Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Medizinische Klinik III
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Hoelzer
Frankfurt am Main

Charakterisierung der Interaktion der humanen Histon-Deacetylase 3 mit der MAP Kinase 11

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. oec. troph.
im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von

Dipl. oec. troph. Jutta Will

aus Limburg/Lahn

Frankfurt am Main, Juni 2004

Dissertation am Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. W. Köhler
1. Gutachter: Prof. Dr. D. Hoelzer
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Weigand
Prüfer: Prof. Dr. C. Kunz
Prüfer: Prof. Dr. S. Schubert

Inhaltsübersicht.....I
Inhaltsverzeichnis.....III
Abbildungsverzeichnis.....X
Tabellenverzeichnis.....XII
Abkürzungsverzeichnis.....XIII

1 Einleitung 1
1.1 Aufbau von Chromatin 1
1.2 Posttranslationale Modifikationen von Histonproteinen 2
1.3 Enzymatische Beeinflussung des Histon-Acetylierungsstatus durch Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen 3
1.4 Einfluss des Histon-Acetylierungsstatus auf die Transkriptionsrate 6
1.5 Der „Epigenetische Code“ 7
1.6 Histon-Deacetylasen als Teil von Multiproteinkomplexen 8
1.7 Veränderungen in der Chromatinstruktur durch „Chromatin-Remodeling“ 10
1.8 Veränderungen in der Chromatinstruktur als Ursache für maligne Erkrankungen 11
1.9 HDAC-Inhibitoren 15
1.10 Die humane Histon-Deacetylase 3 (HDAC3) 23
1.11 Potenzielle Bindungspartner der Histon-Deacetylase 3 26
1.12 Ziel der Arbeit 33
2 Material und Methoden 34
2.1 Material 34
2.2 Methoden 48
3 Ergebnisse 77
3.1 Identifizierung von HDAC3-Interaktionspartnern 77
3.2 Untersuchungen zur Interaktion von p38 beta 2 MAP Kinase (MAPK11) und HDAC3 77
3.3 Untersuchungen zum Signaltransduktionsweg der MAPK11 mit der PathDetect-Methode 87
3.4 Verminderung der HDAC3-Proteinmenge nach Transfektion von HDAC3-siRNA in U937- und COS-7-Zellen 93

3.5 Einfluss von HDAC3 auf den Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine 94
3.6 Hemmung der LPS-induzierten TNF alpha-Expression durch HDAC3 101
3.7 Bestimmung der TNF alpha-Expression durch Real-Time-PCR 103
3.8 Interaktion von HDAC3 mit der p38 MAP Kinase delta (MAPK13) 108
3.9 Interaktion von HDAC3 mit den Proteinen Rab3a und SCG-10 109
3.10 Aufreinigung von rekombinantem HDAC3 aus SF-9-Insektenzellen . 112
4 Diskussion 115
4.1 Identifizierung von HDAC3-Interaktionspartnern 116
4.2 Aufreinigung von HDAC3 aus SF9-Insektenzellen 130
4.3 Die Art der Modifizierung von Histonen entscheidet über die Genexpression 132
4.4 Einfluss von HDACs bei verschiedenen Krankheiten 139
4.5 Klinischer Einsatz von HDAC-Inhibitoren 140
4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick 143
5 Zusammenfassung 145
6 Literatur 147
7 Anhang 167

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Aufbau von Chromatin 1
1.2 Posttranslationale Modifikationen von Histonproteinen 2
1.3 Enzymatische Beeinflussung des Histon-Acetylierungsstatus durch Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen 3
1.3.1 Histon-Acetyltransferasen 3
1.3.2 Histon-Deacetylasen 4
1.3.3 Histon-Deacetylasen anderer Spezies 5
1.4 Einfluss des Histon-Acetylierungsstatus auf die Transkriptionsrate 6
1.5 Der „Epigenetische Code“ 7
1.6 Histon-Deacetylasen als Teil von Multiproteinkomplexen 8
1.7 Veränderungen in der Chromatinstruktur durch „Chromatin-Remodeling“ 10
1.8 Veränderungen in der Chromatinstruktur als Ursache für maligne Erkrankungen 11
1.8.1 Die Bedeutung von Histon-Acetyltransferasen bei der Entstehung maligner Krankheiten 12
1.8.2 Die Bedeutung von Histon-Deacetylasen bei der Entstehung maligner Krankheiten 14
1.9 HDAC-Inhibitoren 15
1.9.1 Hemmung der enzymatischen Aktivität von Histon-Deacetylasen 15
1.9.2 Erste Studien mit HDAC-Inhibitoren in der Zellkultur 17
1.9.3 Übersicht über verschiedene HDAC-Inhibitoren 18
1.9.3.1 Trichostatin A 18
1.9.3.2 SAHA 19
1.9.3.3 Trapoxin B 19
1.9.3.4 FK228 19
1.9.3.5 Butyrat 20
1.9.4 Der klinische Einsatz von HDAC-Inhibitoren 20
1.9.5 Einsatz von HDAC-Inhibitoren in Tierversuchen 22
1.10 Die humane Histon-Deacetylase 3 (HDAC3) 23

1.11 Potenzielle Bindungspartner der Histon-Deacetylase 3 26
1.11.1 Die Familie der MAP Kinasen 26
1.11.1.1 Der p38 MAP Kinase-Signaltransduktionsweg 26
1.11.1.2 Die Funktion von MAP Kinasen bei der Histon-Phosphorylierung 29
1.11.2 Rab3a als potenzieller Bindungspartner von HDAC3 30
1.11.3 SCG-10 als potenzieller Bindungspartner von HDAC3 31
1.12 Ziel der Arbeit 33
2 Material und Methoden 34
2.1 Material 34
2.1.1 Zellen 34
2.1.1.1 Eukaryotische Zellen 34
2.1.1.2 Bakterienstämme 34
2.1.2 Vektoren und Plasmide 35
2.1.3 Oligonukleotide 36
2.1.4 Antikörper 36
2.1.5 Kulturlösungen 37
2.1.5.1 Lösungen der Zellkultur 37
2.1.5.2 Medien für die Zellkultur 37
2.1.5.3 Medien für Bakterien 37
2.1.6 Standardlösungen (Lösungen der Molekularbiologie und Proteinbiochemie) 38
2.1.6.1 Agarosegelelektrophorese 38
2.1.6.2 Far Western-Methode 38
2.1.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 38
2.1.6.4 Western Blotting 39
2.1.6.5 Puffer für die Proteinaufreinigung aus SF-9-Zellen 40
2.1.6.6 Puffer für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen 40
2.1.6.7 Puffer für die Herstellung von Zellextrakten aus COS-7-, U937- und THP-1-Zellen 40
2.1.6.8 Puffer für die Immunpräzipitation 40
2.1.7 Puffer für die Virus-DNA-Isolierung aus DH10bac-Zellen 41
2.1.8 Transfektionslösungen 41
2.1.8.1 DEAE 41

2.1.8.2 STBS 41
2.1.8.3 Puffer für die Elektroporation eukaryoter Zellen 41
2.1.9 Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien 42
2.1.9.1 TFB-1 42
2.1.9.2 TFB-2 42
2.1.10 Puffer für den Kinase Assay (Calbiochem) 42
2.1.10.1 Kinase Assay-Puffer, 5x konzentriert 42
2.1.10.2 Stop-, Avidin- und Waschlösung 42
2.1.11 Enzyme 42
2.1.12 Chemikalien 42
2.1.13 Verbrauchsmaterialien 44
2.1.14 Radiochemikalien 45
2.1.15 Molekularbiologische Reagenzien 45
2.1.16 Geräte 46
2.1.17 Computerprogramme 47
2.2 Methoden 48
2.2.1 Restriktionsverdau 48
2.2.2 Ligation 48
2.2.3 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen 49
2.2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien 49
2.2.3.2 Transformation mit Plasmid-DNA 50
2.2.3.3 Anlegen einer Übernachtkultur 50
2.2.3.4 Sterile Glycerollösung für die Lagerung vom Dauerkulturen 50
2.2.3.5 Glyceroldauerkultur für Bakterien-Stammkulturen 50
2.2.3.6 Herstellung von Plasmid-DNA 51
2.2.3.7 Virus-DNA-Isolierung 52
2.2.4 Aufreinigung von DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 53
2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA 54
2.2.6 Auftrennung von DNA auf einem Agarosegel 54
2.2.7 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel (Gelextraktion) 54
2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion sowie Aufreinigung der Reaktionsprodukte 55
2.2.8.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 55
2.2.8.2 Aufreinigung des PCR-Produktes mit dem PCR-Purification-Kit .. 57

2.2.9 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese sowie Real-Time-PCR 57
2.2.9.1 RNA-Isolierung 57
2.2.9.2 cDNA-Synthese 58
2.2.9.3 Real-Time-PCR 59
2.2.10 Mutagenese-PCR 60
2.2.11 *In vitro* Transkription/Translation 60
2.2.12 Pulldown 61
2.2.13 Sequenzierungs-PCR, Aufreinigung der Reaktionsprodukte und anschließende Sequenzierung 62
2.2.13.1 Sequenzierungs-PCR 62
2.2.13.2 Aufreinigung der Seqenzierungs-PCR Reaktionsprodukte 62
2.2.13.3 Sequenzierung 63
2.2.14 Kinase Assay (radioaktiv) 63
2.2.15 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen 64
2.2.15.1 Kultivierung der Zellen 64
2.2.15.2 Kryokonservierung/Kryokultivierung 64
2.2.15.3 Inkubation von U937-Zellen mit GM-CSF bzw. LPS 65
2.2.15.4 Transfektion nach der Elektroporationsmethode 65
2.2.15.5 Transfektion nach der DEAE-Dextran-Methode 66
2.2.15.6 Mammalian Two Hybrid System 66
2.2.15.7 Luciferase-Assay 67
2.2.15.8 Transfektion des HDAC3-siRNA/siAB™ Assay Kits 68
2.2.15.9 Transfektion von SF-9-Zellen 68
2.2.15.10 Immunpräzipitation 69
2.2.16 Expression rekombinanter Proteine 70
2.2.16.1 Proteinisolierung aus prokaryotischen Zellen 70
2.2.16.2 Proteinisolierung aus eukaryotischen Zellen 70
2.2.17 Biochemische und immunologische Methoden 74
2.2.17.1 Quantifizierung von Proteinen 74
2.2.17.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 74
2.2.17.3 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen 74
2.2.17.4 Western Blot 75
2.2.17.5 Far Western-Methode 76

3 Ergebnisse 77
3.1 Identifizierung von HDAC3-Interaktionspartnern 77
3.2 Untersuchungen zur Interaktion von p38 beta 2 MAP Kinase (MAPK11) und HDAC3 77
3.2.1 Nachweis der Bindung zwischen der MAPK11 und HDAC3 mittels Far Western-Methode 77
3.2.2 Untersuchung der Bindung von HDAC3 und MAPK11 durch Pulldown-Experimente 78
3.2.3 Untersuchungen zur Interaktionsdomäne im HDAC3-Protein anhand von Mutationsstudien 80
3.2.4 Nachweis der Interaktion von MAP Kinase 11 und HDAC3 *in vivo* mittels Immunpräzipitation 82
3.2.5 Untersuchung der Interaktion von HDAC3 und MAPK11 *in vivo* mit dem Mammalian Two Hybrid-Assay 84
3.2.6 Messung der Firefly Luciferaseexpression in COS-7-Zellen nach Transfektion mit Plasmiden des Mammalian Two Hybrid Systems 85
3.3 Untersuchungen zum Signaltransduktionsweg der MAPK11 mit der PathDetect-Methode 87
3.3.1 Messung der Firefly Luciferaseexpression in COS-7-Zellen nach Transfektion mit Plasmiden des PathDetect-Systems 88
3.3.2 Messung der Firefly Luciferaseexpression in COS-7-Zellen nach Transfektion einer HDAC3-spezifischen siRNA im PathDetect-System 90
3.3.3 Einfluss der HDAC3-Deacetylasedomäne auf die Luciferaseexpression im PathDetect-Experiment 92
3.4 Verminderung der HDAC3-Proteinmenge nach Transfektion von HDAC3-siRNA in U937- und COS-7-Zellen 93
3.5 Einfluss von HDAC3 auf den Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine 94
3.5.1 Messung des Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase 11 *in vitro* mittels Kinase Assay 94
3.5.2 Verminderung des MAP Kinase-Phosphorylierungsstatus *in vivo* durch HDAC3 96

3.5.3 Verminderung des Phosphorylierungsstatus von ATF-2 *in vivo* durch HDAC3 97
3.5.4 Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase in Patientenzellen nach Behandlung mit LPS 99
3.6 Hemmung der LPS-induzierten TNF alpha-Expression durch HDAC3 101
3.7 Bestimmung der TNF alpha-Expression durch Real-Time-PCR 103
3.7.1 Einfluss von HDAC3 auf die Expression von TNF alpha in THP-1-Zellen 103
3.7.2 Einfluss von TSA auf die TNF alpha-Expression in THP-1-Zellen 104
3.7.3 Messung der Expression von TNF alpha in AML-Patientenzellen 106
3.8 Interaktion von HDAC3 mit der p38 MAP Kinase delta (MAPK13) 108
3.9 Interaktion von HDAC3 mit den Proteinen Rab3a und SCG-10 109
3.9.1 Rab3a, ein Mitglied der *ras*-Gen-Superfamilie, als potenzieller HDAC3-Bindungspartner 109
3.9.2 Nachweis der Bindung von HDAC3 an Rab3a mittels Pulldown-Analyse 109
3.9.3 Das neuronale Protein SCG-10 als potenzieller Bindungspartner von HDAC3 110
3.9.4 Nachweis der Bindung von HDAC3 an SCG-10 mittels Pulldown-Analyse 111
3.10 Aufreinigung von rekombinantem HDAC3 aus SF-9-Insektenzellen . 112
4 Diskussion 115
4.1 Identifizierung von HDAC3-Interaktionspartnern 116
4.1.1 Untersuchungen zur Interaktion von MAPK11 mit HDAC3 116
4.1.2 Interaktion von HDAC3 und Rab3a 126
4.1.3 Interaktion von HDAC3 mit dem neuronalen Protein SCG-10 128
4.2 Aufreinigung von HDAC3 aus SF9-Insektenzellen 130
4.3 Die Art der Modifizierung von Histonen entscheidet über die Genexpression 132
4.3.1 Der Einfluss der Histon-(De-)Acetylierung auf die Genexpression 132
4.3.2 Die Funktion der Histon-Methylierung bei der Genexpression 133
4.3.3 Die Rolle der Phosphorylierung bei der Genexpression 135

4.4 Einfluss von HDACs bei verschiedenen Krankheiten 139
4.5 Klinischer Einsatz von HDAC-Inhibitoren 140
4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick 143
5 Zusammenfassung 145
6 Literatur 147
7 Anhang 167

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Nukleosoms 1
Abbildung 2: Die Gleichgewichtsreaktion der Histon-(De-)Acetylierung 6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des propagierten „Histon-Code“ 8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von HDAC-Inhibitoren 17
Abbildung 5: Übersicht über die Signaltransduktionswege der verschiedenen Kinasen 28
Abbildung 6: Übersicht über die pro- und eukaryotische Proteinaufreinigung. 73
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Western Blot-Aufbaus..... 75
Abbildung 8: Nachweis der Bindung von HDAC3 an die MAPK11 mit der Far Western-Methode 78
Abbildung 9: Pulldown-Experiment mit dem Nachweis der Bindung von radioaktiver MAPK11 an das HDAC3-Protein..... 79
Abbildung 10: Übersicht über die Pulldown-Experimente mit radioaktiv markiertem MAPK11-Protein und verschiedenen Mutationen bzw. Trunkationen des GST-HDAC3-Proteins 81
Abbildung 11: Nachweis der Bindung von MAPK11 und HDAC3 durch Immunpräzipitation 83
Abbildung 12: Schematische Darstellung der im Mammalian Two Hybrid-Assay verwendeten Plasmide 85
Abbildung 13: Auswertung eines Mammalian Two Hybrid-Luciferase-Assays 86
Abbildung 14: Schematische Darstellung der für die PathDetect-Analyse verwendeten Plasmide 87
Abbildung 15: Auswertung eines PathDetect-Luciferase Assays 89
Abbildung 16: Auswertung eines PathDetect-Luciferase-Assays nach Transfektion von siRNA und HDAC3-siRNA 91
Abbildung 17: Darstellung eines Luciferase-Assays: Der Einfluss von HDAC3 ohne Deacetylasedomäne auf die Luciferaseexpression wird gezeigt 92
Abbildung 18: Die HDAC3-Proteinmenge in U937- und COS-7-Zellen wird durch Transfektion einer HDAC3-siRNA verringert 93
Abbildung 19: Auswertung eines radioaktiven Kinase Assays..... 95
Abbildung 20: Darstellung des relativen Phosphorylierungsstatus von LPS-

stimulierten U937-Zellen mittels Computerprogramm „TotalLab“ (oben) sowie Western Blot derselben U937-Lysate nach Inkubation mit dem anti-phospho-MAPK11-Antikörper (unten)..... 97
Abbildung 21: Phosphorylierungsstatus von ATF-2 in LPS-stimulierten U937-Zelllysaten nach Transfektion von Leervektor oder HDAC3 98
Abbildung 22: Übersicht über den Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase in Makrophagen eines Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie 100
Abbildung 23: Western Blot-Analyse der Tubulinexpression in Lysaten aus LPS-stimulierten Makrophagen eines AML-Patienten 101
Abbildung 24: Darstellung eines Luciferase-Assays, bei dem die HDAC3-vermittelte Hemmung der LPS-stimulierten TNF alpha-Expression durch die Inhibition von HDAC3 aufgehoben wird 102
Abbildung 25: Darstellung einer Real-Time-PCR mit THP-1-Zellen – Untersuchungen zum Einfluss von LPS, SB202190 und HDAC3 auf die TNF alpha-Expression..... 104
Abbildung 26: Auswertung einer Real-Time-PCR mit THP-1-Zellen – Untersuchungen zum Einfluss von HDAC3 und TSA auf die TNF alpha-Expression..... 105
Abbildung 27: Untersuchung der TNF alpha-Expression in Makrophagen eines AML-Patienten mittels Real-Time-PCR nach Behandlung mit verschiedenen Reagenzien 107
Abbildung 28: Darstellung radioaktiver Pulldown-Assays mit *in vitro* translatierter p38 MAP Kinase delta sowie p38 MAP Kinase gamma 108
Abbildung 29: Pulldown-Experiment von *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem Rab3a mit prokaryotisch aufgereinigtem GST- sowie GST-HDAC3-Protein .. 110
Abbildung 30: Pulldown-Experiment von *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem SCG-10-Protein mit prokaryotisch aufgereinigtem GST- sowie GST-HDAC3-Protein 111
Abbildung 31: Western Blot-Analyse mit aufgereinigtem HDAC3-Protein aus SF-9-Insektenzellen..... 113
Abbildung 32: Nachweis der Aufreinigung von HDAC3-Protein aus infizierten SF-9-Zellen..... 114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der Histon-Acetyltransferasen-Familien 4
Tabelle 2: Übersicht über bereits identifizierte Histon-Deacetylasen 5
Tabelle 3: Histon-Deacetylasen liegen in der Zelle in verschiedenen Protein- und Korepressorkomplexen vor 9
Tabelle 4: Übersicht über die verschiedenen Substanzklassen der HDAC-Inhibitoren 16
Tabelle 5: Übersicht über die Inkubationsbedingungen der zur Untersuchung der TNF alpha-Expression verwendeten Makrophagen eines AML-Patienten 106
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide. 167
Tabelle 7: Adressen der Pharmafirmen 169

