDAC5 und HDAC7. HDAC6 weist zwei Domänen in Serie mit Ähnlichkeit zu yHDA1, gefolgt von einer C-terminalen Region von ca. 300 aa auf. Die von yHDA1 abgeleiteten Domänen der neu klonierten Proteine sind zur entsprechenden Sequenz in yHDA1 zu ca. 60% homolog. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit dieses Sequenzmotifs und um diese neuen Faktoren von einer zweiten HDAC in Hefe, yRPD3, und zu dieser homologen Proteinen in höheren Eukaryonten abzugrenzen, wurden HDAC4, HDAC5, HDAC6 und HDAC7 zu einer neuen Klasse II humaner HDACs zusammengefaßt (Fischle et al., 1999; Grozinger et al., 1999).

Die Analyse des Expressionsmusters von HDAC4 und HDAC7 mittels Northern Blots zeigte eine relativ begrenzte Verteilung. Thymus, Dünndarm und

Colon enthielten am meisten HDAC4-mRNA. Niere, Prostata und Ovarien wiesen eine mittelmäßige und periphere Leukozyten eine sehr schwache HDAC4-Expression auf. Die Expression von HDAC7 ist noch selektiver. Thymusgewebe enthielt eine vielfach höher Menge an HDAC7-mRNA als alle anderen untersuchten Gewebetypen. Aufgrund des selektiven Expressionsprofils der HDACs der Klasse II kann angenommen werden, daß diese spezifische Aufgaben innerhalb der Differenzierung bestimmter Gewebe sowie der embryonalen Entwicklung ausüben.

In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß transient exprimierte Fusionsproteine von HDAC4 und HDAC7 mit C-terminalem FLAG-Epitop in diskreten Strukturen innerhalb des Zellkerns akkumulieren. Dabei waren die HDAC-Fusionsproteine von den Nukleoli, in denen die Synthese der rRNA und deren Einbindung in Ribosomen stattfindet, ausgeschlossen. Da unabhängig von dieser Arbeit gezeigt wurde, daß derartige Mikrozononen an Transkriptionsfaktoren, anderen HDACs, RNA Polymerasen und nascierender RNA angereichert sind (Hendzel et al., 1998; Misteli, 2001), ist zu vermuten, daß die HDACs der Klasse II an transkriptionellen Regulationsprozessen teilnehmen.

Unterschiede hinsichtlich der Verteilung zwischen Zellkern und Zytoplasma innerhalb unterschiedlicher Zelllinien sowie vorläufige Resultate mit Toxinen, die den Proteinexport aus dem Zellkern inhibieren, lassen vermuten, daß HDAC7 zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma in einem dynamischen Gleichgewicht ausgetauscht werden kann. Ein derartiger nukleo-zytoplasmatischer Austausch könnte einen wichtigen Regulationsmechanismus für die biologische Aktivität von HDACs der Klasse II darstellen.

Zur Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften der HDACs der Klasse II konnte auf der Basis bereits veröffentlichter Arbeiten ein modifizierter Aktivitätstest für Histon-Desacetylasen etabliert werden (Alonso und Nelson, 1986; Taunton et al., 1996). Dieser beruht auf der Freisetzung radiomarkierten Acetats aus einem chemisch unter Verwendung von [<sup>3</sup>H]-Acetat peracetylierten Substratpeptidfragment entsprechend des N-Terminus des humanen Histons H4.

Unter Verwendung dieses Aktivitätstests konnte in unabhängigen Untersuchungen gezeigt werden, daß alle HDACs der Klasse II mit enzymatischer HDAC-Aktivität assoziieren: (a) Es konnten spezifische polyclonale Antiseren gegen HDAC4 und HDAC7 etabliert werden. Unter Verwendung dieser Antiseren konnte aus Ex-



trakten unterschiedlicher Zelllinien enzymatische HDAC-Aktivität immunpräzipitiert werden. Diese Aktivität wies eine hohe Sensitivität für ein Schimmelpilztoxin (TSA) auf, das in Zellkulturexperimenten zur Hyperacetylierung von Histonen führt. (b) Fusionsproteine von HDAC4, HDAC5, HDAC6 und HDAC7 mit C-terminalem FLAG-Epitop, die in 293-Zellen transient überexprimiert wurden, immunpräzipitierten mit enzymatischer HDAC-Aktivität. Die Aktivitäten der HDACs der Klasse II waren in diesem Testsystem denen der HDACs der Klasse I, HDAC1, HDAC2 und HDAC3, vergleichbar. Entsprechende Beobachtungen wurden auch nach konstitutiver Expression von HDAC4-Fusionsproteinen in 293-Zellen gemacht. (c) In Bakterien produzierte GST-HDAC4- und GST-HDAC7-Proteine wiesen keine enzymatische Aktivität auf. Nach der Inkubation mit Extrakten unterschiedlicher Zelllinien konnte jedoch erstmalig eine HDAC-Aktivität von bakteriell produzierten, humanen HDAC-Proteinen gemessen werden. Diese enzymatische Analyse rekombinanter Faktoren nach der Inkubation mit Zellextrakten stellt eine völlig neuartige Methode zur Untersuchung von HDACs dar.

Die Untersuchung von Deletionsmutanten sowohl in Zellkulturexperimenten nach Transfektion als auch unter Verwendung rekombinanter Proteine bestätigte, daß die C-terminalen Regionen in HDAC4, HDAC5 und HDAC7 mit Homologie zu yHDA1 die katalytischen HDAC-Domänen dieser Faktoren darstellen. Fragmente der 473 C-terminalen Aminosäuren von HDAC4 (HDAC4(aa 612-1084)), der 476 C-terminalen Aminosäuren von HDAC5 (HDAC5(aa 646-1122)) sowie der 475 C-terminalen Aminosäuren von HDAC7 (HDAC7(aa 438-912)) waren ausreichend, die Desacetylierung des H4-Substratpeptids herbeizuführen.

Die detaillierte Untersuchung der HDAC-Aktivität dieser Domänen zeigte jedoch, daß sie selbst keine intrinsische Aktivität aufweisen, sondern vielmehr von der Bindung einer zweiten HDAC, HDAC3, abhängig sind: (a) Alle weiteren untersuchten enzymatisch aktiven Deletionsmutanten von HDAC4 und HDAC7 banden HDAC3 sowohl in Zellkulturexperimenten nach Transfektion als auch nach der Inkubation rekombinanter Proteine mit Zellextrakten. Keine Bindung wurde hingegen für enzymatisch inaktive Deletionsmutanten gefunden. (b) Über die Immunpräzipitation endogener Proteine konnte eine Interaktion von HDAC4 und HDAC3 innerhalb nicht-transfizierter Zellen nachgewiesen werden. Zelluläres HDAC3 wird offensichtlich von den transient überexprimierten C-terminalen Domänen von HDAC4, HDAC5

und HDAC7 sehr effizient gebunden. (c) Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten, daß HDAC4 und HDAC7 mit HDAC3 innerhalb derselben Mikrozonen im Zellkern lokalisiert sind. (d) Auf der Basis der veröffentlichten dreidimensionalen Struktur eines bakteriellen, HDAC-ähnlichen Proteins (*“histone desacetylase like protein”*, HDLP; Finnin et al., 1999) wurden HDAC4-Punktmutanten, die zum Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb des putativen katalytischen Zentrums führen, hergestellt. Alle enzymatisch inaktiven Punktmutanten verloren mit der HDAC-Aktivität gleichzeitig ihre Bindungsfähigkeit zu HDAC3. (e) Eine Affinitätsaufreinigung sowohl des endogenen als auch von überexprimiertem HDAC4 zeigte eine enzymatisch aktive Species komplexiert mit HDAC3 sowie eine enzymatisch inaktive Form, an die HDAC3 nicht gebunden war. (f) Auf der Basis von Gelfiltration gelang eine chromatographische Trennung aktiver und inaktiver HDAC4-Komplexe. Nur die hochmolekulare HDAC4-Species in Verbindung mit HDAC3 waren enzymatisch aktiv. Niedermolekulare HDAC4-Fractionen, die kein HDAC3 enthielten, wiesen keine HDAC-Aktivität auf. (g) Unter Verwendung eines spezifischen Antiserums gegen HDAC3 konnte der Gehalt an HDAC3 in Zellextrakten deutlich reduziert werden. Nach der Depletion von HDAC3 war die mit HDAC4 assoziierte enzymatische Aktivität stark vermindert. Ähnliche Resultate wurden nach der Depletion von HDAC3 mittels rekombinatem GST-HDAC4(aa 612-1084) erzielt, das HDAC3 mit hoher Effizienz bindet.

Eine direkte Interaktion von HDAC4 und HDAC7 mit HDAC3 konnte in Bindungsstudien unter Verwendung rekombinanter Proteine nicht nachgewiesen werden. Die Analyse von Proteinen, die sowohl HDAC4 als auch HDAC3 binden führte jedoch zur Identifizierung von mindestens drei Faktoren von 32, 62 und 270 kDa Molekulargewicht. Unter Einsatz spezifischer Antiseren konnte gezeigt werden, daß es sich bei den 270 kDa großen Faktoren um die hochmolekularen Corepressorproteine N-CoR und SMRT handelt. Diese Proteine waren bereits mit der Repression zahlreicher Gene in Verbindung gebracht worden (Cress und Seto, 2000). In Experimenten mit rekombinanten Proteinen konnte gezeigt werden, daß N-CoR (und SMRT) die HDAC-Domänen von HDAC4 oder HDAC7 sowie HDAC3 an unterschiedliche Regionen bindet. Offensichtlich sind diese Faktoren in der Lage die für die enzymatische Aktivität der HDACs der Klasse II essentielle Wechselwirkung mit HDAC3 zu vermitteln, indem sie eine Brückenfunktion ausüben. In einer Kombina-

tion rekombinanter und zellulärer Proteine konnte die Existenz derartiger HDAC4-HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexe mit enzymatischer Aktivität tatsächlich bestätigt werden.