Abkürzungsverzeichnis

α-HDAC3	Anti-HDAC3-Antikörper
α-MAPK11	Anti-MAP Kinase 11-Antikörper
λ = 260 nm	Wellenlänge 260 nm
µ	Mikro
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
AML	Akute Myeloische Leukämie
AP-1	activating protein-1
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATF-2	aktivierender Transkriptionsfaktor 2 (activating transcription factor 2); gehört zur CREB-Familie (Abk. für “cAMP response element binding protein”)
ATP	Adenosintriphosphat
AZA	5-Aza-2'-Deoxycytidin
BMK	Big MAP Kinase-1
bp	Basenpaare
BRCA-1	Brustkrebsprotein-1 (breast cancer protein 1)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-Bindungsprotein (CREB-binding protein)
cdk	cyklin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	Zählungen pro Minute (counts per minute)
CREB	cAMP response element binding protein
CTP	Cytidintriphosphat
DAD	Deacetylase-Aktivierungsdomäne
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DBD	DNA-Bindungsdomäne

dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (Dulbecco's modified eagle medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTPs	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
ECL®	Verstärkendes Chemilumineszenzsystem (enhanced chemiluminescence system)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Östrogenrezeptor
ERK	durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase (extracellular regulated kinase)
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
GATA-2	GATA-binding protein 2
Gcn5	general control of amino acid synthesis
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierungsfaktor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H3/H4	Histon H3/H4
HAT	Histon-Acetyltransferase
HCl	Salzsäure
HDA1	histone deacetylase 1
HDAC	Histon-Deacetylase
HID	Histon-Interaktionsdomäne

HSF2	Hitzeschockfaktor 2 (heat shock factor 2)
IL1β	Interleukin 1 beta
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktopyranosid
JUNK/SAPK	c-Jun-N-terminale Kinase/durch Stress aktivierte Proteinkinase (c-jun-NH_2-terminal kinase/stress activated protein kinase)
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase (mitogen activated protein kinase)
MAPK11	Isoform der p38 MAP Kinase = p38 beta 2 MAP Kinase
MAPKAPK2	MAP Kinase activated protein kinase 2
MeCP2	Methyl CpG-Bindungsprotein
MEF2	Muskelzelle verstärkender Faktor 2 (myocyte enhancer factor 2)
MEK	MAPK Kinase
MEL	murine Erythroleukämie
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
MKK	MAP Kinase Kinase
ml	Milliliter
mM	millimolar
$MnCl_2$	Manganchlorid
MOPS	3-[Morpholino]propansulfonsäure
Na_2HPO4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge

NCBI	National Center for Biotechnology Information
N-CoR	Kernrezeptor-Korepressor (nuclear receptor corepressor)
NES	Nukleäres Export-Signal
NFκB	Zellkernfaktor κB (nuclear factor kappa B)
ng	Nanogramm
Nickel-NTA	Nickel-nitrilo triacetic acid
NP-40	4-Nonylphenolpolyethylenglykol
NuRD	nucleosome remodeling and histone deacetylase
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)
PCAF	p300/CBP associated factor
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKA	Proteinkinase A
pmol	Picomol
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Rab	Rattengehirn (Rat brain)
Rab3a-GAP	Rab3a GTPase-aktivierendes Protein (Rab3a GTPase activating protein)
Rab3a-GEP	Rab3a GDP/GTP-austauschendes Protein (Rab3a GDP/GTP exchange protein)
RARE	Retinsäure-response-Element
RARα	Retinsäurerezeptor α
RB	Retinoblastom
RbCl	Rubidiumchlorid
REST	RE1-silencing transcription factor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPD3	reduced potassium dependency
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
RZPD	Referenz-Zentrum des Deutschen Humangenomprojekts

SAHA	Suberoylanilid-Hydroxamsäure (suberoylanilide hydroxamic acid)
SCG-10	superior cervical ganglion-10 bzw. superior cervical ganglia, neural specific 10
SDS	Natriumdodekylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde
Sin3a	switch independent 3a
SIR2	silencing information regulator 2
siRNA	small interfering RNA
SMRT	silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors
SRF	serum response factor
SWI2/SNF2	switching/sucrose non-fermenting
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	*Thermus aquaticus*
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (tris buffered saline)
TNF alpha	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRD	Transkriptionelle Repressionsdomäne
Tris	Tri(hydroxymethyl)methylamin
Triton® X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether)$_X$
TSA	Trichostatin A
TSR	Template Suppression Reagent
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Aufbau von Chromatin

DNA liegt im Zellkern von eukaryotischen Zellen in Form von Chromatin vor. Die Grundeinheit des Chromatins, das Nukleosom, besteht aus 146 Basenpaaren DNA, die in einer Spiraltour um ein Histonoktamer gewunden sind. Das Histonoktamer wird aus einem $(H3)_2(H4)_2$-Tetramer sowie zwei H2A-H2B-Dimeren gebildet. Histone sind aufgrund ihrer zahlreichen Lysinreste basische Proteine. Dabei „haftet“ die negativ geladene DNA infolge der elektrostatischen Wechselwirkungen an den positiv geladenen Histonproteinen. Die Histonreste sind in der Evolution hoch konserviert (Forsberg and Bresnick, 2001; Grunstein, 1997; Hassig and Schreiber, 1997; Kornberg and Lorch, 1999). Die ε-aminoterminalen Lysinreste der Histone treten im Nukleosom nach „außen“ hervor und sind so für verschiedenste Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung und Ubiquitinylierung gut zugänglich. Dadurch ist der Ladungszustand eines Nukleosoms sehr variabel (Luo and Dean, 1999; Turner, 2000; Wolffe and Hayes, 1999). Abb. 1 zeigt schematisch die Windung der DNA um die basischen Histonproteine (in Anlehnung an Mahlknecht (2003)).

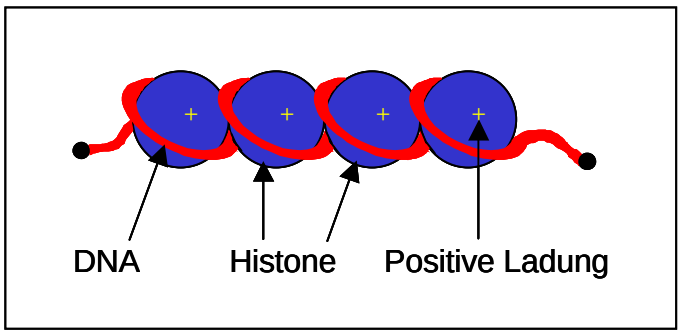


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Nukleosoms

Die DNA windet sich in einer Spiraltour um die Histonproteine. Dabei „haftet“ die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung an den durch die Lysinreste positiv geladenen Histonen.

Das erste „Modell“ über den Aufbau von Chromatin wurde 1974 von Kornberg veröffentlicht (Kornberg, 1974). Jenes besagte, dass Chromatin aus sich wiederholenden Einheiten von acht Histonmolekülen und etwa 200 Basenpaaren DNA besteht. Die Richtigkeit dieses Modells wurde mit der Aufklärung der Kristallstruktur bestätigt (Arents et al., 1991; Luger et al., 1997). Vier Histone bilden zusammen mit der DNA den sog. Kernpartikel („core particle“) des Nukleosoms. Mit Hilfe von kristallografischen Methoden wurde festgestellt, dass die Histonproteine H3 und H4 als $(H3)_2(H4)_2$-Tetramer im Zentrum angeordnet sind. Die beiden H2A-H2B-Dimere liegen vorwiegend randständig vor. Jedes Histon besitzt eine ähnliche Peptidketten-Sekundärstruktur, was als Histonfaltung („histone fold“) bezeichnet wird. Dabei bilden die Histone eine zentrale α-Helix-Kette, die von weiteren Helices sowie Windungen der Peptidkette umschlossen wird, wobei die gewundenen Helices mit DNA interagieren (Arents and Moudrianakis, 1995; Kornberg and Lorch, 1999).

1.2 Posttranslationale Modifikationen von Histonproteinen

Die Histone haben aufgrund möglicher posttranslationaler Modifizierungen eine wichtige Bedeutung für den (Ladungs-)Zustand eines Nukleosoms. Neben Acetylierung und Deacetylierung sind auch Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitinylierung möglich (Cheung et al., 2000; Dobosy and Selker, 2001). Die Phosphorylierung findet im Histon H3 am $Serin^{10}$ statt und führt zur Expression von früh-induzierbaren Genen („early response genes“) (Cheung et al., 2000; Thomson et al., 1999b). Die carboxyterminale Domäne der Histone H2A und H2B wird dagegen ubiquitinyliert (Davie, 1997), während acetyliertes H3 bevorzugt methyliert wird (Annunziato et al., 1995; Davie, 1995). Dass Lysinreste acetyliert und methyliert werden können, wurde bereits im Jahre 1964 durch Allfrey und Kollegen beobachtet. Außerdem wurde damals festgestellt, dass Histone nicht nur die RNA-Synthese hemmen können, sondern auch, dass lysinreiche Histone häufig acetyliert sind (Allfrey et al., 1964). Wie dieses Gleichgewicht der Acetylierung aufrechterhalten wird, wurde erst viel später, in den 90er-Jahren, durch die Entdeckung der dafür verantwortlichen Enzyme, erklärbar. Die Acetylierung der Histone beeinflusst deren Ladung und Funktion. Dadurch wird auch die Verfügbarkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren verändert (Grunstein, 1997).

1.3 Enzymatische Beeinflussung des Histon-Acetylierungsstatus durch Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen

Die Aufrechterhaltung des Acetylierungsgleichgewichts der Histone wird von zwei Enzymgruppen katalysiert. Eine Enyzmgruppe ist dafür verantwortlich, dass an definierten Proteinen (insbesondere Histonproteinen) positiv geladene Aminogruppen durch ladungsneutrale Acetylreste ersetzt werden. Diese Enzyme heißen nach ihrer Funktion „Histon-Acetyltransferasen“ (HATs). Dagegen steuern „Histon-Deacetylasen“ (HDACs) die gegenteilige Reaktion. Die erste identifizierte Histon-Acetyltransferase war der Transkriptionsaktivator GCN5 (Brownell et al., 1996). Die zuerst entdeckte humane Histon-Deacetylase wurde HDAC1 genannt (Taunton et al., 1996). Inzwischen wurden eine ganze Reihe Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen kloniert und charakterisiert (Frye, 2000; Gasser and Cockell, 2001; Gray and Ekstrom, 2001; Johnstone, 2002; Kao et al., 2002; Zhou et al., 2001).

1.3.1 Histon-Acetyltransferasen

Histon-Acetyltransferasen werden in verschiedene Subfamilien eingeteilt und fungieren meist als transkriptionelle Aktivatoren (Johnstone, 2002). Im Menschen wurden u.a. zwei Homologe zum Hefeprotein Gcn5p gefunden, die hGcn5 sowie PCAF (p300/CBP associated factor) genannt wurden. Beide besitzen eine dem Hefeprotein vergleichbare HAT-Aktivität (Yang et al., 1996b). Es werden außerdem zytosolische HATs vom Typ B und nukleäre HATs vom Typ A unterschieden (Brownell and Allis, 1996; Hassig and Schreiber, 1997; Roth and Allis, 1996). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die bisher identifizierten Histon-Acetyltransferasen. Die Tabelle wurde in Anlehnung an Johnstone (2002) erstellt.

Tabelle 1: Darstellung der Histon-Acetyltransferasen-Familien

Abkürzungen: ACTR = activator of retinoid receptors; CBP = CREB binding protein; Gcn5 = general control of amino acid synthesis; GNAT = Gcn5 related N-acetyltransferase; HAT1 = histone deposition and telomeric silencing 1; HBO1 = histone acetyltransferase binding to origin-recognition complex; MORF = monocytic leukemia zinc finger protein related factor; MOZ = monocytic leukemia zinc finger; PCAF = p300/CBP associated factor; SRC1 = steroid receptor coactivator; TAFII250 = Tata box binding protein associated factor; TIP60 = HIV-1 Tat interactive protein, 60 kDa; TIF2 = transcriptional intermediary factor

Familie der HATs	**Mitglieder**
GNAT-Familie	HAT1, GCN5, PCAF
p300/CBP	p300/CBP
MYST-Familie	MOZ, MORF, HBO1, TIP60
Nukleäre Rezeptor-Koaktivatoren	SRC1, ACTR, TIF2, TAFII250

1.3.2 Histon-Deacetylasen

Die Einteilung der identifizierten humanen Histon-Deacetylasen erfolgt dagegen in Abhängigkeit ihrer Homologie zu Hefeproteinen. HDACs der Klasse I besitzen große Ähnlichkeit zum Hefeprotein RPD3. Zu dieser Gruppe gehören die humanen HDACs 1, 2, 3 und 8. Histon-Deacetylasen dieser Klasse werden in vielen Geweben wie z.B. Herz, Leber und Skelettmuskel sowie in Zellkulturen vorwiegend im Zellkern exprimiert (Buggy et al., 2000; Dangond et al., 1998; Emiliani et al., 1998; Hu et al., 2000). Die Klasse II-HDACs werden von HDACs 4, 5, 6, 7, 9 und 10 repräsentiert. Sie sind homolog zum Hefeprotein HDA1 (Kao et al., 2002; Marks et al., 2001a), werden gewebespezifisch exprimiert und können zwischen Zellkern und Zytoplasma „wandern“. Diese Gruppe bindet an Hormonrezeptoren und Transkriptionsfaktoren wie MEF2 (myocyte enhancer factor 2) (Fischle et al., 2001b). Die Familie der MEF2 Transkriptionsfaktoren reguliert die Expression von muskelspezifischen Genen in der glatten und in der Skelettmuskulatur (Sparrow et al., 1999; Wang et al., 1999). HDAC4 und HDAC5 werden vor allem in Gehirn, Herz und Skelettmuskel exprimiert,

während die Expression von HDAC6 in Herz, Leber, Nieren und Pankreas hoch ist (Fischle et al., 1999; Fischle et al., 2001b; Grozinger et al., 1999). Die dritte Klasse der HDACs, die nach ihrem Hefehomolog SIR2 (silencing information regulator 2) benannt wurde und als SIRT1-7 bezeichnet wird, wurde erst kürzlich entdeckt (Frye, 1999; Frye, 2000). Der Unterschied von SIRTs zu den anderen HDAC-Klassen besteht darin, dass sie NAD^+ (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) als Kofaktor benötigen (Frye, 2000; Vaziri et al., 2001). Zusätzlich können sie nicht durch den spezifischen HDAC-Inhibitor Trichostatin A gehemmt werden (Imai et al., 2000). Die SIRT-Proteine sind in Pro- und Eukaryonten hoch konserviert und besitzen eine etwa 275 Aminosäuren große katalytische Domäne. Eine Mutation dieses katalytischen Bereichs führt zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität (Frye, 1999; Grozinger et al., 2001; Imai et al., 2000). Tabelle 2 zeigt die bisher in der Hefe sowie im Menschen identifizierten Histon-Deacetylasen. Die Tabelle wurde in Anlehnung an Gray and Ekstrom (2001) zusammen gestellt.

Tabelle 2: Übersicht über bereits identifizierte Histon-Deacetylasen

Abkürzungen: HDA1 = histone deacetylase 1; HDAC = histone deacetylase; RPD3 = reduced potassium dependency; SIR = silencing information regulator

HDAC-Klasse	**HDAC-Proteine (Hefe)**	**Bereits identifizierte humane HDACs**
Klasse I	RPD3	HDACs 1, 2, 3 und 8
Klasse II	HDA1	HDACs 4, 5, 6, 7, 9 und 10
Klasse III	SIR2	SIRT1-7

1.3.3 Histon-Deacetylasen anderer Spezies

Inzwischen sind außerdem eine Reihe von Histon-Deacetylasen in anderen Organismen entdeckt worden (Jung, 2001), z.B. in der Maus (Mahlknecht et al., 1999b), im Mais (Lechner et al., 1996) oder in *Plasmodium falciparum*, einem humanen Malaria-Parasiten (Joshi et al., 1999).

1.4 Einfluss des Histon-Acetylierungsstatus auf die Transkriptionsrate

Ein erhöhter Acetylierungsstatus der Lysinreste an Histonproteinen geht meistens mit einer gesteigerten Transkriptionsrate einher. Dies könnte durch die verbesserte Verfügbarkeit der DNA-Bindungsstellen für die Transkriptionsmaschinerie (wie RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktoren) erklärbar sein. Im Gegensatz dazu wird durch die Aktivität von Histon-Deacetylasen die Transkriptionsrate der meisten Gene vermindert (Grunstein, 1997; Hassig and Schreiber, 1997; Kuo and Allis, 1998). Der Prozess der (De-)Acetylierung der Lysinreste von Histonen erfolgt posttranslational und ist reversibel. Hierbei wird durch HATs die Acetylgruppe von AcetylCoA auf die ε-Aminogruppe der Lysine übertragen. Somit wird die positive Ladung neutralisiert und die Hydrophobizität des Proteins erhöht. In der Deacetylierungsreaktion werden die Acetylgruppen abgespalten und die positive Ladung der Lysine wird wieder hergestellt, wie Abb. 2 zeigt (Davie, 1998; Kuo and Allis, 1998). Die Abb. wurde in Anlehnung an Kuo and Allis (1998) erstellt.

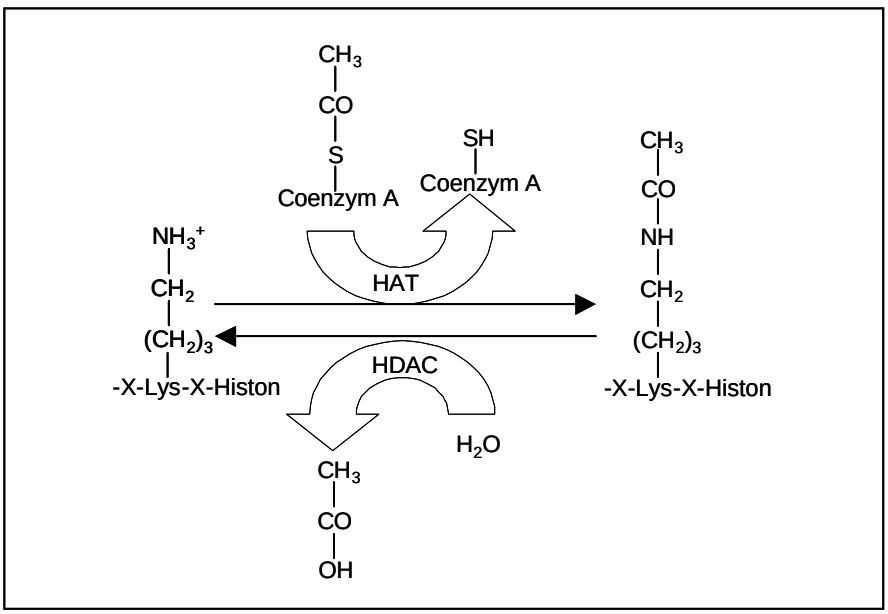


Abbildung 2: Die Gleichgewichtsreaktion der Histon-(De-)Acetylierung

Histon-Acetyltransferasen (HATs) übertragen die Acetylgruppe von Coenzym A auf Lysinreste von Histonen. Histon-Deacetylasen (HDACs) katalysieren die umgekehrte Reaktion, wobei die Acetylgruppe wieder vom Lysinrest abgespalten wird.

Histon-Acetyltransferasen besitzen eine Präferenz für bestimmte Histone und Transkriptionsfaktoren. Am häufigsten werden die Histone H3 und H4 acetyliert (Johnstone, 2002). Neben den Histonen werden der Tumorsuppressor p53 (Juan et al., 2000), der Transkriptionsfaktor GATA-1 (Boyes et al., 1998) oder auch Proteine wie Tubulin (Zhang et al., 2003) durch (De-)Acetylierung modifiziert (Kim et al., 2003; Kouzarides, 2000).

1.5 Der „Epigenetische Code“

Der Acetylierungsstatus der Lysinreste der Histonproteine ist bei der normalen und pathogenen Zellentwicklung von entscheidender Bedeutung. Es gibt trotz gleicher Erbinformation in jeder Zelle eine genaue Festlegung darüber, welche Gene exprimiert werden und bei welchen die Transkription unterdrückt wird. Welches Gen aber nun exprimiert wird, wird u.a. über acetylierte und deacetylierte Chromatinbereiche festgelegt. Hierdurch können aktive und inaktive Genabschnitte unterschieden werden. Seit einiger Zeit wird ein sog. „Epigenetischer Code“ propagiert (Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2000), der besagt, dass abhängig von bestimmten (de-)acetylierten Bereichen im Chromatin eine Genexpression unterdrückt bzw. gefördert wird. Dieser „Histon-Code“ könnte dann von Nicht-Histonproteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren) „gelesen“ werden bzw. kann zu Änderungen in der Chromatinstruktur führen, die eine Genexpression begünstigen bzw. hemmen (Cheung et al., 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2000). Abb. 3 zeigt eine schematische Übersicht über den propagierten „Histon-Code“.

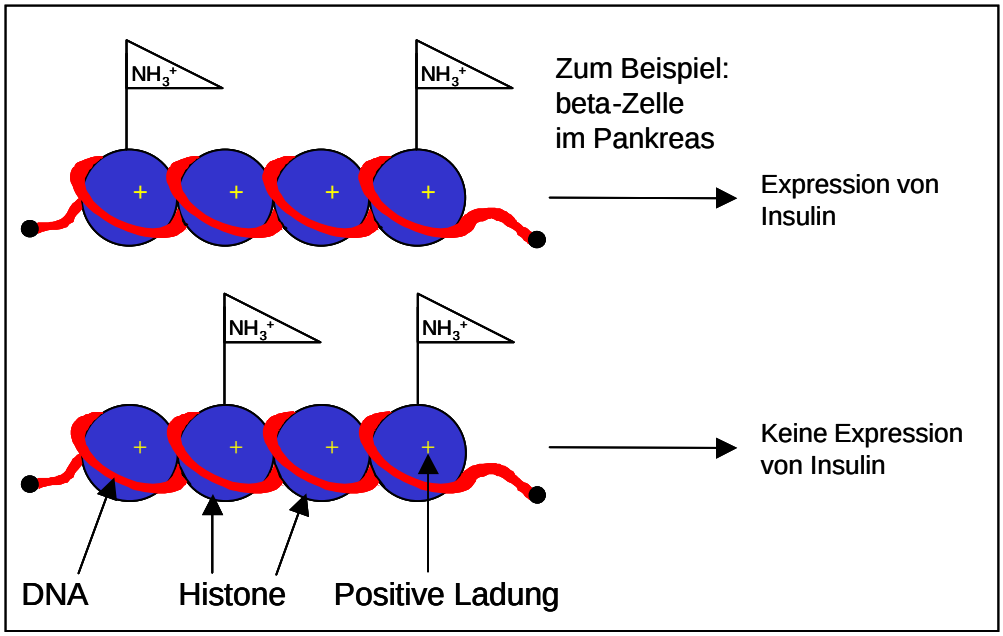


Abbildung 3: Schematische Darstellung des propagierten „Histon-Code“

Der „Histon-Code“ besagt, dass die Expression eines Gens davon abhängig ist, welcher Lysinrest an bestimmten Histonen acetyliert ist. Der unterschiedliche Acetylierungsstatus führt dann zu einer veränderten Chromatinstruktur und damit zu einer unterschiedlichen Genexpression.

1.6 Histon-Deacetylasen als Teil von Multiproteinkomplexen

HDACs liegen in der Zelle in Multiproteinkomplexen vor und führen durch ihre Repressoraktivität zu einer Unterdrückung der Genexpression. HDAC1 und HDAC2 sind zusammen mit den Proteinen mSin3a (switch independent 3) (Ordentlich et al., 2001; Xu et al., 1999; Zhang et al., 1998) und NuRD (nucleosome remodeling and histone deacetylase) (Xue et al., 1998; Zhang et al., 1999) zu finden. Die beiden Korepressoren N-CoR (nuclear receptor corepressor) und SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors) sind dagegen Kofaktoren u.a. für HDAC3. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die Protein- und Korepressorkomplexe von verschiedenen Histon-Deacetylasen (in Anlehnung an Johnstone (2002)).

Tabelle 3: Histon-Deacetylasen liegen in der Zelle in verschiedenen Protein- und Korepressorkomplexen vor

Abkürzungen: BRCA-1 = breast cancer protein 1; GATA-2 = GATA-binding protein 2; MEF2 = myocyte enhancer factor 2; mSin3 = switch independent 3; N-CoR = nuclear receptor corepressor; NFκB = nuclear factor kappa B; NuRD = nucleosome remodeling and histone deacetylase; RB = Retinoblastom; SMRT = silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors

HDAC (Auswahl)	**Komplex**	**Korepressor**	**Interagierende Proteine (Auswahl)**
HDAC1	NuRD, mSin3		RB, p53, NFκB, BRCA-1
HDAC2	NuRD, mSin3		RB, NFκB, BRCA-1
HDAC3		N-CoR, SMRT	RB, NFκB, GATA-2
HDAC4		N-CoR, SMRT	MEF2
HDAC5		N-CoR, SMRT	MEF2, GATA-2
HDAC7		N-CoR, SMRT	MEF2
SIRT1			p53

Die Korepressoren sind an den Promotorstellen von reprimierten Genen gebunden. Ein Protein wird als Korepressor bezeichnet, wenn es folgende Kriterien erfüllt: 1) Bei einer Bindung an eine (heterologe) DNA-Bindungsdomäne (DBD) unterdrückt es die Transkription, 2) das Protein interagiert mit der Repressordomäne eines Transkriptionsfaktors, 3) die Bindung an die Repressordomäne des Transkriptionsfaktors ist vermindert, wenn die Bindungsstelle der Repressordomäne Mutationen aufweist, 4) das Protein verstärkt konzentrationsabhängig die hemmende Funktion des Transkriptionsfaktors (Zamir et al., 1996). HDAC3 z.B. kann seine enzymatische Funktion nur erfüllen, wenn alle anderen Komplexbestandteile vorhanden sind (Guenther et al., 2001). Aufgereinigte HDAC3-Enzymkomplexe ohne assoziierte Komponenten sind inaktiv. HDAC3 wird in der Zelle über eine Deacetylase-

Aktivierungsdomäne (DAD), die in SMRT, aber auch in N-CoR vorhanden ist, aktiviert. Dabei ist die Anwesenheit von SMRT mit HDAC3 ausreichend für eine aktive Enzymfunktion, während HDAC4 von SMRT zwar gebunden, aber nicht aktiviert wird (Guenther et al., 2001; Li et al., 2000; Zhang et al., 2002). Inzwischen ist neben der DAD noch eine Histon-Interaktionsdomäne (HID) entdeckt worden, die die Affinität des DAD-HDAC3-Enzymsubstrates vergrößert und damit die Repression erhöht. Die HID unterdrückt außerdem die Aktivität von Histon-Acetyltransferasen und trägt damit zu einer weiteren Hemmung der Genexpression bei (Yu et al., 2003).

1.7 Veränderungen in der Chromatinstruktur durch „Chromatin-Remodeling“

Chromatin besitzt eine wichtige Funktion bei der Regulierung der Genexpression und weist eine dynamische Struktur auf (Luo and Dean, 1999; Turner, 2000). Es werden zwei verschiedene Mechanismen propagiert, die es ermöglichen, die Anordnung von Chromatin bzw. der Nukleosomen zu verändern, und die unter dem Terminus „Chromatin-Remodeling“ zusammengefasst werden.

Eine Möglichkeit besteht in der posttranslationalen Modifizierung von Histonen durch (De-)Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung, auf die in Abschnitt 1.2 schon kurz eingegangen wurde. Hierbei hat vor allem die Acetylierung einen Einfluss auf die Veränderungen in Nukleosomen. Durch das Anhängen einer Acetylgruppe an die Lysinreste der Histone wird die Nukleosomenstruktur meist so verändert, dass die DNA für die Proteine der Transkriptionsmaschinerie besser verfügbar wird (Turner, 2000; Wolffe and Hayes, 1999).

Der zweite Mechanismus besteht aus ATP-abhängigen Modifikationen der Nukleosomen (Tsukiyama and Wu, 1997; Tyler and Kadonaga, 1999). Die Strukturänderungen werden durch sog. „Chromatin-Remodeling“-Komplexe vermittelt, die eine intrinsische ATPase-Aktivität besitzen. Die Hydrolyse von ATP ist die Grundlage dafür, dass es zu einer Aufhebung der Bindung zwischen der DNA und den Histonen kommt (Luo and Dean, 1999; Tsukiyama and Wu, 1997). Die Energie aus der ATP-Hydrolyse wird genutzt, um eine Mobilisierung der Nukleosomen zu katalysieren, d.h. die Position des Histonoktamers zur DNA ändert sich. Die Verschiebung des Histonoktamers bedeutet, dass die Kontakte der DNA zu den Histonen aufgelöst und wieder neu geknüpft werden müssen. Wie es genau zu

einer Beeinflussung der Transkription kommt, konnte bisher noch nicht restlos geklärt werden. Eine Hypothese besagt, dass es Transkriptionsfaktoren durch die Verschiebung des Histonoktamers ermöglicht wird, an die DNA zu binden (Tyler and Kadonaga, 1999). Die einzelnen Chromatin-Remodeling-Komplexe selbst werden in drei Gruppen unterteilt, die auf ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit der ATPase-Untereinheit SWI2/SNF2 (switching/sucrose non-fermenting) in der Hefe basieren (Korber and Horz, 2004; Sng et al., 2004). Der SWI/SNF-Remodeling-Komplex ist im Menschen z.B. für die Regulierung der Zellproliferation verantwortlich (Bourachot et al., 2003). Bisher wurden zwei humane Gene identifiziert, die *BRG1* und *hbrm* genannt wurden und deren Genprodukte, die ATPase-Untereinheiten Brg1 und hBrm, in die Regulation des Zellwachstums involviert sind (Pollard and Peterson, 1998). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass das hBrm-Protein acetyliert werden kann (Bourachot et al., 2003). Während der Mitose werden Brg1 und hBrm phosphoryliert und sind durch ihre Bindung an das Retinoblastomprotein in die Kontrolle von Zellwachstum und –proliferation eingebunden (Sif et al., 2001). Chromatin-Remodeling-Komplexe wurden ursprünglich ausschließlich mit einer Transkriptions-aktivierung in Verbindung gebracht. Neuere Ergebnisse haben darauf hingewiesen, dass es zusätzlich zu einer Unterdrückung der Genexpression kommen kann (Tyler and Kadonaga, 1999). Die Entdeckung des Proteinkomplexes NuRD (nucleosome remodeling and histone deacetylase, siehe auch 1.6) zeigte, dass bei diesem Remodeling-Komplex durch die Histon-Deacetylierung eine Transkriptions-repression hervor gerufen werden kann. NuRD besitzt als zentrale ATPase das Protein Mi-2 und verfügt über weitere Untereinheiten, in denen Histon-Deacetylasen sowie Proteine, die an das Retinoblastomprotein gebunden sind, gefunden werden (Tong et al., 1998; Wade et al., 1998; Xue et al., 1998).

1.8 Veränderungen in der Chromatinstruktur als Ursache für maligne Erkrankungen

Chromatin-Remodeling trägt zur normalen Zellentwicklung und –proliferation bei. Wird allerdings die Chromatinstruktur abweichend verändert, z.B. durch chromosomale Translokationen, kann es zur Ausbildung verschiedener Krankheiten kommen. Dabei können sowohl Histon-Acetyltransferasen als auch Histon-

Deacetylasen involviert sein.

1.8.1 Die Bedeutung von Histon-Acetyltransferasen bei der Entstehung maligner Krankheiten

Bei chromosomalen Translokationen kommt es zur Ausbildung von Fusionsproteinen, wodurch die enzymatische Aktivität von Histon-Acetyltransferasen verändert werden kann. Ein Beispiel für eine Krankheit, die durch chromosomale Translokationen bedingt ist und bei der Histon-Acetyltransferasen involviert sind, ist die Akute Leukämie MLL-CBP. Diese Erkrankung wird im Menschen durch die Fusion zweier Faktoren verursacht: dem Transkriptionsregulator MLL (mixed lineage leukemia) und der Histon-Acetyltransferase CBP (CREB-binding protein) (Cairns, 2001; Rowley, 1998; Taki et al., 1997). MLL ist ein transkriptioneller Regulator (Transkriptionsfaktor), der an DNA bindet. Er interagiert mit Chromatin-regulierenden Komplexen und ist wichtig für die Expression von *HOX*-Genen, die für Entwicklung und Hämatopoese zuständig sind (Cairns, 2001; Yu et al., 1998). MLL besitzt viele Bindungspartner, z.B. CBP. CBP selbst ist ein Protein, das u.a. eine HAT-Domäne sowie eine Bromodomäne besitzt. Eine Bromodomäne ist eine 110 Aminosäuren lange Sequenz, die in vielen eukaryotischen Transkriptionsfaktoren gefunden wird. Diese Domäne interagiert spezifisch mit Acetyllysin, vor allem an den Histonen H3 und H4. Acetylierte Lysinreste an Histonen kommen häufig in transkriptionell aktivem Chromatin vor. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Bromodomänen eine Rolle bei der Anbindung von HATs und anderen Koaktivatoren an „aktives“ Chromatin spielen. Bromodomänen haben also Einfluss auf das Chromatin-Remodeling und die Transkriptionsaktivierung (Cairns, 2001; Kouzarides, 2000; Winston and Allis, 1999). Das Fusionsprotein aus MLL und CBP beeinflusst die Aktivität und Transkription von Histon-Acetyltransferasen, wobei der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist. Normalerweise ist CBP für die Regulierung des Zellzyklus verantwortlich. Durch die Fusion von CBP an MLL kann diese Aufgabe nicht mehr wahrgenommen werden, und infolgedessen entwickelt sich eine Leukämie. Die Expression des Fusionsproteins MLL/CBP führt durch die Verschiebung des Acetylierungs-gleichgewichts hin zu einer Leukämie, da die hämatopoetischen Zellen nicht mehr richtig ausdifferenzieren können (Taki et al., 1997). Mutationen des *CBP*-Gens

führen zu einer Entwicklung des Rubinstein-Taybi-Syndroms (Petrij et al., 1995), wobei diese Patienten ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von malignen Tumoren haben (Miller and Rubinstein, 1995). CBP wird daher als Tumorsuppressorgen angesehen (Taki et al., 1997).

Eine weitere Form der Akuten Myeloischen Leukämie besteht in der Translokation [t(11;22)(q23;q13)], wobei es zur Fusion zwischen MLL und der Histon-Acetyltransferase p300 kommt. Dadurch kann p300 seine Funktion, den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung zu regulieren, nicht mehr ausüben (Ida et al., 1997). Bei MLL-CBP und MLL-p300 wird davon ausgegangen, dass durch die Translokation eine dauerhafte Aktivierung der HAT-Aktivität hervor gerufen wird, da die katalytische Domäne der Acetyltransferase im Fusionsprotein erhalten bleibt. Dadurch werden weitere Acetyltransferasekomponenten von Koaktivatorkomplexen rekrutiert, und die Expression vorher nicht transkribierter Gene kann induziert werden. Auch bei der Leukämie MLL-AF9 mit der Translokation [t(9;11)(p22;q23)] wird ein Fusionsprotein gebildet. Es wird angenommen, dass es hierbei zu einer permanenten Bindung von MLL an SWI/SNF kommt, so dass der SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplex konstitutiv aktiviert wird. Bei der Translokation [t(8;16)(p11;p13)] wird CBP an die Acetyltransferase MOZ (monocytic leukemia zinc finger) gebunden. Hier wird die HAT-Aktivität durch die Bildung des Fusionsproteins zusätzlich erhöht (Borrow et al., 1996).

Jeder der genannten Mechanismen ruft eine Strukturveränderung im Chromatin hervor und führt zu einer veränderten Transkription. Bei der Ausbildung von MLL-Fusionsproteinen kann es zu einem Verlust der Fähigkeit zur Rekrutierung von SWI/SNF kommen, wodurch die normale Funktion von MLL (als Regulator der Genexpression) unterdrückt wird (Redner et al., 1999).