Kompetitionsexperimente unter Verwendung rekombinanter GST-HDAC4- und GST-HDAC7-Proteine zeigten, daß die enzymatische Aktivität dieser beiden Faktoren von denselben zellulären Cofaktoren einschließlich HDAC3 abhängig sind. Aus Zellextrakten, die wiederholt mit GST-HDAC4(aa 612-1084) inkubiert worden waren, konnte mit GST-HDAC7(aa 438-912) lediglich sehr geringe HDAC-Aktivität rekrutiert werden. Hingegen wurde in Immunpräzipitationen der endogenen HDAC4- und HDAC7-Proteine gefunden, daß enzymatisch aktive Komplexe dieser Faktoren in der Zelle nebeneinander coexistieren. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die HDACs der Klasse II mit lediglich einer HDAC-Domäne innerhalb voneinander unabhängiger Komplexe mit den Corepressorproteinen N-CoR oder SMRT und HDAC3 vorkommen.

HDAC6 wurde gesondert untersucht, da es das bisher einzige Protein ist, daß zwei HDAC-Domänen mit Homologie zu yHDA1 in Serie enthält. Untersuchungen mit den getrennten HDAC-Domänen von HDAC6 zeigten, daß diese keine eigenständige enzymatische Aktivität aufweisen. Weder in Zellkulturexperimenten nach Transfektion noch unter Verwendung rekombinanter Proteine wurde eine Bindung dieser HDAC-Domänen an HDAC3 gefunden. Obwohl die getrennten HDAC-Domänen von HDAC6 bei transienter Expression in 293-Zellen nicht miteinander interagierten, deuten die gewonnenen Erkenntnisse darauf hin, daß die kovalente Bindung der beiden HDAC-Domänen in HDAC6 für die enzymatische Aktivität dieses Faktors essentiell ist.

Auf der Basis der gemachten Beobachtungen wurden zwei unterschiedliche hypothetische Modelle für die enzymatische Aktivität der HDACs der Klasse II vorgeschlagen: (a) Die HDACs der Klasse II mit nur einer HDAC-Domäne sind selbst nicht an der enzymatischen Aktivität der diese Faktoren enthaltenden, hochmolekularen Multiproteinkomplexe beteiligt. Vielmehr rekrutieren sie lediglich bereits aktive HDAC3-N-CoR/SMRT-Komplexe. (b) Die Aktivitäten von HDACs der Klasse II werden im Context der Corepressor Komplexe durch Wechselwirkung mit HDAC3 aktiviert. Das Konzept einer gegenseitigen allosterischen Aktivierung von HDAC-Domänen läßt sich ohne Weiteres auf die Situation in anderen hoch-

molekularen HDAC Komplexeen, die mehr als eine HDAC oder HDAC-Domäne enthalten, sowie HDAC6 übertragen. Weitere Untersuchungen unter Zuhilfenahme der innerhalb dieser Arbeit entwickelten Testsysteme sollten es in Zukunft ermöglichen, die enzymatische Aktivität von HDACs der Klasse II im Detail zu analysieren.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T. und Thanos, D. (2000) *Cell*, **103**, 667-678.

Ahringer, J. (2000) *Trends Genet.*, **16**, 351-356.

Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N. und DePinho, R.A. (1997) *Nature*, **387**, 49-55.

Allfrey, V.G., Faulkner, R. und Mirsky, A.E. (1964) *Proc Natl Acad Sci USA*, **51**, 786-794.

Almer, A. und Horz, W. (1986) *Embo J*, **5**, 2681-2687.

Almouzni, G., Khochbin, S., Dimitrov, S. und Wolffe, A.P. (1994) *Dev Biol*, **165**, 654-669.

Alonso, W.R. und Nelson, D.A. (1986) *Biochim Biophys Acta*, **866**, 161-169.

Archer, S.Y. und Hodin, R.A. (1999) *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 171-174.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. und Moudrianakis, E.N. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10148-10152.

Ausio, J., Dong, F. und van Holde, K.E. (1989) *J Mol Biol*, **206**, 451-463.

Ausio, J. (1992) *J Cell Sci*, **102**, 1-5.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (Eds.) (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. und Kouzarides, T. (2001) *Nature*, **410**, 120-124.
- Bell, A.C. und Felsenfeld, G. (1999) *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 191-198.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A. und Wheeler, D.L. (2000) *Nucleic Acids Res*, **28**, 15-18.
- Bohm, L. und Crane-Robinson, C. (1984) *Biosci Rep*, **4**, 365-386.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B. und Schaffner, W. (1985) *Cell*, **41**, 521-530.
- Boyer, P.D. (Ed.) (1970) *The Enzymes*, Academic Press, London/New York.
- Bradbury, E.M. (1992) *Bioessays*, **14**, 9-16.
- Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D. und Broach, J.R. (1993) *Genes Dev.*, **7**, 592-604.
- Brenner, S.E. (1995) *Trends Genet*, **11**, 330-331.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. und Allis, C.D. (1996) *Cell*, **84**, 843-851.
- Burge, C. und Karlin, S. (1997) *J. Mol. Biol.*, **268**, 78-94.
- Cariaso, M., Folta, P., Wagner, M., Kuczmarski, T. und Lennon, G. (1999) *Bioinformatics*, **15**, 965-973.
- Carmen, A.A., Rundlett, S.E. und Grunstein, M. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 15837-15844.