Histon-Acetyltransferasen können auch bei der Entstehung von soliden Tumoren beteiligt sein, denn beim Kolorektumkarzinom und beim Magenkarzinom wurden Punktmutationen im *p300*-Gen gefunden. Die Inaktivierung des *p300*-Gens könnte damit eine wichtige Rolle bei der Entstehung von soliden Tumoren spielen (Muraoka et al., 1996).

1.8.2 Die Bedeutung von Histon-Deacetylasen bei der Entstehung maligner Krankheiten

HDACs können ebenfalls an Krebserkrankungen beteiligt sein. Bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich bei 12-15% aller Fälle um die Translokation [t(8;21)(q22;q22)]. Hierbei ist die DNA-Bindungsdomäne von AML1 an den Repressor ETO (eight-twenty-one, auch als MTG8 oder CDR bezeichnet) gebunden (Fenrick and Hiebert, 1998; Lenny et al., 1995; Lenny et al., 1997). Bei dieser Form der Leukämie hat sich ein Fusionsprotein zwischen AML und ETO gebildet. AML1 interagiert normalerweise mit p300, ETO dagegen bindet an N-CoR und bildet zusammen mit HDAC1, mSin3a (switch independent 3a) und N-CoR einen Repressorkomplex, der die Transkription unterdrückt (Cress and Seto, 2000; Fenrick and Hiebert, 1998). Die Bildung des Fusionsproteins führt zu einer vermehrten Rekrutierung von HDACs bzw. zu einem Austausch eines Koaktivators gegen einen Korepressor. Anstatt einer myeloiden Differenzierung kommt es nachfolgend durch die Bindung von AML1 an den Repressor ETO zu einer Hemmung derselben (Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998). Durch die Inhibition von HDACs kann auf das Krankheitsbild der Akuten Leukämie Einfluss genommen werden (Lin et al., 1998; Wang et al., 1998).

Ein Zusammenhang zwischen veränderter HDAC-Aktivität und Tumorentstehung ist auch bei der Akuten Promyelozytenleukämie (APL) gegeben. Bei dieser Krankheit ist der Retinsäurerezeptor (RARα) beteiligt. Der Retinsäurerezeptor ist ein transkriptioneller Regulator, der für die myeloide Differenzierung notwendig ist. RARα und sein Partner RXR (Retinoid-X-Rezeptor) bilden ein Heterodimer und binden an Retinsäure-response-Elemente (RAREs). In Abwesenheit von Retinoiden werden Sin3/HDAC über die Korepressoren N-CoR und SMRT gebunden, und infolgedessen kommt es zur Unterdrückung der Genexpression. Nach der Bindung eines Liganden (Retinoide) löst sich der HDAC-Komplex vom RARα-RXR-Dimer und erlaubt die Bindung von HATs, um damit die Transkription wieder zu aktivieren. Bei der APL verläuft der Prozess der Krankheitsentstehung folgendermaßen: Durch chromosomale Translokationen kommt es zur Bildung von Fusionsproteinen des Retinsäurerezeptors entweder mit dem PLZF-Locus [t(11;17)(q23;q21)] (Promyelozyten-leukämischer Zinkfinger) oder dem PML-Locus [t(15;17)(q22;q21)]

(Promyelozytenleukämie). Diese Fusionsproteine interagieren dann mit den Repressorkomplexen SMRT und N-CoR, an denen auch HDACs beteiligt sind. Dadurch wird die normale Hämatopoese gehemmt und es kommt zur Leukämie. Der durch die Fusionsproteine entstehende Differenzierungsblock kann bei PLZF-RAR durch die Gabe von HDAC-Hemmstoffen aufgehoben werden (Fenrick and Hiebert, 1998; Gottlicher et al., 2001; Johnstone, 2002; Minucci et al., 2001; Warrell et al., 1998). Der Retinsäurerezeptor RARα kann als typisches Modell für das Chromatin-Remodeling gelten, da die APL zu einer vermehrten Histon-Deacetylierung führt. Die fehlende Acetylierung führt dann zu Störungen in der Transkription und zu leukämischen Transformationen (Redner et al., 1999). Kürzlich wurde eine Überexpression von HDAC1 in Prostatakrebszellen nachgewiesen (Halkidou et al., 2004). Auch hier ist die gesteigerte Deacetylierung von Histonen die Ursache für ein verändertes Chromatin-Remodeling.

Histon-Deacetylasen haben einen großen Einfluss auf die Chromatinstruktur. HDAC-Inhibitoren werden daher als viel versprechende neue Medikamente gegen Leukämien und solide Tumoren eingeschätzt. Der folgende Abschnitt gibt eine Übersicht über einige der bisher identifizierten bzw. neu synthetisierten Hemmstoffe von Histon-Deacetylasen.

1.9 HDAC-Inhibitoren

1.9.1 Hemmung der enzymatischen Aktivität von Histon-Deacetylasen

Der Acetylierungsstatus bestimmt die Genexpression und kann durch verschiedene Substanzen beeinflusst werden. Die kurzkettige Fettsäure Butyrat (Buttersäure) wurde schon vor einigen Jahren als Hemmstoff von Histon-Deacetylasen entdeckt (Boffa et al., 1978). Acetylsalicylsäure (Aspirin®) beeinflusst den Acetylierungs-zustand (Pinckard et al., 1968) ebenso wie die antibiotisch wirksamen Reagenzien Trichostatin A und Trapoxin B u.a., die ebenfalls die HDAC-Aktivität hemmen (Dangond et al., 1998; Yoshida et al., 1995). Erste Studien zu der Wirkungsweise von HDAC-Inhibitoren wurden vor einigen Jahren mit dem thermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus* durchgeführt. Anhand von kristallografischen Methoden wurde herausgefunden, dass das aktive Zentrum von Histon-Deacetylasen ein Zinkion

besitzt. HDAC-Inhibitoren hemmen die enzymatische Aktivität von Histon-Deacetylasen, indem sie mit dem aktiven Zentrum des Enzyms interagieren und dabei die Substratbindung blockieren (Finnin et al., 1999; Johnstone, 2002). HDAC-Inhibitoren werden nach ihrer Struktur in verschiedene Gruppen eingeteilt, wie Tabelle 4 zeigt (He et al., 2001; Johnstone, 2002; Kim et al., 2003; Kouraklis and Theocharis, 2002).

Tabelle 4: Übersicht über die verschiedenen Substanzklassen der HDAC-Inhibitoren

Substanzklasse	**Substanzbeispiele**
Kurzkettige Fettsäuren	o Butyrat (Davie, 2003) o Phenylbutyrat (Carducci et al., 2001) o Valproat (Blaheta and Cinatl, 2002)
Hydroxamsäuren	o SAHA (Suberoylanilid-Hydroxamsäure) (Richon et al., 1998) o Scriptaid (SB-556629) (Su et al., 2000) o Trichostatin A (TSA) (Yoshida et al., 1995)
Zyklische Tetrapeptide mit einem 2-Amino-8-Oxo-9,10-Epoxy-Decanoyl (AOE)-Rest	o Trapoxin (Yoshida et al., 1995)
Zyklische Tetrapeptide ohne AOE-Rest	o FK228 (Furumai et al., 2002; Nakajima et al., 1998) = Depsipeptide, früher als FR901228 bezeichnet
Benzamide	o CI-994 (oder N-acetyldinaline) (Kraker et al., 2003) als indirekter HDAC-Inhibitor o MS-27-275 (Saito et al., 1999)
Epoxide	o Depudecin (Kwon et al., 1998)

1.9.2 Erste Studien mit HDAC-Inhibitoren in der Zellkultur

HDAC-Inhibitoren wurden in anfänglichen Untersuchungen in der Zellkultur eingesetzt. Die durch die Hemmung der HDAC-Aktivität in verschiedenen Zelllinien verursachten Effekte sind vielfältig: Neben Wachstumsarrest, Differenzierung oder Apoptose von transformierten Zellen induzieren HDAC-Inhibitoren in der Zellkultur auch eine Hyperacetylierung von Histonen (Kouraklis and Theocharis, 2002; Marks et al., 2000; Richon et al., 1998). Dabei wird eine Hyperacetylierung aller Histone sowohl in normalen als auch in Tumorzellen hervorgerufen (Butler et al., 2000; Butler et al., 2001; Marks et al., 2000; Richon et al., 1998). Die folgende Abb. 4 zeigt schematisch die Wirkungsweise von Histon-Deacetylaseinhibitoren (Abb. in Anlehnung an Marks et al. (2001a)).

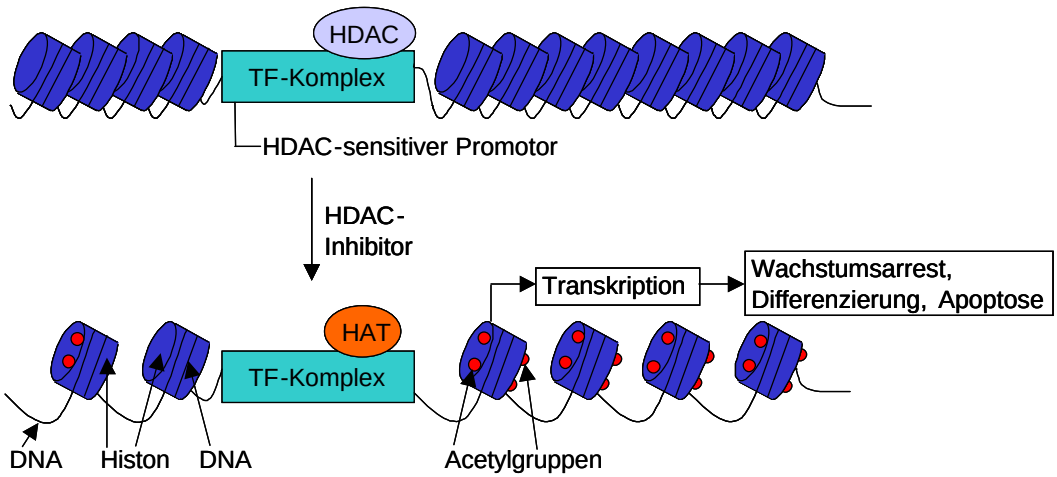


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von HDAC-Inhibitoren

Oberer Teil der Abb.: HDACs sind an den Transkriptionsfaktorkomplex (TF-Komplex) gebunden; die Genexpression wird unterdrückt. Die Histone sind deacetyliert und dicht gepackt, die DNA ist nicht frei zugänglich für Transkriptionsfaktoren.

Unterer Teil der Abb.: Die Bindung von HDACs wird durch einen HDAC-Inhibitor aufgehoben. Die Histone werden durch die Bindung von HATs an den Transkriptionsfaktorkomplex acetyliert und die DNA ist zugänglich für Transkriptionsprozesse.

Abkürzungen: HAT = Histon-Acetyltransferase; HDAC = Histon-Deacetylase; TF-Komplex = Transkriptionsfaktorkomplex

1.9.3 Übersicht über verschiedene HDAC-Inhibitoren

In den letzten Jahren sind viele HDAC-Hemmstoffe entdeckt oder neu generiert worden. Im Folgenden wird auf die wichtigsten HDAC-Inhibitoren und ihre Effekte speziell in der Zellkultur eingegangen.

1.9.3.1 Trichostatin A

Trichostatin A (TSA) wurde ursprünglich als Fungizid entwickelt und wirkt bereits in nanomolaren Konzentrationen als HDAC-Inhibitor (Yoshida et al., 1995; Yoshida et al., 1990). Die durch TSA induzierte Hyperacetylierung von Histonen wird z.B. in Ratten-Fibroblasten durch eine Hemmung der Deacetylierung verursacht, und nicht durch eine gesteigerte Histon-Acetylierung (Yoshida et al., 2001; Yoshida et al., 1990). TSA induziert einen Zellzyklusarrest sowohl in der G_1- als auch in der G_2-Phase (Kouzarides, 1999; Yoshida and Beppu, 1988). Dieser Zellzyklus-Arrest basiert auf folgenden Mechanismen: HDAC-Inhibitoren induzieren die Expression des *CDKN1A*-Gens, welches für den cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21 kodiert (cdk = cyclin dependent kinase). p21 ruft einen Zellzyklus-Arrest in der G_1-Phase hervor. Durch transiente Transfektionen wurde herausgefunden, dass für die TSA-vermittelte p21-Induktion eine spezifische SP1-Stelle im *CDKN1A*-Promotor vorhanden sein muss. Die Mitglieder der SP1-Familie von Transkriptionsfaktoren fungieren entweder als positive oder negative Regulatoren der Genexpression. Es wurde gezeigt, dass SP1 direkt an HDAC1 bindet und dass eine Unterdrückung der Genexpression durch HDAC1 über SP1 vermittelt wird (Doetzlhofer et al., 1999; Marks et al., 2001a). Der Mechanismus der p21-Induktion durch die Gabe von TSA weist darauf hin, dass die Bindung von TSA direkt am *CDKN1A*-Promotor stattfindet (Marks et al., 2001a; Richon et al., 1998). SP1 ist u.a. auch notwendig für eine Transaktivierung von *hTERT*, einem Gen, das für eine katalytische Untereinheit des Proteins Telomerase kodiert. Die enzymatische Aktivität von Telomerasen trägt dazu bei, die Enden von Chromosomen (Telomere) vor dem Abbau zu schützen. Durch die Bindung von HDACs am *hTERT*-Promotor wird die Expression unterdrückt. Durch die Gabe von TSA wird die Telomerase-Aktivität in normalen Zellen, aber nicht in Krebszellen, induziert (Takakura et al., 2001). SP1 interagiert aber nicht nur mit HDACs, sondern auch mit anderen Transkriptionsaktivatoren. Neuere Studien haben

gezeigt, dass SP1 mit p300, einer Histon-Acetyltransferase, interagiert (Suzuki et al., 2000). Die SP1-abhängige Genregulation wird also durch einen Wettbewerb zwischen HDACs und aktivierenden Faktoren gesteuert (Doetzlhofer et al., 1999; Marks et al., 2001a; Suzuki et al., 2000; Takakura et al., 1999).

1.9.3.2 SAHA

SAHA (Suberoylanilid-Hydroxamsäure) induziert in murinen Erythroleukämie-Zellen (MEL) eine Akkumulation von hyperacetylierten Histonen an der Stelle des Chromatins, das mit dem *CDKN1A*-Gen assoziiert ist. Ein Anstieg der Acetylierung bedeutet gleichzeitig eine erhöhte Transkriptionsrate dieses Gens. SAHA hemmt HDACs in mikromolaren Konzentrationen und führt wie z.B. TSA zu einem Zellzyklusarrest (Marks et al., 2001a; Richon et al., 1998). Die Promotorregionen verschiedener Gene, z.B. *CDKN1A* oder *TERT*, deren Transkription selektiv auch durch SAHA gesteigert wird, besitzen spezifische SP1-Stellen, an die HDAC-rekrutierende Transkriptionskomplexe binden, worüber die Genexpression gehemmt wird. Die Aktivierung von vorher abgeschalteten Genen kann durch die Hemmung der HDAC-Funktion zu Wachstumsarrest, Differenzierung und/oder Apoptose transformierter Zellen beitragen (Marks et al., 2001a).

1.9.3.3 Trapoxin B

Durch Trapoxin B werden Histon-Deacetylasen irreversibel gehemmt. Nach einer Gabe von Trapoxin B erhöht sich z.B. in Rattenfibroblasten ebenfalls der Acetylierungsgrad der Histone (Yoshida et al., 2001; Yoshida et al., 1995). Es wurde außerdem gezeigt, dass HDAC6 resistent gegenüber Trapoxin B ist (Yoshida et al., 2001).

1.9.3.4 FK228

FK228 wurde u.a. in der Zelllinie MCF-7, einem Modell des Mammaadenokarzinoms, eingesetzt. Ein Anstieg des Acetylierungsstatus der Histone wurde beobachtet. Außerdem wurde ein Zellzyklusarrest in der G_1- und der G_2-Phase induziert. Hierbei wurde nicht nur ein antiproliferativer Effekt durch FK228 nachgewiesen, sondern es

wurden Hinweise darauf gefunden, dass die Zellen apoptotisch geworden waren, wie eine Verkleinerung der Zellen sowie eine DNA-Fragmentierung (Nakajima et al., 1998).

1.9.3.5 Butyrat

Butyrat induziert in der Zelllinie HT29, einem Modell für das Kolonadenokarzinom, einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Barnard and Warwick, 1993), eine Hyperacetylierung von Histon H4 sowie eine Zelldifferenzierung. Zusätzlich steigert Butyrat die Apoptoserate (Hinnebusch et al., 2002). In nicht-transformierten Fibroblasten ruft Butyrat eine Wachstumsinhibition hervor, die reversibel ist (Yoshida and Beppu, 1988). Außerdem wurde gezeigt, dass Butyrat und TSA in HCT116 Zellen, einer Kolonkarzinom-Zelllinie, einen Zellzyklusarrest induzieren, der ebenfalls reversibel ist. Im Gegensatz dazu wurde in VACO5-Zellen, die eine Subpopulation der Zelllinie HT116 darstellen, Apoptose induziert (McBain et al., 1997). In der T-Zelllinie Jurkat wurde nachgewiesen, dass Butyrat und TSA die Proteinneusynthese von aktiver Caspase-3, einer Protease, die ein zentrales Enzym der Apoptose darstellt, induziert (Medina et al., 1997). In der humanen Kolonkarzinomzelllinie KM20 wurde ebenfalls eine durch Butyrat induzierte Apoptose beobachtet (Wang et al., 2002).

1.9.4 Der klinische Einsatz von HDAC-Inhibitoren

HDAC-Inhibitoren sind in der Lage, in Tumorzelllinien z.B. einen Zellzyklusarrest oder auch Apoptose zu induzieren. Auf Grund dieser Ergebnisse in der Zellkultur wird den HDAC-Inhibitoren eine Funktion bei der Bekämpfung von verschiedenen Krebsarten zugeschrieben (Marks et al., 2001a). HDAC-Inhibitoren wurden bisher in verschiedenen klinischen Studien verwendet (Kelly et al., 2002; Kramer et al., 2001; Marks et al., 2001b; Marks et al., 2000; Piekarz et al., 2001).