Carmen, A.A., Griffin, P.R., Calaycay, J.R., Rundlett, S.E., Suka, Y. und Grunstein, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12356-12361.

Carruthers, L.M., Bednar, J., Woodcock, C.L. und Hansen, J.C. (1998) *Biochemistry*, **37**, 14776-14787.

Cary, P.D., Crane-Robinson, C., Bradbury, E.M. und Dixon, G.H. (1982) *Eur J Biochem*, **127**, 137-143.

Chen, J.D. und Evans, R.M. (1995) *Nature*, **377**, 454-457.

Cheung, W.L., Briggs, S.D. und Allis, C.D. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 326-333.

Collingwood, T.N., Urnov, F.D. und Wolffe, A.P. (1999) *J Mol Endocrinol*, **23**, 255-275.

Cress, W.D. und Seto, E. (2000) *J. Cell. Physiol.*, **184**, 1-16.

Dangond, F., Hafler, D.A., Tong, J.K., Randall, J., Kojima, R., Utku, N. und Gullans, S.R. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **242**, 648-652.

Dasso, M., Dimitrov, S. und Wolffe, A.P. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12477-12481.

Davie, J.R. und Hendzel, M.J. (1994) *J. Cell. Biochem.*, **55**, 98-105.

Davie, J.R. (1996) *J Cell Biochem*, **62**, 149-157.

Davie, J.R. (1998) *Current Opinion in Genetics and Development*, **8**, 173-178.

Davie, J.R. und Chadee, D.N. (1998) *J Cell Biochem Suppl*, **31**, 203-213.

- Davie, J.R. und Spencer, V.A. (1999) *J. Cell. Biochem.*, **Suppl 32-33**, 141-148.
- De Rubertis, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K. und Spierer, P. (1996) *Nature*, **384**, 589-591.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. und Zhou, M.M. (1999) *Nature*, **399**, 491-496.
- Dignam, J.D., Martin, P.L., Shastry, B.S. und Roeder, R.G. (1983) *Methods Enzymol.*, **101**, 582-598.
- Dong, F. und van Holde, K.E. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10596-10600.
- Downes, M., Ordentlich, P., Kao, H.Y., Alvarez, J.G. und Evans, R.M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10330-10335.
- Durrin, L., Mann, R., Kayne, P. und Grunstein, M. (1991) *Cell*, **65**, 1023-1031.
- Eddy, S.R. (1995) *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **3**, 114-120.
- Emiliani, S., Fischle, W., Van Lint, C., Al-Abed, Y. und Verdin, E. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2795-2800.
- Fenrick, R. und Hiebert, S.W. (1998) *J Cell Biochem Suppl*, **31**, 194-202.
- Finch, J.T. und Klug, A. (1976) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 1897-1901.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R. und Pavletich, N.P. (1999) *Nature*, **401**, 188-193.
- Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M.J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W. und Verdin, E. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 11713-11720.



- Fritze, C.E. und Anderson, T.R. (2000) *Methods Enzymol*, **327**, 3-16.
- Garcia-Ramirez, M., Dong, F. und Ausio, J. (1992) *J Biol Chem*, **267**, 19587-19595.
- Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C. und Ausio, J. (1995) *J Biol Chem*, **270**, 17923-17928.
- Gerhold, D. und Caskey, C.T. (1996) *Bioessays*, **18**, 973-981.
- Gill, R.W. und Sanseau, P. (2000) *Biotechnol Annu Rev*, **5**, 25-44.
- Glass, C.K. und Rosenfeld, M.G. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 121-141.
- Grosveld, F. (1999) *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 152-157.
- Grozinger, C.M., Hassig, C.A. und Schreiber, S.L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 4868-4873.
- Grozinger, C.M. und Schreiber, S.L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7835-7840.
- Grunstein, M. (1990) *Annu Rev Cell Biol*, **6**, 643-678.
- Grunstein, M. (1997) *Nature*, **389**, 349-352.
- Guenther, M.G., Lane, W.S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M.A. und Shiekhattar, R. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 1048-1057.
- Han, M. und Grunstein, M. (1988) *Cell*, **55**, 1137-1145.
- Hansen, J.C., Tse, C. und Wolffe, A.P. (1998) *Biochemistry*, **37**, 17637-17641.

Harlow, E. und Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Hassig, C.A., Tong, J.K., Fleischer, T.C., Owa, T., Grable, P.G., Ayer, D.E. und Schreiber, S.L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3519-3524.

Hayes, J.J., Clark, D.J. und Wolffe, A.P. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6829-6833.

Hebbes, T.R., Thorne, A.W. und Crane-Robinson, C. (1988) *EMBO Journal*, **7**, No 5, 1395-1402.

Hebbes, T.R., Clayton, A.L., Thorne, A.W. und Crane-Robinson, C. (1994) *EMBO J.*, **13**, 1823-1830.

Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Söderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W., Glass, C.K. und Rosenfeld, M.G. (1997) *Nature*, **387**, 43-48.

Henzel, M.J., Kruhlak, M.J. und Bazett-Jones, D.P. (1998) *Mol. Biol. Cell.*, **9**, 2491-2507.

Hewish, D.R. und Burgoyne, L.A. (1973) *Biochem Biophys Res Commun*, **52**, 504-510.

Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P. und Bradbury, E.M. (1993) *J Biol Chem*, **268**, 305-314.

Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Ramei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K. und al., e. (1995) *Nature*, **377**, 397-404.

Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G.-F., Johanson, K., Sung, C.-M., Liu, R. und Winkler, J. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 15254-15264.

- Huang, E.Y., Zhang, J., Miska, E.A., Guenther, M.G., Kouzarides, T. und Lazar, M.A. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 45-54.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S. und Tjian, R. (2000) *Science*, **288**, 1422-1425.
- Jang, W., Chen, H.C., Sicotte, H. und Schuler, G.D. (1999) *Trends Genet*, **15**, 284-286.
- Jarvik, J.W. und Telmer, C.A. (1998) *Annu Rev Genet*, **32**, 601-618.
- Jeppesen, P. und Turner, B.M. (1993) *Cell*, **74**, 281-289.
- Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T.M., Gleiberman, A.S., Lunyak, V., McEvilly, R.J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E., Hedrick, S.M., Mandel, G., Glass, C.K., Rose, D.W. und Rosenfeld, M.G. (2000) *Cell*, **102**, 753-763.
- Kadosh, D. und Struhl, K. (1998a) *Genes Dev.*, **12**, 797-805.
- Kadosh, D. und Struhl, K. (1998b) *Mol. Cell Biol.*, **18**, 5121-5127.
- Kao, H.Y., Downes, M., Ordentlich, P. und Evans, R.M. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 55-66.
- Kingston, R.E., Bunker, C.A. und Imbalzano, A.N. (1996) *Genes Dev*, **10**, 905-920.
- Kingston, R.E. und Narlikar, G.J. (1999) *Genes Dev*, **13**, 2339-2352.
- Klug, A., Rhodes, D., Smith, J., Finch, J.T. und Thomas, J.O. (1980) *Nature*, **287**, 509-516.
- Knezetic, J.A. und Luse, D.S. (1986) *Cell*, **45**, 95-104.

- Kornberg, R.D. und Lorch, Y. (1999) *Cell*, **98**, 285-294.
- Koshland, D. und Strunnikov, A. (1996) *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 305-333.
- Kozak, M. (1991) *J. Cell Biol.*, **115**, 887-903.
- Krajewski, W.A. und Becker, P.B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1540-1545.
- Kruger, W., Peterson, C.L., Sil, A., Coburn, C., Arents, G., Moudrianakis, E.N. und Herskowitz, I. (1995) *Genes Dev*, **9**, 2770-2779.
- Kruhlak, M.J., Lever, M.A., Fischle, W., Verdin, E., Bazett-Jones, D.P. und Hendzel, M.J. (2000) *J. Cell. Biol.*, **150**, 41-51.
- Kuo, M.H. und Allis, C.D. (1998) *Bioessays*, **20**, 615-626.
- Kuo, M.H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M.E. und Allis, C.D. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 627-639.
- Kuo, M.H. und Allis, C.D. (1999) *Methods*, **19**, 425-433.
- Kuo, M., vom Baur, E., Struhl, K. und Allis, C.D. (2000) *Mol. Cell*, **6**, 1309-1320.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. und Jenuwein, T. (2001) *Nature*, **410**, 116-120.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
- Laherty, C.D., Yang, W.-M., Sun, J.-M., Davie, J.R., Seto, E. und Eisenman, R.N. (1997) *Cell*, **89**, 349-356.

Laherty, C.D., Billin, A.N., Lavinsky, R.M., Yochum, G.S., Bush, A.C., Sun, J.M., Mullen, T.M., Davie, J.R., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Ayer, D.E. und Eisenman, R.N. (1998) *Mol. Cell*, **2**, 33-42.

Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D. und Wolffe, A.P. (1993) *Cell*, **72**, 73-84.

Lee, K.M. und Hayes, J.J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8959-8964.

Leipe, D.D. und Landsman, D. (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3693-3697.

Lemon, B. und Tjian, R. (2000) *Genes Dev*, **14**, 2551-2569.

Lenfant, F., Mann, R.K., Thomsen, B., Ling, X. und Grunstein, M. (1996) *Embo J*, **15**, 3974-3985.

Levinger, L. und Varshavsky, A. (1982) *Cell*, **28**, 375-385.

Li, J., Wang, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J.M., Qin, J. und Wong, J. (2000) *EMBO J.*, **19**, 4342-4350.

Loidl, P. (1988) *Febs Letters*, **227**, 91-95.

Loidl, P. (1994) *Chromosoma*, **103**, 441-449.

Lopez-Rodas, G., Brosch, G., Georgieva, E.I., Sendra, R., Franco, L. und Loidl, P. (1993) *FEBS Lett.*, **317**, 175-180.