Ein Abkömmling des Butyrats, Phenylbutyrat, wurde erfolgreich bei der Akuten Promyelozytenleukämie eingesetzt (Warrell et al., 1998). Andere HDAC-Inhibitoren kamen in klinischen Studien ebenfalls zum Einsatz, wie z.B. Butyrat bei Kolonkrebs (Archer et al., 1998; D'Argenio et al., 1996), TSA bei Lungenkrebs (Kim et al., 2001)

und SAHA sowie Phenylbutyrat bei Prostatakrebs (Butler et al., 2000; Pili et al., 2001). Dabei verursachten einige der HDAC-Inhibitoren wie SAHA oder MS-27-275 eine Hemmung des Tumorwachstums bei vergleichsweise geringen Nebenwirkungen (Butler et al., 2000; Saito et al., 1999). Allerdings kann das Auftreten von Nebenwirkungen nie ganz ausgeschlossen werden: Bei einer intravenösen Gabe von Phenylbutyrat über einen längeren Zeitraum bei Patienten mit einer Akuten Myeloischen Leukämie traten Schläfrigkeit und geistige Verwirrung auf (Gore and Carducci, 2000). Butyrate haben den Nachteil, dass sie in hohen Dosen gegeben werden müssen (im millimolaren Bereich), um eine Hemmung der HDAC-Aktivität zu erzielen. Außerdem beeinflussen sie andere Enzymsysteme (Newmark et al., 1994); sie hemmen neben den Enzymen für die DNA-Methylierung auch Enzyme, die Proteine phosphorylieren (Archer and Hodin, 1999).

Phenylbutyrat wurde bei Patienten, die an refraktären soliden Tumoren erkrankt waren, eingesetzt. Dadurch konnte der klinische Zustand der Patienten verbessert und der Krankheitsverlauf stabilisiert werden. Es wurden keine kompletten oder partiellen Remissionen erreicht, aber sieben Patienten hatten während der Verabreichung von Phenylbutyrat über sechs Monate einen stabilen Krankheitsverlauf. Allerdings ist die kurze Halbwertszeit von Phenylbutyrat im Serum ebenso als ein Nachteil anzusehen wie die hohen oralen Dosen, die gegeben werden müssen, um eine biologisch aktive Dosis im Blut zu erreichen. Außerdem verursachte das Medikament bei den Patienten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Verdauungsstörungen, Erschöpfung sowie periphere Ödeme und eine Hypokalzämie (Gilbert et al., 2001; Kouraklis and Theocharis, 2002).

Die kurzkettige Fettsäure Valproat (2-Propylpentansäure) wird schon seit 30 Jahren bei der längerfristigen Behandlung von Epilepsie eingesetzt. Vor kurzem wurde eine HDAC-inhibierende und antikanzerogene Aktivität Valproats nachgewiesen. Es hemmt Tumorwachstum und Metastasierung und induziert zudem eine Tumor-Differenzierung *in vitro* und *in vivo* (Blaheta and Cinatl, 2002; Gottlicher et al., 2001). Es zeigte sich, dass Valproat eine teratogene und lebertoxische Wirkung hat, die Wirkungen auf die normale Hämatopoese sind allerdings gering (Gottlicher et al., 2001; Loscher, 1999; Rettie et al., 1987).

Eine weitere klinische Studie mit Butyrat wurde mit Patienten durchgeführt, die an metastasierenden kolorektalen Karzinomen erkrankt waren. Im Anschluss an eine Chemotherapie erhielten die Patienten neben einer subkutanen Interleukin 2-Gabe zudem Arginin-Butyrat intravenös verabreicht. Es zeigte sich, dass Arginin-Butyrat ab einer Dosis von über 3 g pro kg Körpergewicht eine lebertoxische Wirkung hatte. Es wurden keine klinischen Verbesserungen des Krankheitszustandes beobachtet (Douillard et al., 2000).

CI-994 ist, oral appliziert, bioverfügbar, und ruft eine Akkumulation von hyperacetylierten Histonen hervor, kann allerdings Histon-Deacetylasen nicht direkt hemmen. Diese Substanz wurde von Tumor-Patienten gut vertragen und hatte bei Lungen- und Nierenkarzinomen einen Anti-Tumor-Effekt. Allerdings zeigte die Gabe von CI-994 als Monotherapeutikum bei diesen Arten von Tumoren keinen endgültigen Erfolg (Prakash et al., 2001). Zurzeit laufen weitere Studien, bei denen CI-994 zusammen mit anderen Medikamenten wie Carboplatin oder Paclitaxel in Kombination eingesetzt wird (Marks et al., 2001a).

1.9.5 Einsatz von HDAC-Inhibitoren in Tierversuchen

Butyrat ensteht im Dickdarm als ein Abbauprodukt von Ballaststoffen aus Lebensmitteln. Ein erhöhter Ballaststoffanteil in der Ernährung wird als protektiv gegen Darmkrebserkrankungen angesehen (Davie, 2003; Hassig et al., 1997b; Hinnebusch et al., 2002; Peters et al., 2003). Bisher wurden verschiedene Tierstudien zum Thema Ballaststoffe, Butyrat und Kolonkarzinome durchgeführt. In einer Studie wurden bei Ratten mittels der Chemikalie Azoxymethan intestinale Tumoren induziert. Durch die Fütterung verschiedener Diäten, die entweder Weizenkleie oder ein speziell gemahlenes Weizenmehl enthielten, wurde die Menge an Butyrat im Kolon im Vergleich zu einer ballaststoffarmen Diät erhöht. Nach sechs Monaten wurde die Zahl der Tumoren gemessen, und es zeigte sich, dass die Ratten, die die ballaststoffreiche Diät erhielten, weniger Karzinome entwickelt hatten als die Kontrollgruppe, die keine Ballaststoffe gefüttert bekam. Die erhöhte Menge an Butyrat im Kolon hat einen Einfluss auf die Entwicklung von Tumoren, aber der genaue Mechanismus ist noch nicht ganz geklärt (McIntosh et al., 2001).

Eine andere Studie mit Ratten zeigte, dass Weizenkleie einen größeren hemmenden Effekt auf die Tumorentstehung besitzt als Kleie aus Hafer oder Mais. Auch hier wurden bei den Tieren durch die Gabe von Azoxymethan Tumoren induziert. Die Ratten bekamen anschließend Diäten mit verschiedenen Fett-, Phytinsäure- und Weizenkleieanteilen verabreicht. Dabei zeigte sich, dass die Diäten, die mit Öl oder Öl und Phytinsäure angereichert waren, zu einer verminderten Tumorhäufigkeit und einem geringeren Tumorvolumen führten. Dadurch wurden Hinweise darauf gefunden, dass die Lipidfraktion der Weizenkleie einen tumorhemmenden Effekt haben kann (Reddy et al., 2000).

Hemmstoffe von Histon-Deacetylasen wurden in den letzten Jahren in vielen Studien gegen eine Vielzahl von Krebserkrankungen eingesetzt. Die bisherigen Forschungsergebnisse lassen auf eine erfolgreiche Bekämpfung von Krebs durch die Gabe von HDAC-Inhibitoren in der Zukunft hoffen.

1.10 Die humane Histon-Deacetylase 3 (HDAC3)

In dieser Arbeit wurde der Phänotyp der humanen Histon-Deacetylase 3 näher charakterisiert. HDAC3 gehört zu den Klasse I-Histon-Deacetylasen und ist ein 48,8 kDa großes Protein, das nicht nur im Zellkern vieler Zelltypen und Geweben vorkommt (Emiliani et al., 1998; Fischle et al., 2001a; Mahlknecht et al., 1999a), sondern auch im Zytoplasma (Yang et al., 2002). Humanes HDAC3 zeigt 53% Identität zu HDAC1 (Taunton et al., 1996) und HDAC2 (Yang et al., 1996a). HDAC3 kommt in der Zelle in Multiproteinkomplexen zusammen mit SMRT und N-CoR vor, bindet auch an Nicht-Histonproteine und ist außerdem mit Deacetylasen der Klasse II assoziiert (Fischle et al., 2001a; Grozinger and Schreiber, 2000).
Das Vorhandensein eines nukleären Export-Signals (NES) könnte darauf hinweisen, dass HDAC3 wie auch die Klasse II-HDACs zwischen Zellkern und Zytoplasma „wandern“ kann. Der C-terminale Teil von HDAC3 beeinflusst die Lokalisierung des Proteins im Zellkern und ist notwendig für die Deacetylase-Aktivität sowie die transkriptionelle Repressorfunktion (Yang et al., 2002). HDAC3 deacetyliert RelA (p65), eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors NFκB (nuclear factor kappa B), während NFκB selbst nach seiner Aktivierung in den Zellkern wandert und dort durch

die Bindung von Histon-Acetyltransferasen zu einer Expression von Zielgenen führt. HDAC3 nimmt damit Einfluss auf die Genexpression (Chen et al., 2001; Perkins et al., 1997). Neben HDAC3 bindet auch HDAC2 an p65, aber nur HDAC3 kann dieses Protein *in vitro* und *in vivo* deacetylieren (Kiernan et al., 2003).
HDAC3 bindet ebenfalls an den Transkriptionsfaktor GATA-2, der für die Proliferation und das Überleben von hämatopoetischen Zellen nötig ist, und unterdrückt dessen Funktion (Ozawa et al., 2001). HDAC3 wurde außerdem in einem Komplex gefunden, der aus RB (Retinoblastom) und PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) besteht. RB kontrolliert Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose (Fajas et al., 2003; Hatakeyama and Weinberg, 1995). RB schützt vor Apoptose (Morgenbesser et al., 1994; Pan and Griep, 1995) und arretiert die Zellproliferation durch eine Bindung an die Transkriptionsfaktorfamilie E2F, die die Gene für die Progression in die S-Phase steuern, wie z.B. Cyclin E (Helin, 1998). PPARγ ist ein nukleärer Rezeptor, der ursprünglich durch seine Funktion bei der Adipozytendifferenzierung entdeckt wurde und nach neueren Erkenntnissen auch eine große Bedeutung in der Regulierung des Zellzyklus besitzt. Der Komplex aus RB und PPARγ rekrutiert HDAC3, wobei die Bindung von RB an HDAC3 wichtig für die Funktion von PPARγ ist. Die Interaktion zwischen allen drei Anteilen reguliert die Aktivität von PPARγ z.B. in der Adipozytendifferenzierung (Fajas et al., 2002; Fajas et al., 2003). HDAC3 bildet zusammen mit N-CoR und TBL1 einen Repressorkomplex, der für die Repression bestimmter Gene durch den Thyroid-hormonrezeptor (TR) benötigt wird. Die Repressorfunktion konnte durch Gabe von TSA unterbunden werden (Ishizuka and Lazar, 2003; Yoon et al., 2003).

HDAC3 ist auf dem Chromosom 5q31 lokalisiert. Etwa die Hälfte der Patienten mit sekundärer AML und Myelodysplastischem Syndrom weist eine Aberration auf Chromosom 5 auf (Randhawa et al., 1998). Auch beim Kolonadenokarzinom und Lungenkarzinom konnte diese Veränderung gefunden werden (Mahlknecht et al., 2000). Bei einigen Erkrankungen kommt es zu einer Deletion im Chromosom 5, wobei HDAC3 beteiligt sein könnte, z.B. bei einem Subtyp des Non-Hodgkin Lymphoms (Wlodarska et al., 1995) und bei Lymphomen (Kroef et al., 1997).

Die Translokation [t(16;21)(p11;q22)] führt zur Bildung des Fusionsproteins AML1-MTG16 (Amann et al., 2001). MTG16 ist ähnlich wie ETO (MTG8) ein transkriptioneller Repressor. MTG16a, eine Proteinisoform von MTG16, wurde kürzlich im Nukleolus nachgewiesen. Die Signalsequenz zur Lokalisation im Nukleolus wurde in der N-terminalen Region des MTG16a-Proteins identifiziert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass MTG16a mit HDAC1 und HDAC3 interagiert. Die Bindung an Korepressorkomplexe mit Histon-Deacetylasen kann zur Pathogenese der t(16;21)-Translokation beitragen (Hoogeveen et al., 2002). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass der Korepressor ETO an die HDACs 1, 2 und 3 bindet (Amann et al., 2001). Auch hier ist damit ein Zusammenhang zwischen der Histon-Deacetylase 3 und Leukämien zu finden.

In einer aktuellen Studie wurde nachgewiesen, dass das Brustkrebstherapeutikum Tamoxifen in Brustgewebe einen antiöstrogenen Effekt ausübt (Liu and Bagchi, 2004). Die molekularen Hintergründe konnten in dieser Untersuchung aufgezeigt werden. Durch die Bindung von Tamoxifen an den Promotor des Östrogenrezeptor werden neben N-CoR auch HDAC3, sowie zusätzlich ein NuRD-Komplex, der HDAC1 und die ATPase Mi-2 besitzt, rekrutiert. Kinetikstudien haben erwiesen, dass der N-CoR-HDAC3-Komplex zeitlich vor dem NuRD-Komplex gebunden wird. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass Tamoxifen nicht nur eine Repression der Transkription am Östrogenrezeptor hervor ruft, sondern dass es durch Tamoxifen zu einer Chromatinmodifizierung bzw. einem Chromatin-Remodeling kommt (Liu and Bagchi, 2004).

1.11 Potenzielle Bindungspartner der Histon-Deacetylase 3

Im Verlauf dieser Arbeit wurden mehrere potenzielle Bindungspartner von HDAC3 detektiert, u.a. p38 beta 2 MAP Kinase (MAP Kinase 11), Rab3a, SCG-10 und MAP Kinase 13. Auf diese Proteine wird im Folgenden näher eingegangen.

1.11.1 Die Familie der MAP Kinasen

1.11.1.1 Der p38 MAP Kinase-Signaltransduktionsweg

MAP Kinasen (MAPK = mitogen activated protein kinase) sind Serin-Threonin-Kinasen und spielen eine große Rolle beim Weg extrazellulär ankommender Signale bis hin zu einer intrazellulären Antwort. Die Kinasen sind Teile von Signalkaskaden, die verschiedenste zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Transformation, Apoptose und Stressantwort beeinflussen (Jiang et al., 1996; Sasaki et al., 2001; Seger and Krebs, 1995; Waskiewicz and Cooper, 1995). Inzwischen sind vier Gruppen von Kinasen kloniert und charakterisiert worden (Kumar et al., 1997):

1) ERK (extracellular regulated kinase) (Davis, 1993)
2) JUNK/SAPK (c-jun-NH_2-terminal kinase/stress activated protein kinase) (Davis, 1994)
3) ERK5 (auch als BMK = Big MAP Kinase-1 bezeichnet) (Lee et al., 1995)
4) p38 (auch CSBP, RK oder HOG1 genannt) (Lee et al., 1994)

Die MAP Kinasen werden danach eingeteilt, auf welche Einflüsse sie reagieren, d.h. durch welche Reize sie aktiviert werden. Die ERKs werden durch mitogene und proliferative Stimuli in ihrer Aktivität gesteigert, während die JNKs und die p38 MAP Kinasen durch Stressreize aktiviert werden. Außerdem gibt es Stimuli, die beide Gruppen aktivieren. Die kürzlich entdeckte ERK5 gehört zwar auf Grund ihrer Sequenz in die ERK-Gruppe, reagiert aber dennoch auf Stressstimuli (Kumar et al., 2003; Kumar et al., 1997). MAP Kinasen werden z.B. durch LPS (Lipopolysaccharid), Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-alpha), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Interleukin 1 (IL-1) aktiviert (Jiang et al., 1996; Kumar et al., 1997).

Vier Mitglieder der p38-Familie sind bereits entdeckt worden:

1) p38 alpha (Lee et al., 1994)
2) p38 beta (Jiang et al., 1996)
3) p38 gamma (Cuenda et al., 1997)
4) p38 delta (Wang et al., 1997)

Von diesen Isoformen zeigt p38 beta eine Präferenz für den Transkriptionsfaktor ATF-2 [activating transcription factor; gehört zur CREB-Familie (cAMP response element binding protein)]. Außerdem gilt MAPKAPK2 (MAP Kinase activated protein kinase 2) als potenzielles Substrat. Bisher ist allerdings nur wenig über weitere Substrate der MAP Kinasen bekannt. ATF-2 selbst hat Histon-Acetyltransferase-Aktivität und ist wichtig für die Regulation von Hämatopoese und Immunantwort (Enslen et al., 1998; Raingeaud et al., 1995; Raingeaud et al., 1996).
MAP Kinasen werden von übergeordneten Kinasen (MAP Kinase Kinasen) phosphoryliert und damit aktiviert. MKK6 (MAP Kinase Kinase 6) aktiviert p38 alpha, p38 beta 2 und p38 gamma, während MKK3 nur p38 alpha und p38 gamma aktiviert (Enslen et al., 1998). Anhand von Studien, die mit MAP Kinase-Inhibitoren durchgeführt wurden, wurde die physiologische Funktion der Kinasen weiter aufgezeigt. Sie sind z.B. für eine LPS-induzierte Bildung von Interleukin 1 und TNF alpha in Monozyten notwendig. Kinase-Hemmstoffe sind Pyridinylimidazol-Abkömmlinge und hemmen die Kinasen in einer mikromolaren Konzentration (Cuenda et al., 1997; Lee et al., 1994). Dabei hemmt z.B. SB203580 die Aktivität von p38 alpha und p38 beta 2, aber nicht die p38 gamma Isoform (Enslen et al., 1998).
Abb. 5 gibt eine Übersicht über die verschiedenen MAP Kinasen sowie die Signaltransduktionswege (Clayton and Mahadevan, 2003; Goedert et al., 1997; Kumar et al., 2003). Die Abb. wurde nach Kumar et al. (2003) modifiziert.

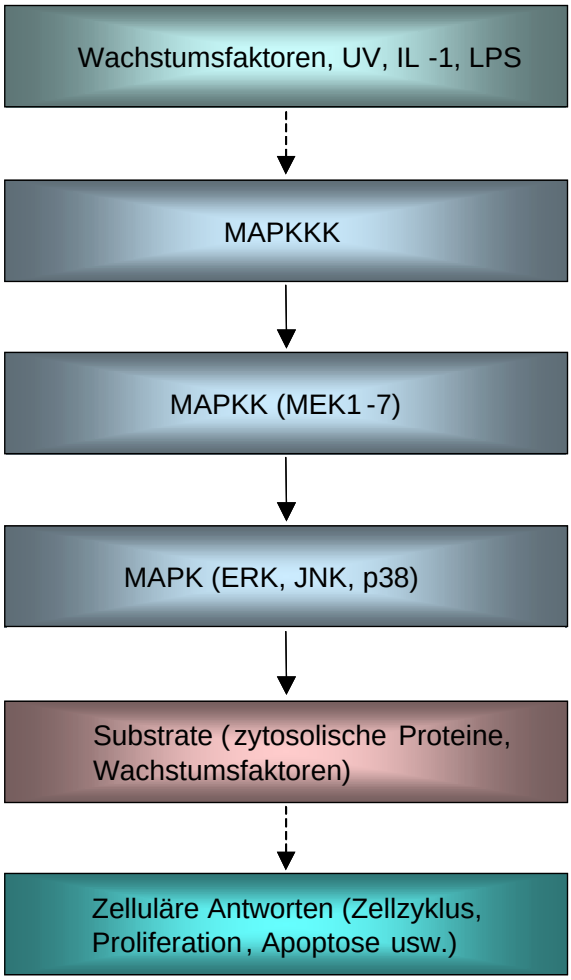


Abbildung 5: Übersicht über die Signaltransduktionswege der verschiedenen Kinasen

Bei der Kinase-Signalkaskade werden MAP Kinase Kinase Kinasen (MAPKKK) durch verschiedene Stimuli (z.B. UV, LPS, IL-1) aktiviert. Die MAPKKK phosphorylieren die MAP Kinase Kinasen (MAPKK), diese wiederum die MAP Kinasen (MAPK). Die MAPK phosphorylieren verschiedene Substrate wie Wachstumsfaktoren, zytosolische Proteine oder Transkriptionsfaktoren, wodurch Antworten in der Zelle wie Proliferation oder Apoptose ausgelöst werden.

Abkürzungen: ERK = extracellular regulated kinase; IL-1 = Interleukin 1; JUNK/SAPK = c-jun-NH_2-terminal kinase/stress activated protein kinase; LPS = Lipopolysaccharid; MAPK = mitogen activated protein kinase; MAPKK = MAP Kinase Kinase; MAPKKK = MAP Kinase Kinase Kinase

1.11.1.2 Die Funktion von MAP Kinasen bei der Histon-Phosphorylierung

Histone werden an spezifischen Serin- und Threoninstellen phosphoryliert, wobei die Phosphorylierung vom Zellzyklus abhängig ist (Sauve et al., 1999; Spencer and Davie, 1999). Besonders Serin^{10} und Serin^{28} sind im Histon H3 potenziell phosphorylierbar. Beide folgen auf dieselbe Aminosäuresequenz (Alanin-Arginin-Lysin) und sind während der Evolution hoch konserviert.

MAP Kinasen besitzen eine Substratspezifität, d.h. sie sind auf die Aminosäure Prolin im Substrat ausgerichtet. Anhand von Untersuchungen mit Peptidsubstraten wurde heraus gefunden, dass im Substrat ein Prolin carboxyterminal im Anschluss an die Phospho-Akzeptorstelle (z.B. die Aminosäure Threonin) vorhanden sein muss, damit die MAP Kinasen binden können. Die Substrate von MAP Kinasen weisen also spezifische Aminosäuresequenzen auf, an die die Kinasen binden, während die MAP Kinasen selbst spezifische Bindungsdomänen besitzen, die komplementär zu der Bindungsstelle im Substrat passen (Kyriakis and Avruch, 2001).

Es werden zwei verschiedene Möglichkeiten der Histon H3-Phosphorylierung unterschieden: Der mitose- und der stimulus-induzierbare Weg.

Die mitotische Phosphorylierung von H3 am Serin^{10} wird durch Aurora Kinasen vermittelt, wie z.B. die Ipl1-Kinase in Hefe und Nematoden sowie die Aurora B- (und A-) Kinase im Menschen (Clayton and Mahadevan, 2003; Crosio et al., 2002; Murnion et al., 2001). Während der Mitose wird fast jedes Histon H3 an Serin^{10} phosphoryliert, was für die richtige Struktur und Trennung des Chromatins wichtig ist (Cheung et al., 2000; Clayton and Mahadevan, 2003).

Die stimulus-induzierte Phosphorylierung von Histon H3 wird durch Wachstumsfaktoren oder Proteinbiosynthese-Inhibitoren hervorgerufen (Clayton and Mahadevan, 2003). Die Phosphorylierung von Histon H3 gilt als wichtig für die Fähigkeit zur Transkription in der frühen Geninduktion („early response genes“). H3 wird schnell phosphoryliert, wenn der Signalweg der MAP Kinasen durch die Gabe von Phorbolestern oder auch durch Wachstumshormone stimuliert wird (Mahadevan et al., 1991). Die Phosphorylierung von H3 findet entweder über den ERK- oder den p38-MAP Kinase-Signalweg statt. Da aber auf das Serin^{10} des Histons H3 kein Prolin folgt, kann Serin^{10} nicht direkt über MAP Kinasen phosphoryliert werden, diese Funktion wird von untergeordneten nukleären Kinasen übernommen (Sassone-Corsi

et al., 1999; Thomson et al., 1999a). Durch die H3-Phosphorylierung an Serin^{10} werden Histon-Acetyltransferasen rekrutiert und dadurch die Acetylierung von Lysin^{14} in demselben aminoterminalen Abschnitt von Histon H3 erhöht. Allerdings haben nicht alle HATs eine erhöhte Affinität zu phosphoryliertem H3, während dieselben HATs phosphoryliertes H3 für eine maximale Bindung an bestimmte Promotoren benötigen können (Clayton and Mahadevan, 2003; Saccani et al., 2002). Außerdem ist ein neu phosphoryliertes H3 innerhalb eines weniger dicht kondensierten Chromatins zu finden, was den Zugang von Transkriptionsfaktoren erhöht (Chadee et al., 1999).

Ein Effekt an Serin^{10} im Histon H3 ist durch die Gabe von LPS (Lipopolysaccharid) schnell induzierbar. Schon nach 10 Minuten (min) ist eine Acetylierung und Phosphorylierung nachweisbar, die nach 30-60 min ihr Maximum erreicht und dann wieder abfällt. Durch die Gabe des spezifischen Kinase-Inhibitors SB202190 kann dieser Effekt auf unter 10% gehemmt werden, was zeigt, dass hier spezifisch p38 MAP Kinasen involviert sind. Die Induktion verschiedener Gene benötigt das Zusammenspiel des Transkriptionsfaktors NFκB und dessen Bindungsstellen in verschiedenen Promotoren. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Gabe von LPS schon nach 10 min ein NFκB-Dimer im Zellkern nachzuweisen ist, was die Transkription von Genen, die für Entzündungs- und Immunreaktionen zuständig sind, erhöht (Saccani et al., 2002).

1.11.2 Rab3a als potenzieller Bindungspartner von HDAC3

Rab3a gehört zur *rab*-Familie, die zur Superfamilie der kleinen G-Proteine gezählt wird (Kishida et al., 1993). Die Familie der Rab-Proteine besteht inzwischen aus 60 Mitgliedern (Pereira-Leal et al., 2003; Takai et al., 2001). Die cDNA von Rab3a wurde 1989 kloniert und zuerst im Gehirn von Ratten nachgewiesen, demgemäß die Rab-Proteine (Rat brain) benannt wurden (Zahraoui et al., 1989). Die *rab*-Familie ist in den intrazellulären Vesikeltransport wie Exozytose oder Endozytose involviert. Rab3a wird in Zellen mit regulierten Sekretionswegen exprimiert, wie Neuronen oder exokrinen und endokrinen Zellen (Kishida et al., 1993). Das Rab3a-Protein ist 25 kDA groß (Burstein et al., 1991) und reguliert Ca^{2+}-abhängig die Exozytose von Neurotransmittern (Kawabe et al., 2003; Kim et al., 2002), und auch von Insulin

(Regazzi et al., 1996; Yaekura et al., 2003). Rab3a wird im Neuron besonders in der Präsynapse hoch exprimiert (Kishida et al., 1993). Für die Freisetzung der Neurotransmitter findet eine Fusion zwischen den synaptischen Vesikeln und der präsynaptischen Plasmamembran statt, wodurch die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt abgegeben werden können (Jahn and Sudhof, 1994; Kim et al., 2002). Die synaptischen Vesikel besitzen neben Rab3a noch verschiedene Proteine (z.B. Synapsin oder Synaptotagmin), Protonenpumpen, sekretorische Carrier-Membranproteine und synaptische Vesikelproteine. Das Zusammenspiel aller Bestandteile trägt bei der Neurosekretion zur Regulierung der Fusion der Vesikel mit den Membranen bei (Bauerfeind et al., 1996; Kim et al., 2002). In den Neuronen bilden Rab3a und sein Effektorprotein Rabphilin-3A einen Komplex, der für das korrekte Verschmelzen von synaptischen Vesikeln mit ihren Zielmembran notwendig ist (Kishida et al., 1993; Rastaldi et al., 2003; Shirataki et al., 1993). Das Rab3a-Protein besitzt zwei ineinander umwandelbare Formen: GDP-Rab3a (GDP = Guanosindiphosphat) ist inaktiv, während GTP-Rab3a (GTP = Guanosintriphosphat) die aktive Form des Proteins darstellt. Die zyklische Aktivierung und Inaktivierung von Rab3a sind essentiell für die Rab3a-Funktion in der Exozytose. GDP-Rab3a wird durch das Rab3a GDP/GTP exchange protein (Rab3a-GEP) zu GTP-Rab3a aktiviert und durch das Rab3a GTPase-activating protein (Rab3a-GAP) zu GDP-Rab3a inaktiviert (Burstein et al., 1991; Kawabe et al., 2003; Kishida et al., 1993). Rab-GTPasen benötigen eine Isoprenyl-Modifikation an ihrem C-Terminus, damit sie die Membranbindung und ihre Funktion im Vesikeltransport wahrnehmen können (Pereira-Leal et al., 2003). Rab3a wird z.B. bei der sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit im zerebralen Kortex und im Zerebellum vermindert exprimiert (Ferrer et al., 2000). *Rab3a* ist auf dem Chromosom 19p13.2 lokalisiert, das bei malignen Erkrankungen wie Akuten Leukämien beteiligt ist (Hromas et al., 2000; Trask et al., 1993).

1.11.3 SCG-10 als potenzieller Bindungspartner von HDAC3

Das SCG-10-Protein (superior cervical ganglion-10) ist 21 kDa groß und ein neuronenspezifisches, membrangebundenes Protein, dessen Expression besonders in der embryonalen und postnatalen Phase hoch ist und das beim Erwachsenen nur

noch in wenigen Regionen des Gehirns nachweisbar ist (Antonsson et al., 1998; Stein et al., 1988). Die SCG-10 cDNA der Ratte wurde 1988 zuerst von Stein (Stein et al., 1988) kloniert, während Okazaki einen großen Teil des Mausgens isolierte (Okazaki et al., 1993). SCG-10 gehört, zusammen mit den Proteinen SCLIP und RB3, zu einer Proteinfamilie, die dem zytosolischen Protein Stathmin sehr ähnlich ist. Stathmin kommt ubiquitär vor, SCG-10 dagegen spezifisch im Nervensystem. Alle dem Stathmin verwandten Proteine besitzen eine Domäne, die der carboxyterminalen Domäne von Stathmin ähnelt, sowie eine regulatorische Region, eine Interaktionsdomäne und eine NH_2-Domäne, die sich bei den Proteinen dieser Familie etwas unterscheidet. Über die N-terminale Region ist SCG-10 in intrazellulären Membranen verankert, dabei ist das Protein über einen Palmitoyl-Rest an zwei Cysteinen an Membranen wie z.B. den Golgi-Apparat gebunden (Gavet et al., 1998; Zhu et al., 1989). Stathmin bindet Tubulin und wird über extrazelluläre Effektoren reguliert bzw. phosphoryliert (Sobel et al., 1989). Außerdem destabilisiert es zelluläre Mikrotubuli (Liedtke et al., 2002). Zusätzlich wurde gezeigt, dass auch SCG-10 die Depolymerisierung von Mikrotubuli über seine Stathmin-ähnliche Domäne induzieren kann (Gavet et al., 1998). Über diese Region ist SCG-10 in der Lage, je zwei alpha/beta-Tubulin-Heterodimere an sich zu binden und eine hemmende Funktion auf die Tubulin-Polymerisierung auszuüben (Charbaut et al., 2001). Die Synthese und der Abbau von Mikrotubuli regulieren Zellbewegung und Zellteilung. Hierbei trägt SCG-10 zum Abbau der Mikrotubuli bei (Riederer et al., 1997). SCG-10 und Stathmin sind *in vitro* ein Substrat für verschiedene Kinasen wie MAP Kinase oder Proteinkinase A (PKA) (Antonsson et al., 1998). Es wurde nachgewiesen, dass SCG-10 *in vivo* phosphoryliert und dephosphoryliert vorkommt, zusätzlich gibt es im neonatalen Rattengehirn zwei Phosphoisoformen. *In vitro* wurden vier potenzielle Phosphorylierungsstellen von SCG-10 entdeckt: Ser^{50} und Ser^{97} gelten als Phosphorylierungsstelle für PKA, Ser^{62} und Ser^{73} können von MAP Kinasen phosphoryliert werden, und $Serin^{73}$ gilt als Phosphorylierungsstelle für cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) (Antonsson et al., 1998). Inzwischen wurden auch potenzielle Phosphorylierungsstellen von SCG-10 *in vivo* nachgewiesen. In diesen Prozess sind JNK/SAPK-Kinasen sowie die p38 alpha MAP Kinase involviert (Neidhart et al., 2001).

1.12 Ziel der Arbeit

Ziel dieses Promotionsvorhabens ist die weiter gehende Charakterisierung des Phänotyps der humanen Histon-Deacetylase 3. Mit der Far Western-Methode soll ein Screening nach potenziellen Interaktionspartnern von HDAC3 auf Proteinebene durchgeführt werden, und die neu identifizierte Bindung soll weiter charakterisiert werden. Eine Beeinflussung möglicher Interaktionspartner durch HDAC3 soll dabei ebenso untersucht werden wie der Einfluss der HDAC3-Bindung auf identifizierte Interaktionspartner auf zellulärer Ebene. Ein weiteres Ziel ist die eukaryotische Aufreinigung des HDAC3-Proteins.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

2.1.1.1 Eukaryotische Zellen

Alle eukaryotischen Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) aus Braunschweig bezogen.

- COS-7 = Affennierenzellen (ursprünglich isoliert aus: African green monkey kidney)
- SF-9 = Insektenzellen (ursprünglich isoliert aus: Insect – fall army worm (Spodoptera frugiperda))
- THP-1 = humane Akute Monozytische Leukämie-Zellen (human acute monocytic leukemia)
- U937 = humane Histiozytom-Zellen (human histiocytic lymphoma)

Erklärung der Termini: Histiozyt = „amöboid bewegliche Zelle des lockeren Bindegewebes; (...); Herkunft aus Blutmonozyten“; Histiozytose = „Vermehrung von Histiozyten im Gewebe bzw. deren Vorkommen im Blut“; (...) (Dierkes, 2000)

2.1.1.2 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme leiten sich vom *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm K12 ab.

- BL21 DE3 (Invitrogen, Karlsruhe)
- DH5α (Invitrogen, Karlsruhe)
- DH10bac (Invitrogen, Karlsruhe)
- XL-1 blue (Stratagene, La Jolla, CA)

2.1.2 Vektoren und Plasmide

- pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe) sowie
- HDAC3-cDNA: pcDNA3.1-HDAC3 (Stephane Emiliani): Beide Plasmide wurden für Transfektionen in eukaryote Zellen verwendet.
- pET32 (Novagen, Madison, WI) bzw. pET32-HDAC3 (AG Dr. Mahlknecht): Das Plasmid pET32-HDAC3 wurde in BL21 DE3-Bakterien transfomiert. Anschließend wurde prokaryotisches HDAC-Protein aus den Bakterien isoliert.
- pGEX-4T-3 (Amersham Biosciences, Freiburg) sowie pGEX-4T-3-HDAC3 (AG Dr. Mahlknecht): Im Plasmid pGEX-4T-3-HDAC3 wurde mittels Mutagenese-PCR an verschiedenen Positionen die Basenabfolge geändert, was bei den Aminosäuren (AS) 3, 31, 49, 66, 137, 198, 266 und 331 zur Bildung von Stopcodons führte. Außerdem führte eine Modifikation der Basenabfolge zur Mutation von Serin zu Alanin an den Positionen AS 54 und 63. Die Plasmide wurden prokaryotisch exprimiert und für Pulldown-Experimente eingesetzt.
- pFastBac-HT-c (Invitrogen, Karlsruhe) bzw. pFastBac-HT-c-HDAC3 (AG Dr. Mahlknecht): Das Plasmid pFastBac-HT-c-HDAC3 wurde für die Transformation von DH10bac-Zellen verwendet, aus denen HDAC3-Virus-DNA isoliert wurde.
- CheckMate™ Mammalian Two Hybrid System (Promega, Mannheim): pACT, pBIND, pG5 Luc sowie GAL4-HDAC3 und VP16-MAPK11
- PathDetect® *in vivo* signal transduction pathway trans-reporting systems (Stratagene, La Jolla, CA): pFA-ATF-2, pFC2-dbd, pFR-luc, pFC-MEK3
- MAP Kinase 11-cDNAs:
    - pcDNA3.1-MAPK11 (GenBank-Nummer U53442): Dr. J. Han (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA): Das Plasmid wurde für Transfektionen verwendet.
    - pQE30NST-MAPK11 (GenBank-Nummer AF031135): RZPD (Referenz-Zentrum des Deutschen Humangenomprojekts), Berlin: Das Plasmid wurde für *in vitro* Translationen eingesetzt.
- pQE30NST-p38 MAP Kinase alpha, gamma und delta (RZPD, Berlin): Diese Plasmide wurden für *in vitro* Translationen verwendet.

- pQE30NST-Rab3a und pQE30NST-SCG-10 (RZPD, Berlin): Diese Plasmide wurden für *in vitro* Translationen eingesetzt.
- pGL2-TNF Promotor Luciferase-cDNA (Prof. Georges Herbein): Dieses Plasmid wurde für Transfektionen mit anschließender Luciferasemessung verwendet.

2.1.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron, Ulm bezogen, mit Aqua bidest. auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt und bei –20°C gelagert. Die Oligonukleotide wurden 1:10 verdünnt und in einer Konzentration von je 10 pmol/µl eingesetzt. Die aufgeführten Sonden für die Real-Time-PCR sind fluoreszenzmarkiert (5'-FAM; 3'-TAMRA, dabei ist FAM der Farbstoff und TAMRA der Quencher) und wurden, ebenfalls 1:10 verdünnt, zusammen mit den dazu spezifischen Primern, für die Real-Time-PCR verwendet. Eine Tabelle mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotiden ist im Anhang aufgeführt (Tabelle 6).