Lorch, Y., LaPointe, J.W. und Kornberg, R.D. (1987) *Cell*, **49**, 203-210.

Lu, J., McKinsey, T.A., Zhang, C.L. und Olson, E.N. (2000) *Mol. Cell.*, **6**, 233-244.

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. und Richmond, T.J. (1997a) *Nature*, **389**, 251-260.

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. und Richmond, T.J. (1997b) *Nature*, **389**, 251-260.

Marks, P.A., Richon, V.M. und Rifkind, R.A. (2000) *J Natl Cancer Inst*, **92**, 1210-1216.

McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Jianrong, L. und Olson, E.N. (2000) *Nature*, **408**, 106-111.

Miska, E.A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S.J., Pines, J. und Kouzarides, T. (1999) *EMBO J.*, **18**, 5099-5107.

Misteli, T. (2001) *Science*, **291**, 843-847.

Mizzen, C.A. und Allis, C.D. (1998) *Cell Mol Life Sci*, **54**, 6-20.

Mutskov, V., Gerber, D., Angelov, D., Ausio, J., Workman, J. und Dimitrov, S. (1998) *Mol Cell Biol*, **18**, 6293-6304.

Nagase, T., Ishikawa, K., Nakajima, D., Ohira, M., Seki, N., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N. und Ohara, O. (1997) *DNA Res*, **4**, 141-150.

Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L. und Evans, R.M. (1997) *Cell*, **89**, 373-380.

Nelson, J.A., Reynolds-Kohler, C. und Smith, B.A. (1987) *Mol Cell Biol*, **7**, 4125-4129.

Ng, H.H. und Bird, A. (2000) *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 121-126.

Nightingale, K.P., Wellinger, R.E., Sogo, J.M. und Becker, P.B. (1998) *Embo J*, **17**, 2865-2876.

- Noll, M. (1974) *Nature*, **251**, 249-251.
- Norton, V.G., Imai, B.S., Yau, P. und Bradbury, E.M. (1989) *Cell*, **57**, 449-457.
- O'Mahony, A., Lin, X., Geleziunas, R. und Greene, W.C. (2000) *Mol Cell Biol*, **20**, 1170-1178.
- Olins, A.L. und Olins, D.E. (1974) *Science*, **183**, 330-332.
- Olins, A.L., Carlson, R.D. und Olins, D.E. (1975) *J Cell Biol*, **64**, 528-537.
- Ordentlich, P., Downes, M., Xie, W., Genin, A., Spinner, N.B. und Evans, R.M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2639-2644.
- Ordentlich, P., Downes, M. und Evans, R.M. (2001) *Curr Top Microbiol Immunol*, **254**, 101-116.
- Osborn, L., Kunkel, S. und Nabel, G.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2336-2340.
- Oudet, P., Gross-Bellard, M. und Chambon, P. (1975) *Cell*, **4**, 281-300.
- Parekh, B.S. und Maniatis, T. (1999) *Mol Cell*, **3**, 125-129.
- Park, E.J., Schroen, D.J., Yang, M., Li, H., Li, L. und Chen, J.D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3519-3524.
- Patterton, H.G. und Simpson, R.T. (1994) *Mol Cell Biol*, **14**, 4002-4010.
- Peterson, C.L. und Logie, C. (2000) *J Cell Biochem*, **78**, 179-185.
- Peterson, C.L. und Workman, J.L. (2000) *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 187-192.

Pogo, B.G., Allfrey, V.G. und Mirsky, A.E. (1966) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **55**, 805-812.

Pruss, D. und Wolffe, A.P. (1993) *Biochemistry*, **32**, 6810-6814.

Puig, O.M., Belles, E., Lopez-Rodas, G., Sendra, R. und Tordera, V. (1998) *Biochim Biophys Acta*, **1397**, 79-90.

Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B.M. und Grunstein, M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 14503-14508.

Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Suka, N., Turner, B.M. und Grunstein, M. (1998) *Nature*, **392**, 831-835.

Sahasrabudde, C.G. und Van Holde, K.E. (1974) *J Biol Chem*, **249**, 152-156.

Sambrook, J., Maniatis, T. und Fritsch, E.F. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sammons, D.W., Adams, L.D. und Nishizawa, E.E. (1981) *Electrophoresis*, **2**, 135-141.

Santisteban, M.S., Arents, G., Moudrianakis, E.N. und Smith, M.M. (1997) *Embo J*, **16**, 2493-2506.

Sassone-Corsi, P., Mizzen, C.A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A. und Allis, C.D. (1999) *Science*, **285**, 886-891.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M. (1996) *Anal Chem*, **68**, 850-858.

Simpson, R.T., Whitlock, J.P., Jr., Bina-Stein, M. und Stein, A. (1978) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **42**, 127-136.



- Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) *Gene*, **67**, 31-40.
- Smith, R.M. und Rill, R.L. (1989) *J Biol Chem*, **264**, 10574-10581.
- Solovyev, V. und Salamov, A. (1997) *Ismb*, **5**, 294-302.
- Sparrow, D.B., Miska, E.A., Langley, E., Reynaud-Deonauth, S., Kotecha, S., Towers, N., Spohr, G., Kouzarides, T. und Mohun, T.J. (1999) *EMBO J.*, **18**, 5085-5098.
- Spencer, V.A. und Davie, J.R. (1999) *Gene*, **240**, 1-12.
- Strahl, B.D. und Allis, C.D. (2000) *Nature*, **403**, 41-45.
- Struhl, K. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 599-606.
- Taunton, J., Hassig, C.A. und Schreiber, S.L. (1996) *Science*, **272**, 408-411.
- Tong, J.K., Hassig, C.A., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E. und Schreiber, S.L. (1998) *Nature*, **395**, 917-921.
- Tse, C. und Hansen, J.C. (1997) *Biochemistry*, **36**, 11381-11388.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P. und Hansen, J.C. (1998) *Mol Cell Biol*, **18**, 4629-4638.
- Turner, B.M. und O'Neill, L.P. (1995) *Semin Cell Biol*, **6**, 229-236.
- Turner, B.M. (2000) *Bioessays*, **22**, 836-845.
- Underhill, C., Qutob, M.S., Yee, S.-P. und Torchia, J. (2000) *J. Biol. Chem.*, , In press.

Urnov, F.D., Yee, J., Sachs, L., Collingwood, T.N., Bauer, A., Beug, H., Shi, Y.B. und Wolffe, A.P. (2000) *EMBO J.*, **19**, 4074-4090.

van Holde, K.E. (1988) *Histone modifications*, Springer, New York.

van Holde, K.E. (1989) *Chromatin.*, Springer-Verlag, New York.

Van Lint, C., Emiliani, S. und Verdin, E. (1996) *Gene Expr.*, **5**, 245-253.

Varshavsky, A.J., Sundin, O. und Bohn, M. (1979) *Cell*, **16**, 453-466.

Verdel, A. und Khochbin, S. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 2440-2445.

Vettese-Dadey, M., Grant, P.A., Hebbes, T.R., Crane- Robinson, C., Allis, C.D. und Workman, J.L. (1996) *Embo J*, **15**, 2508-2518.

Vidal, M. und Gaber, R.F. (1991) *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 6317-6327.

Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N. und Grunstein, M. (2000) *Nature*, **408**, 495-498.

Vukmirovic, O.G. und Tilghman, S.M. (2000) *Nature*, **405**, 820-822.

Wade, P.A., Jones, P.L., Vermaak, D. und Wolffe, A.P. (1998) *Curr. Biol.*, **8**, 843-846.

Wallberg, A.E., Flinn, E.M., Gustafsson, J.A. und Wright, A.P. (2000) *Biochem Soc Trans*, **28**, 410-414.

Wang, A.H., Bertos, N.R., Vezmar, M., Pelletier, N., Crosato, M., Heng, H.H., Th'ng, J., Han, J. und Yang, X.J. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7816-7827.

Wang, A.H., Kruhlak, M.J., Wu, J., Bertos, N.R., Vezmar, M., Posner, B.I., Bazett-Jones, D.P. und Yang, X.J. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6904-6912.

Wen, Y.D., Perissi, V., Staszewski, L.M., Yang, W.M., Kronen, A., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. und Seto, E. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7202-7207.

White, D.A., Belyaev, N.D. und Turner, B.M. (1999) *Methods*, **19**, 417-424.

Wolffe, A.P., Almouzni, G., Ura, K., Pruss, D. und Hayes, J.J. (1993) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **58**, 225-235.

Wolffe, A.P. (1998a) *Chromatin : structure and function*, Academic Press, San Diego.

Wolffe, A.P. (1998b) *Post-translational modification of core histones*, Academic Press, San Diego.

Wolffe, A.P. und Hayes, J.J. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 711-720.

Wolffe, A.P., Urnov, F.D. und Guschin, D. (2000) *Biochem Soc Trans*, **28**, 379-386.

Workman, J.L. und Kingston, R.E. (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 545-579.

Wu, C. (1980) *Nature*, **286**, 854-860.

Wu, C. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 28171-28174.

Wu, J. und Grunstein, M. (2000) *Trends Biochem Sci*, **25**, 619-623.

Wu, J., Suka, N., Carlson, M. und Grunstein, M. (2001) *Mol Cell*, **7**, 117-126.

Xu, L., Lavinsky, R.M., Dasen, J.S., Flynn, S.E., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Heinzl, T., Szeto, D., Korzus, E., Kurokawa, R., Aggarwal, A.K., Rose, D.W., Glass, C.K. und Rosenfeld, M.G. (1998) *Nature*, **395**, 301-306.

Xu, L., Glass, C.K. und Rosenfeld, M.G. (1999) *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 140-147.

- Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Côté, J. und Wang, W. (1998) *Mol. Cell*, **2**, 851-861.
- Yang, W.M., Inouye, C., Zeng, Y., Bearss, D. und Seto, E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12845-12850.
- Yang, W.M., Yao, Y.L., Sun, J.M., Davie, J.R. und Seto, E. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 28001-28007.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. und Beppu, T. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 17174-17179.
- Yoshida, M., Horinouchi, S. und Beppu, T. (1995) *BioEssays*, **17**, 423-430.
- Yoshida, M. und Horinouchi, S. (1999) *Ann. NY Acad. Sci.*, **886**, 23-36.
- Zhang, W., Bone, J.R., Edmondson, D.G., Turner, B.M. und Roth, S.Y. (1998a) *Embo J*, **17**, 3155-3167.
- Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Reinberg, D. (1997) *Cell*, **89**, 357-364.
- Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.P., Lane, W.S. und Reinberg, D. (1998b) *Cell*, **95**, 279-289.
- Zhang, Y., Sun, Z.W., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hampsey, M. und Reinberg, D. (1998c) *Mol. Cell*, **1**, 1021-1031.
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. und Reinberg, D. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 1924-1935.
- Zhou, X., Richon, V.M., Rifkind, R.A. und Marks, P.A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1056-1061.

Zlatanova, J., Leuba, S.H. und van Holde, K. (1999) *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **9**, 245-255.

### **Meine akademischen Lehrer waren:**

Physiologische Chemie	E.O. Bayer, H. Bisswanger, P. Bohley, K. Eisele, K.-U. Fröhlich, R. Gebhardt, B. Hamprecht, A. Kapurniotu, D. Mecke, H. Probst, W. Voelter, U. Weber, U. Weser, H. Wiesinger
Organische Chemie	E. Bayer, H. Hagenmaier, M. Hanack, H. Stegmann, W. Voelter
Pharmakologie und Toxikologie	K.W. Bock, U. Breyer-Pfaff, M. Schwarz
Anorganische Chemie	D. Krug, E. Lindner, J. Strähle
Physikalische Chemie	G. Gauglitz, D. Oelkrug, V. Hoffmann, H. Oberhammer
Physikalische Biochemie	A. Kapurniotu, W. Voelter
Physik	G. Staudt, P. Grabmayr, G.J. Wagner
Anatomie	K. Reutter
Zoologie	H. Günzl, W. Pfeiffer
Mikrobiologie	V. Braun, H. Zähler
Genetik	W. Büsen, C. Pelling, R.A. Rupp, F. Schöffl,
Pflanzenphysiologie	H. Metzner, H. Ninnemann
Histologie	K. Reutter
Physiologie	G.Kissling
Mathematik	H. Pommer
Strahlenschutzkunde	H.-J. Reinecke, W. Sarrazin

## LEBENS LAUF

- Name:** Wolfgang Fischle  
**Nationalität:** Deutsch  
**Geburtsdatum:** 9. Juni 1970  
**Geburtsort:** Esslingen a.N.  
**Familienstand:** verheiratet  
**Ausbildung:** 1976-1981 Grund- und Hauptschule Wäldenbronn  
1981-1990 Georgii-Gymnasium, Esslingen  
**19.5.1990 Abitur**  
1990-1991 Zivildienst, Städtische Krankenanstalten Esslingen  
**1991-1996 Diplomstudium der Biochemie,**  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
1991-1994 Biochemievorstudium, Vordiplom Teil I und II  
**19.4.1994 Vordiplom der Biochemie**  
1994-1996 Biochemiehauptstudium,  
**Diplomprüfungen** in Biochemie, organischer Chemie  
sowie Pharmakologie und Toxikologie  
1996 **Diplomarbeit** mit dem Thema “*In vivo* Studien zur  
Identifikation von Bindungspartnern des *Xenopus*  $\beta$ -  
Catenin Proteins” unter Anleitung von Dr. Ralph Rupp  
und Prof. Dr. Peter Overath am Friedrich-Miescher-  
Laboratorium der Max Planck Gesellschaft in Tübingen  
**4.11.1996 Diplom der Biochemie**  
1995 wissenschaftliche Hilfskraft, Max Planck Institut für  
Entwicklungsbiologie, Betreuung, Dr. Uwe Drescher,  
Prof. Dr. Dieter Bonhoefer  
1995-1996 wissenschaftliche Hilfskraft, Abteilung für Physika-  
lische Biochemie des Physiologisch-chemischen  
Instituts der Eberhard-Karls-Universität Tübingen,  
Betreuung Dr. Aphrodite Kapurniotu, Prof. Dr. Dr. hc.  
Wolfgang Voelter  
1994, 1995 Auslandsaufenthalte am Picower Institute for Medical  
Research, Manhasset, USA, Betreuung Dr. Christine  
Metz, Dr. Jürgen Bernhagen, Prof. Dr. Eric Verdin  
seit 1997 Doktorarbeit mit dem Thema “Histon-Desacetylasen  
der Klasse II: Entdeckung, Klonierung und funktionelle  
Charakterisierung der enzymatischen Aktivität einer  
neuen Gruppe humaner HDACs” unter Anleitung von  
Prof. Dr. Dr. hc. Wolfgang Voelter in der Abteilung für  
Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen  
Instituts der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Stipendien** 1997-2000 Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds (Stuttgart)