2.1.4 Antikörper

- Anti-HDAC3 (Kaninchen (rabbit) polyklonal), Katalognummer 06-890 (Upstate Biotechnology, über Biomol, Hamburg)
- Anti-p38 MAP Kinase (Ziege (goat) polyklonal), Katalognummer sc-6176 (Santa Cruz, Heidelberg)
- Anti-phospho-p38 MAP Kinase (Kaninchen (rabbit) polyklonal), Katalognummer AB3828 (Chemicon International, Hofheim/Ts.)
- Anti-phospho-ATF-2 (Maus (mouse) monoklonal), Katalognummer IMG-350 (Imgenex über Biocarta, Hamburg)
- Anti-Tubulin (Maus (mouse) monoklonal), Katalognummer T9026 (Sigma, München)
- Ziege-anti-Kaninchen Peroxidase gekoppelt (Dianova, Hamburg)
- Ziege-anti-Maus Peroxidase gekoppelt (Dianova, Hamburg)
- Affe-anti-Ziege Peroxidase gekoppelt (Santa Cruz, Heidelberg)

2.1.5 Kulturlösungen

2.1.5.1 Lösungen der Zellkultur

Alle Lösungen der Zellkultur wurden von Invitrogen bezogen und bei 4°C bzw. –20°C gelagert.

- RPMI
- DMEM
- SF-900II-Medium
- PBS
- Penicillin (-20°C)
- Streptomycin (-20°C)

2.1.5.2 Medien für die Zellkultur

Lösungen der Zellkultur wurden vor der Nutzung mit Supplementen (abhängig von der Zelllinie) versetzt.

- Medium für COS-7-Zellen: DMEM + 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
- Medium für U937- und THP-1-Zellen: RPMI 1640 + 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
- Medium für SF-9-Zellen: SF-900II Medium
- Einfriermedium: 90% FKS (Greiner bio-one, Frickenhausen; bzw. HyClone, South Logan, UT) und 10% DMSO (Fluka – Riedel de Hàen, Buchs, Schweiz)

2.1.5.3 Medien für Bakterien

Bakterien (DH5α, BL21 DE3 und XL1-Blue) wurden in LB-Medium (10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe, 5 g/l NaCl) angezogen. LB bzw. LB-Agar (= LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar) wurden in Aqua bidest. gelöst und anschließend autoklaviert. Das dem Resistenzgen entsprechende Antibiotikum wurde dem Agar nach Abkühlen auf etwa 50°C hinzugefügt. Die Lösung wurde in sterile Petrischalen mit etwa 10 cm Durchmesser gegossen und die Platten bis zur weiteren Verwendung kühl gelagert.

2.1.6 Standardlösungen (Lösungen der Molekularbiologie und Proteinbiochemie)

2.1.6.1 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer, 50x konzentriert

2 M Tris, 100 mM EDTA, Lösung wird mit Eisessig auf pH 8.0 eingestellt

Agarosegelelektrophorese-Probenpuffer, 6x konzentriert

0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerol

2.1.6.2 Far Western-Methode

TBST

20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,5 M NaCl, 0,05% Tween 20

TBST-T

20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,5 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,5% Triton® X-100

2.1.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 0,4% SDS

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl pH 8.8, 0,4% SDS

Laufpuffer 10x

125 mM Tris, 1 M Glycin, 0,5% SDS

Probenpuffer, 2x konzentriert

90 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% Glycerol, 2% SDS, 0,02% Bromphenolblau, 100 mM Dithiothreitol (DTT)

Coomassie-Färbelösung

50% Methanol, 10% Eisessig, 0,05% Bromphenolblau

Fixierlösung

50% Methanol, 10% Eisessig

Entfärbelösung

5% Methanol, 7% Essigsäure

2.1.6.4 Western Blotting

Transferpuffer

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol

Waschpuffer (TBS)

150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.4

Blockierpuffer

3% Bovines Serumalbumin (BSA) in Waschpuffer (TBS)

Puffer zum Entfernen des Primärantikörpers

62.5 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS

2.1.6.5 Puffer für die Proteinaufreinigung aus SF-9-Zellen

Lysepuffer für die Proteinisolierung aus SF-9-Zellen

50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, Puffer wird auf pH 7.0 eingestellt und sterilfiltriert

Waschpuffer

Lysepuffer mit 5 mM Imidazol, Puffer wird auf pH 7.0 eingestellt und sterilfiltriert

Elutionspuffer

Lysepuffer mit 20; 30; 50; 100; 200; 300; 400 oder 500 mM Imidazol, Puffer wird auf pH 7.0 eingestellt und sterilfiltriert

2.1.6.6 Puffer für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-Galactopyranosid)

100 mM IPTG, sterilfiltriert, in Aliquots bei –20°C lichtgeschützt aufbewahrt

GST-Protein-Lysepuffer

50 mM NaCl, 50 mM Hepes, 0,1% Triton® X-100, 5 mM EDTA pH 8.0, Zusatz von Proteaseinhibitor-Cocktail nach Angabe des Herstellers Roche

2.1.6.7 Puffer für die Herstellung von Zellextrakten aus COS-7-, U937- und THP-1-Zellen

Lysepuffer: Passive Lysis Buffer (Promega)

2.1.6.8 Puffer für die Immunpräzipitation

Lysepuffer

50 mM Tris pH 7.5, 120 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5% NP-40

Waschpuffer für Protein G Plus/Protein A-Agarose

PBS/0,5% BSA und Proteaseinhibitor-Cocktail (Zugabe nach Angabe des Herstellers Roche)

2.1.7 Puffer für die Virus-DNA-Isolierung aus DH10bac-Zellen

Lösung 1

15 mM Tris pH 8.5, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase

Lösung 2

0,2 N NaOH, 1% SDS

Lösung 3

3 M KOAc pH 5.5

2.1.8 Transfektionslösungen

2.1.8.1 DEAE

10 mg/ml DEAE in STBS, Lösung sterilfiltrieren

2.1.8.2 STBS

25 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 700 µM $CaCl_2$, 500 µM $MgCl_2$, 600 µM Na_2HPO4, Lösung sterilfiltrieren

2.1.8.3 Puffer für die Elektroporation eukaryoter Zellen

2,25 ml 1 M Sucrose, 2 ml 0,2 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 7.0, 10.75 ml Aqua bidest.

2.1.9 Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien

2.1.9.1 TFB-1

100 mM RbCl, 50 mM $MnCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, 30 mM KOAc, 12% Glycerol, auf pH 5.8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen, Lösung wird sterilfiltriert und kühl gelagert

2.1.9.2 TFB-2

10 mM RbCl, 15 mM $CaCl_2$, 10 mM MOPS pH 6.8, 12% Glycerol, auf pH 5.8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen, Lösung wird sterilfiltriert und kühl gelagert

2.1.10 Puffer für den Kinase Assay (Calbiochem)

2.1.10.1 Kinase Assay-Puffer, 5x konzentriert

5 mg/ml BSA, 150 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$

2.1.10.2 Stop-, Avidin- und Waschlösung

8,0 M Guanidin-Hydrochlorid (Stoplösung), Avidinlösung sowie Waschlösung (in Kinase Assay-Kit enthalten)

2.1.11 Enzyme

- Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt/Main)
- *Taq*-Polymerase (Promega, Mannheim)
- *Pfu*-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA)
- T4-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt/Main)
- RNase (Sigma, München)

2.1.12 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.A. („pro analysis“) Qualität bezogen.

Chemikalie	**Firma**
APS	Roth, Karlsruhe
Acrylamid 4K Lösung 30%	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
BSA	Sigma, München
$CaCl_2$	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie Blue	AppliChem, Darmstadt
DEAE	Amersham Biosciences, Freiburg
DMSO	Fluka – Riedel de Hàen, Buchs, Schweiz
DTT	Sigma, München
EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure/Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Fluka – Riedel de Hàen, Buchs, Schweiz
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Glycerol	Apotheke des Klinikums der JWG-Universität Frankfurt/Main
HCl	Fluka – Riedel de Hàen, Buchs, Schweiz
Hepes	AppliChem, Darmstadt
Imidazol	Fluka – Riedel de Hàen, Buchs, Schweiz
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
KOAc	AppliChem, Darmstadt
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
$MgCl_2$	Merck KGaA, Darmstadt
$MnCl_2$	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Fluka – Riedel de Hàen, Buchs, Schweiz
MOPS	Sigma, München
Na_2HPO_4	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	AppliChem, Darmstadt
NaH_2PO_4	AppliChem, Darmstadt
NaOH	Fluka – Riedel de Hàen, Buchs, Schweiz
NP-40	Fluka – Riedel de Hàen, Buchs, Schweiz

Nickel-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
RbCl	Fluka – Riedel de Hàen, Buchs, Schweiz
SDS	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Fluka – Riedel de Hàen, Buchs, Schweiz
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton® X-100	Sigma, München
TSA	Sigma, München
Tween 20	Bio-Rad, München
Xylencyanol	Sigma, München
β-Mercaptoethanol	Fluka – Riedel de Hàen, Buchs, Schweiz

Die Adressen der Pharmafirmen sind im Anhang in Tabelle 7 aufgeführt.

2.1.13 Verbrauchsmaterialien

- Autoradiographiefilme Kodak X-omat AR (Kodak, Stuttgart)
- Gene Pulser Cuvette, 0,2 cm electrode gap (Bio-Rad, München)
- Einfrierröhrchen (Kryoröhrchen) für die Zellkultur (Nalge Nunc International, Herford, UK)
- Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml und 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
- Eppendorf Standardtips Pipettenspitzen: 0,5-10 µl, 1-200 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
- 3MM Chromatographiefilterpapier Whatman® (Whatman über Fisher Scientific, Schwerte)
- Reaktionsgefäße: Falcon®Röhrchen 2053, 2057 (Falcon über Greiner bio-one, Frickenhausen)
- Pipetten steril verpackt: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Corning, Kaiserslautern)
- Nitrozellulosemembranen (Bio-Rad, München)
- Sterilfilter Steriflips (50 ml) und Stericups (250 und 500 ml) (Millipore, Bedford, MA)
- 96-Lochplatten für die Real-Time-PCR (Applied Biosystems, Darmstadt)

2.1.14 Radiochemikalien

[γ-^{32}P]-ATP (spezifische Aktivität: 2,5 µCi/µl) (Amersham Biosciences, Freiburg)•
[^{35}S]-Methionin (spezifische Aktivität 10 µCi/µl) (Amersham, Biosciences, Freiburg)

2.1.15 Molekularbiologische Reagenzien

- Agarose (Roth, Karlsruhe)
- Ampicillin (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio)
- Big Dye Sequenzierreagenz (Applied Biosystems, Darmstadt)
- CheckMate™ Mammalian Two Hybrid System (Promega, Mannheim)
- Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Mannheim)
- Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe)
- Gelextraction Kit (Qiagen, Hilden)
- GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), mouse (hergestellt in Maus), rekombinant, exprimiert in *E. coli* (Sigma, München)
- IPTG (AppliChem, Darmstadt)
- Kanamycin (Sigma, München)
- Lipopolysaccharid (LPS) aus *E. coli* 026:B6*C (Sigma, München)
- Maxipräparationskit Nucleobond AX (Macherey und Nagel, Düren)
- Minipräparationskit Nucleospin Plasmid (Macherey und Nagel, Düren)
- Nährlösung nach Luria Bertani (Invitrogen, Karlsruhe)
- Oligonukleotide (Thermo Electron, Ulm)
- PathDetect® *in vivo* signal transduction pathway trans-reporting system (Stratagene, La Jolla, CA)
- PCR-Kit (Promega, Mannheim)
- PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Merck KGaA, Darmstadt)
- Platinum® qPCR Supermix UDG (Invitrogen, Karlsruhe)
- Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim)
- Protein G Plus/Protein A-Agarose (Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach)
- Protein Kinase Assay Kit (Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach)

- QuikChange® Site directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA)
- Restriktionsendonukleasen mit Puffern (New England Biolabs, Frankfurt/Main)
- siRNA/siAB™ Assay Kit (Upstate Biotechnology, über Biomol, Hamburg)
- TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System bzw. TNT® SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Mannheim)
- TSR Template Suppression Reagent (Applied Biosystems, Darmstadt)

2.1.16 Geräte

Neben den laborüblichen Geräten kamen folgende Geräte zum Einsatz:

- Autoklav „Varioklav“ (H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim)
- Gene Pulser II Electroporation System (Bio-Rad, München)
- Kühlzentrifuge: Sorvall RC-5B Zentrifuge (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold)
- Luminometer Lumat LB9507 (Berthold Technologies GmbH + CoKG, Bad Wildbad)
- Milliporeanlage (Millipore, Bedford, MA)
- Mini Protean III Vertikal Elektrophorese System (Bio-Rad, München)
- PCR-Maschine „Primus 96“ (MWG-Biotech, Ebersberg)
- Polaroidkamera 44-16 (Polaroid GmbH, Offenbach)
- Real-Time-PCR Gerät („Taqman“) (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Schüttelinkubator „Certomat“ (B. Braun, Melsungen)
- Scintillationszähler (Beckman Instruments, High Wycombe, UK)
- Sequenzierer (Perkin Elmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim)
- Spektrophotometer (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Tischzentrifuge „Mikro 22R“ (Hettich, Tuttlingen)
- Trans Blot SD Semi Dry Transfer Zelle (Bio-Rad, München)
- Überkopfrotierer (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, Iowa)
- Ultraviolettstrahler (Ankersmit, Grand-Brigard, Belgien)
- Zellkultur-Inkubator (Heraeus, Hanau)
- Zellkultur-Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau)
- Zellkultur-Zentrifuge Megafuge 1.0 R (Heraeus, Hanau)

2.1.17 Computerprogramme

- Für die Auswertung der Sequenzierungen wurde das Programm „Chromas“ der Firma Technelysium (Helensvale, Australien) verwendet.
- Die Analyse der Real-Time-PCR wurde mit dem Programm „SDS“ (Sequence Detection System) von Applied Biosystems (Darmstadt) erstellt.
- Für die Analyse des relativen Phosphorylierungsstatus des MAP Kinase-Proteins wurde das Programm „TotalLab“ verwendet.
- Die Suche nach Literatur, Plasmiden („nucleotide“) und Proteinen („protein“) wurde mit dem Programm „PubMed“ durchgeführt, das über NCBI („National Center for Biotechnology Information“) bereit gestellt wird.
  Internetadresse: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
- Die vergleichende Analyse von Nukleotid- und Proteinsequenzen wurde mit dem Programm „BLAST“ erstellt, das ebenfalls über NCBI verfügbar ist.
  Internetadresse: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

2.2 Methoden

Die folgenden Methoden wurden, soweit nicht anders angegeben, in Anlehnung an das Laborhandbuch von (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

2.2.1 Restriktionsverdau

(Plasmid-)DNA wird mit Restriktionsendonukleasen an definierten Stellen geschnitten. Die geschnittene DNA kann auf einem Agarosegel in Anwesenheit von Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Zum Vergleich der Plasmidgröße wurde ein DNA-Marker, der an definierten Stellen geschnitten worden war, mit aufgetragen.

Beispiel für einen Restriktionsansatz:

x µl Plasmid-DNA (z.B. 1 µg)
2 µl 10x Reaktionspuffer
evtl. 1 µl BSA (abhängig vom verwendeten Enzym)
\+ 0,5 µl Enzym (10 oder 20U/µl)
_____
ad 20 µl Aqua bidest.

1 U (Unit) Enzym schneidet 1 µg DNA an der speziellen Erkennungsstelle beim Temperaturoptimum des Enzyms. Der Restriktionsverdau wurde bei 37°C im Wasserbad für 2 Stunden (h) inkubiert (oder über Nacht, abhängig vom Enzym); ein Aliquot wurde als Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.2 Ligation

Bei einer Ligation werden unter Verwendung von Ligasen DNA-Fragmente verbunden. Dabei werden z.B. zwischen einem DNA-Fragment und einem linearisierten Plasmid die Phosphodiesterbindungen zwischen den 3´-Hydoxyl- und den 5´-Phosphatresten der DNA mit einer T4-DNA-Ligase wieder zusammen gefügt. Ein Ligationsansatz besteht aus einem Anteil Vektor und dem drei- bis zehnfachen Überschuss an Insert:

x ng Vektor
3 x ng Insert
2 µl 10x Ligationspuffer (enthält ATP und DTT)
\+ 1 U T4-DNA-Ligase

ad 20 µl Aqua bidest.

Der Ansatz wurde über Nacht für mindestens 16 h bei 16°C im Wasserbad inkubiert, am nächsten Tag wurde ein Teil der Ligation in kompetente Bakterien transformiert.

2.2.3 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

2.2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

E. coli-Zellen sind nur in der Lage, Plasmide aufzunehmen, wenn sie kompetent gemacht wurden. Dies geschieht durch eine Behandlung mit speziellen Salzlösungen, die die Zellmembran der Bakterien durchlässiger machen. Damit wird bei einer Transformation die Anheftung von DNA an die Bakterienzellmembran verbessert. Die Bakterienstammkultur wurde auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C in einem speziellen Bakterienbrutschrank wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde eine Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C und 225 Umdrehungen/Minute (U/min) schütteln gelassen. Anschließend wurden 5 ml der Kultur in 100 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD_{600} (Optische Dichte bei 600 nm) von 0,5 inkubiert. Dann wurden die Bakterien für 5 min bei 2000 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R) und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 15 ml TFB 1-Puffer aufgenommen. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen wieder 5 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 2 ml TFB 2-Puffer resuspendiert. Aliquots von 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3.2 Transformation mit Plasmid-DNA

DNA kann in Bakterien eingebracht und vermehrt werden, wenn die Bakterien vorher kompetent gemacht wurden. Ein 100 µl-Aliquot des *E. coli*-Stammes (z.B. DH5α) wurde auf Eis aufgetaut. 1 µg der zu transformierenden DNA wurde zu den Bakterien pipettiert und der Ansatz 30 min auf Eis stehen gelassen. Nach einer Hitzeschockbehandlung für 2 min bei 42°C wurde die Probe sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium wurde der Ansatz für 1 h auf einem Schüttler bei 225 U/min gemischt. Nach dieser Zeit wurden je 3, 30 und 300 µl auf Agarplatten mit dem Selektivantibiotikum (z.B. Ampicillin oder Kanamycin) ausgestrichen. Bei der Transformation des Plasmids pcDNA3.1 waren die Platten mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt worden, bei der Transformation des Plasmids pFA-ATF-2 mit 50 µg/ml Kanamycin. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C in einem Bakterienbrutschrank inkubiert. Am nächsten Tag konnten einzelne Bakterienkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze oder einem Zahnstocher gepickt und in LB-Medium angeimpft werden.

2.2.3.3 Anlegen einer Übernachtkultur

E. coli lassen sich in einer Übernachtkultur schnell vermehren. Die Bakterien teilen sich etwa alle 20 min. Dabei können in dem antibiotika-haltigen LB-Medium nur die Bakterien überleben, die ein Plasmid mit dem entsprechenden Resistenzgen tragen. Für eine Übernachtkultur wurde eine Bakterienkolonie in antibiotika-haltigem LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 U/min geschüttelt.

2.2.3.4 Sterile Glycerollösung für die Lagerung vom Dauerkulturen

Für eine sterile Glycerollösung, in der Bakterien für mehrere Monate gelagert werden können, wurden 50 ml 85%-Glycerol und 50 ml LB-Medium gemischt, sterilfiltiert und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

2.2.3.5 Glyceroldauerkultur für Bakterien-Stammkulturen

Für eine Langzeitlagerung werden die transformierten Bakterien in einem Gemisch aus Glycerol und LB-Medium aufgenommen und tief gefroren. 300 µl der sterilen

Glycerollösung wurden mit 700 µl der Bakterienkultur vermischt und bei -80°C gelagert.

2.2.3.6 Herstellung von Plasmid-DNA

Minipräparation von Plasmid-DNA

Um kleinere Mengen an Plasmid-DNA (etwa 30 – 50 µg) zu erhalten, wird die Minipräparations-Methode eingesetzt. Dafür wurde der Nucleospin Plasmid-Minipräparationskit der Firma Macherey und Nagel verwendet. Nach der Transformation wurde eine Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium mit Selektivantibiotikum über Nacht inkubiert, am nächsten Tag in Reaktionsgefäße überführt und die Bakterien bei RT abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 250 µl Puffer 1 (Resuspensionspuffer) gelöst, nach Zugabe von 250 µl Puffer 2 (Lysepuffer) für maximal 5 min bei RT inkubiert und nach Zufügen von 300 µl Puffer 3 (Bindungspuffer) für 10 min bei 4°C und 11000 x g (Hettich Tischzentrifuge „Mikro 22R“) zentrifugiert. Der Plasmid-haltige Überstand wurde nun auf die im Kit enthaltene Säule gegeben, für 1 min bei RT zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Nach Waschen mit 750 µl PE-Puffer (Ethanol-haltiger Waschpuffer) und erneuter Zentrifugation wurde die Säule noch einmal für eine Minute bei 11000 x g bei RT zentrifugiert, um das restliche Ethanol des Waschpuffers zu entfernen. Danach wurde die Säule auf ein sauberes Reaktionsgefäß gesetzt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 50 µl Aqua bidest. und anschließender Zentrifugation bei RT von der Säule gelöst. Die DNA wurde bei -20°C gelagert und für Restriktionsverdaus oder für Transfektionen eingesetzt.

Maxipräparation von Plasmid-DNA

Um größere Mengen an Plasmid-DNA (etwa 200 – 500 µg) aus Bakterien isolieren zu können, wird die Maxipräparationsmethode eingesetzt. Dafür wurde der Nucleobond AX-Maxipräparationskit der Firma Macherey und Nagel verwendet. Bakterien wurden mit dem gewünschten Plasmid transformiert und eine Bakterienkolonie am nächsten Tag in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antiobiotikum inokuliert. Dieser Ansatz wurde wieder über Nacht in 200 ml LB-

Medium sowie Selektivantibiotikum auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden nach etwa 18 h bei 5000 x g (Rotor GS-3, Sorvall RC-5B Zentrifuge) für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 12 ml Puffer 1 (Resuspensionspuffer) resuspendiert. Nach Zugabe von 12 ml Puffer 2 (Lysepuffer) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und maximal 5 min bei RT stehen gelassen. Nach der Zugabe von 12 ml Puffer 3 (Bindungspuffer) wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert und danach 40 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde auf eine Säule gegeben, die vorher mit 6 ml Äquilibrierungspuffer versetzt worden war. Der Durchlauf wurde verworfen, die Säule noch zweimal mit 16 ml Waschpuffer gewaschen, dann auf ein sauberes Falcon-Gefäß gesetzt und die DNA mit 15 ml Elutionspuffer (auf 56°C erwärmt) eluiert. Der Durchlauf wurde dann mit 0,7fachem Volumen an Isopropanol 100% (v/v) gemischt und die DNA für 1 h bei 15000 x g (Rotor SS-34, Sorvall RC-5B Zentrifuge) und 4°C durch Zentrifugation gefällt. Der Überstand wurde danach abgesaugt, das erhaltene Pellet mit 10 ml 70%igem Ethanol gewaschen (d.h. mindestens 10 min bei RT stehen gelassen), wieder für 15 min bei 4°C zentrifugiert, und nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in Aqua bidest. aufgenommen. Nach Inkubation über Nacht im Kühlschrank wurde die DNA mit der Phenol-Chloroform-Extraktion von Proteinen und anderen unerwünschten Zusätzen gereinigt.

2.2.3.7 Virus-DNA-Isolierung

Virus-DNA wird aus transformierten DH10bac-Zellen aufgereinigt. Dabei dient die isolierte Virus-DNA für eine Infektion von z.B. der Insektenzelllinie SF-9. DH10bac-Bakterien wurden mit dem Vektor pFastBac-HT-c-HDAC3 transfomiert. Das Plasmid pFastBac-HT-c enstammte dem Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System von Invitrogen, in diesen Vektor wurde HDAC3 einkloniert. Dieses Plasmid wird spezifisch für diese Bakterien genutzt, denn es kodiert außerdem N-terminal für sechs Histidinreste. Aus den transformierten DH10bac-Zellen wurde die Virus-DNA isoliert. Für die Isolierung der HDAC3-Virus-DNA wurde eine Bakterienkolonie in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 10 µg/ml Tetracyclin, 7 µg/ml Gentamycin angeimpft und über Nacht bei 225 U/min inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien pelletiert und in 300 µl Lösung 1 (Resuspensionspuffer) aufgenommen.

Dann wurden 300 µl Lösung 2 (Lysepuffer) zugegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz maximal 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 300 µl Lösung 3 (Neutralisierungspuffer) und der Ansatz wurde 5 bis 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 11000 x g (Hettich Tischzentrifuge „Mikro 22R“) für 10 min bei 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, das schon 800 µl Isopropanol 100% (v/v) enthielt. Nach Vermischen der Lösungen wurde die DNA bei 11000 x g und 4°C für 15 min gefällt. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, 500 µl 70%iger Ethanol zugegeben, das Tube invertiert und wieder 5 min bei 11000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet etwa 10 min an der Luft trocknen gelassen. Nach Zugabe von 40 µl Aqua bidest. hatte sich die Virus-DNA nach etwa 10 min gelöst und war für die Transfektion von SF-9-Zellen einsetzbar.

2.2.4 Aufreinigung von DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Isolierte DNA wird mit der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion von unerwünschten Proteinen befreit. Für diese Methode wird ein Phase-Lock-Gel der Firma Eppendorf eingesetzt. Dieses Gel ist für die Phenolextraktion von Nukleinsäuren sehr gut geeignet. Es dient beim Zentrifugieren als Trennschicht zwischen der wässrigen DNA-haltigen Phase, die sich oben sammelt, und der organischen, Phenol-haltigen Phase, die sich im Boden des Gefäßes anreichert.
Für die Aufreinigung wurde die gelöste DNA in ein Phase-Lock-Gefäß überführt. Dann wurde das gleiche Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1) zugegeben und 5 min bei RT geschüttelt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 4°C und 4000 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R) wurde der Vorgang wiederholt. Der Überstand wurde in ein neues Phase-Lock-Gefäß gegeben und mit dem gleichen Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 24:1) gemischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4000 x g für 10 min und bei 4°C wurde dieser Vorgang ebenfalls wiederholt und der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen gegeben. Hierzu wurde 10% (v/v) Natriumacetat (3 M, pH 5.2) gegeben, dann das 2,5fache des Volumens an eiskaltem, 100%igem Ethanol. Der Ansatz wurde gemischt und bei -80°C für etwa 30 min inkubiert, um die DNA zu fällen. Die DNA wurde für 1 h bei 4000 x g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und

das Pellet mit 5-10 ml 70%igem Ethanol gewaschen, d.h. mindestens 10 min bei RT stehen gelassen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 30 min wurde der Überstand wieder abgesaugt und das Pellet kurz bei RT getrocknet. Danach wurde das Pellet in Aqua bidest. aufgenommen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag war die DNA gelöst und konnte z.B. zur Konzentrationsbestimmung im Fotometer eingesetzt werden.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration wurde in einem Fotometer bei einer Wellenlänge von λ = 260 nm gegen Aqua bidest. in einer Quarzküvette bestimmt. Eine OD_{260} entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA.

2.2.6 Auftrennung von DNA auf einem Agarosegel

DNA kann auf einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und mit Ethidiumbromid, das in Nukleinsäuren interkaliert, ab einer Menge von 5 ng als violette Banden auf dem UV-Schirm sichtbar gemacht werden. Für ein 1%iges Agarosegel wurden 0,5 g Agarose mit 50 ml 1xTAE-Puffer versetzt und aufgekocht. Nach Abkühlung wurden 0,5 µl EtBr (entspricht 50 µg bei einer Konzentration von 100 mg/ml) zugegeben, die Lösung durch Schütteln gemischt und in einen vorbereiteten Träger gegossen. Nach Festwerden der Agarose wurde 1xTAE-Puffer zugegeben, der Kamm entfernt, und das Gel konnte mit den DNA-Proben beladen werden. Die aufzutrennenden DNA-Proben waren vorher mit einem Ladepuffer versetzt worden, der durch den Glycerolanteil die Proben im Gel nach unten sinken lässt. EtBr interkaliert in die DNA und macht diese durch Auflegen auf einen UV-Schirm sichtbar.

2.2.7 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel (Gelextraktion)

Aus einem Agarosegel kann aufgetrennte DNA ausgeschnitten und mit dem Gelextraction Kit der Firma Qiagen aufgereinigt werden. Dabei ist bei der Aufreinigung mit einem Verlust von etwa 50% der ursprünglich aufgetragenen DNA-Menge zu rechnen. Nach Auftrennung einer DNA-Probe auf einem Agarosegel

wurde die DNA-Bande in der gewünschten Größe mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden, abhängig vom Gewicht des Agarosestücks, das Dreifache des Volumens an QG-Puffer (Solubilisierungs- und Bindungspuffer, der Guanidinthiocyanat enthält) zugegeben und der Ansatz bei 50°C für 10 min erwärmt. Nach Auflösung der Agarose wurde die Lösung auf eine im Kit enthaltene Säule gegeben und 1 min bei 11000 x g (Hettich Tischzentrifuge „Mikro 22R“) bei RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, und zu der Säule wurden 500 µl QG-Puffer gegeben und wieder zentrifugiert. Zum Waschen der Säule wurden 750 µl des PE-Puffers (Ethanol-haltiger Waschpuffer) zugegeben und bei RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde wieder verworfen und die Säule noch einmal zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Danach wurden 50 µl Aqua bidest. auf die Säule pipettiert. Der Ansatz wurde mindestens 1 min bei RT inkubiert und dann bei RT für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Das Eluat im neuen Reaktionsgefäß enthielt nun die isolierte DNA, die z.B. für Ligationen eingesetzt werden kann.

2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion sowie Aufreinigung der Reaktionsprodukte

2.2.8.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der PCR werden DNA-Sequenzen vervielfältigt. Hierbei werden aus dem Erststrang mit dNTPs und einer *Taq*-Polymerase sowie dem Einsatz von Vorwärts- und Rückwärtsprimern, die sich komplementär an die DNA anlagern, neue DNA-Stränge gebildet. Für die PCR wurde ein Kit der Firma Promega verwendet.
Beispiel eines PCR-Ansatzes:

1 µg DNA
1 µl Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)
1 µl Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)
1 µl dNTPs (je 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
5 µl 10x Reaktionspuffer
\+ 1 µl *Taq*-Polymerase (1 U/µl)

ad 50 µl Aqua bidest.

Die verwendeten Reaktionszyklen und –zeiten waren abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Die folgende Formel gibt näherungsweise die Schmelztemperatur der benutzten Primer an:

Tm = 59,5°C +0,41x(GC%)-(500/l)
Dabei sind: Tm = Schmelztemperatur des Primers, GC% = Guanin/Cytosin-Anteil in % ausgedrückt, L = Länge des Primers

Die näherungsweise Berechnung der Schmelztemperatur ergibt sich u.a. aus dem Anteil an Guanin- und Cytosin innerhalb der Primer. Je höher der GC-Anteil, desto höher ist die Schmelztemperatur des jeweiligen Oligonukleotids, da die Basen Guanin und Cytosin mit 3 Wasserstoffbrücken verbunden sind, im Gegensatz zu Adenin und Thymin, die nur mit 2 Wasserstoffbrücken verbunden sind und deren Bindung weniger stark ist. Unter diesen Voraussetzungen werden die Primer jeweils so gewählt, dass sie ca. 20-30 Basen lang sind und der GC-Anteil über 50% beträgt. Außerdem sollten die jeweils zusammen gehörenden Primer (vorwärts und rückwärts) eine gleiche bzw. ähnliche Schmelztemperatur haben. Eine Hybridisierung der Primer sollte ebenfalls vermieden werden (Palindrom) (Coyne et al., 2001).

Für die Temperaturoptima der jeweiligen Primer (als Beispiel seien Primer mit einer Schmelztemperatur von 73°C gewählt) ergaben sich folgende Inkubationszeiten in der PCR-Maschine:
Die PCR-Reaktion wird mit zwei unspezifische Zyklen gestartet: 1 min bei 95°C (bei diesem Schritt werden die Doppelstränge der DNA gelöst, sog. „Denaturierung“), anschließend 30 Sekunden (sec) bei 68°C (dies dient der Anlagerung der Primer an die DNA, „Annealing“), und am Schluss wird 1 min bei 72°C inkubiert (bei diesem Schritt werden die neuen DNA-Stränge gebildet, „Elongation“).
Nach diesen zwei eher unspezifischen Zyklen, denn die Temperatur für die Anheftung der Primer liegt niedriger als bei den folgenden Zyklen, werden 20-30 Zyklen mit folgenden Bedingungen gestartet: Zuerst wird 1 min bei 95°C inkubiert („Denaturierung“), dann 30 sec bei 71°C zur Anlagerung der Primer an die DNA („Annealing“), und die Synthese der neuen DNA wird 1 min bei 72°C durchgeführt.

2.2.8.2 Aufreinigung des PCR-Produktes mit dem PCR-Purification-Kit

Mit dem PCR-Purification-Kit der Firma Qiagen werden z.B. Reaktionsprodukte einer PCR oder synthetisierte cDNAs aufgereinigt. Hierbei werden PCR-Produkte und cDNAs in einer Größe von 100 bp bis 10 kb von unerwünschten Enzymresten, die nachfolgende Reaktionen stören können, befreit. Dies geschieht durch die Bindung der des PCR-Produktes bzw. der cDNA an eine Silicagel-Membran und spätere Elution des gewünschten Produktes von der Membran, während unerwünschte Zusatzprodukte durch Waschen abgetrennt werden. Zu der abgeschlossenen PCR- oder cDNA-Reaktion wurde das Fünffache des Volumens an PB-Puffer (Bindungspuffer) gegeben und gemischt. Die Lösung wurde auf die im Kit enthaltene Säule gegeben und bei RT 1 min bei 11000 x g (Hettich Tischzentrifuge „Mikro 22R“) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und 750 µl PE-Puffer (Ethanol-haltiger Waschpuffer) auf die Säule pipettiert. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Durchlaufs wurde noch einmal zur Entfernung des restlichen Waschpuffers 1 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 50 µl Aqua bidest. wurde die Säule mindestens 1 min bei RT inkubiert, dann auf ein sauberes Reaktionsgefäß gesetzt und bei RT für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Das Eluat enthielt nun das aufgereinigte PCR- oder cDNA-Reaktionsprodukt.

2.2.9 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese sowie Real-Time-PCR

2.2.9.1 RNA-Isolierung

RNA lässt sich aus Zellen mit dem RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen) aufreinigen. Eukaryote Zellen wurden von der Zellkulturflasche gelöst und abgeschabt. Die Zellen wurden anschließend pelletiert und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 350 µl RLT-Puffer (Lysepuffer) aufgenommen, wenn die Zellzahl kleiner als 5×10^6 Zellen war. Bei höheren Zellzahlen wurde mit 700 µl RLT-Puffer resuspendiert. Der Ansatz wurde dann zum Aufschließen der Probe auf eine Qia-Shredder-Säule gegeben und 2 min bei 11000 x g (Hettich Tischzentrifuge „Mikro 22R“) bei RT zentrifugiert. Zu dem Durchlauf wurde das gleiche Volumen an 70%igem Ethanol gegeben, vorsichtig gemischt, und alles auf eine RNeasy-Säule gegeben. Dann wurde 15 sec bei 11000 x g und RT zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Nach

Zugabe von 700 µl RW1-Puffer wurde zentrifugiert wie oben, anschließend wurden 500 µl RPE-Puffer (Ethanol-haltiger Waschpuffer) zugegeben und erst 15 sec, dann nach erneuter Zugabe des RPE-Puffers 2 min zentrifugiert. Um den Restethanol zu entfernen, wurde die Säule auf ein neues Auffanggefäß gesetzt und noch einmal bei 11000 x g für 1 min bei RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 50 µl Aqua bidest. auf die Säule und Inkubation für 1 min auf einem neuen Auffanggefäß, enthielt der Durchlauf nach erneuter Zentrifugation das RNA-haltige Eluat. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

2.2.9.2 cDNA-Synthese

RNA wird unter Verwendung des SUPERSCRIPT™ II, RNase H- Reverse Transcriptase Kits (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Zuerst wurden maximal 10 µg RNA in einem Volumen von 25 µl in der PCR-Maschine für 10 min bei 70°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 25 µl eines Mastermixes zugegeben, der folgende Reagenzien enthielt:

10 µl 5x Puffer
5 µl DTT (0,1 M)
0,25 µl $p(DN)_6$ („Random hexamer“, 8 µg/µl)
2 µl dNTPs (10 mM)
2 µl RNA-Guard (40 U/µl)
3,25 µl Aqua bidest.
\+ 2,5 µl Superscript Reverse Transkriptase (200 U/µl)

25 µl Mastermix

Nach Zugabe des Mastermixes zu der abgekühlten RNA wird das Gemisch zunächst für 10 min bei 25°C, dann für 45 min bei 42°C und am Schluss für 3 min bei 99°C inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde mit dem PCR-Purification-Kit aufgereinigt und anschließend in der Real-Time-PCR eingesetzt. Aufgereinigte cDNA wurde zur längeren Aufbewahrung bei –20°C gelagert.

2.2.9.3 Real-Time-PCR

Bei der Real-Time-PCR können kleinste Mengen eines Nukleinsäuretemplates mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde nachgewiesen werden. Dazu wurde der Platinum® qPCR Supermix UDG der Firma Invitrogen verwendet. Pro Real-Time-PCR-Ansatz wurden 5 µl aufgereinigte cDNA eingesetzt. Hierbei ergab sich folgender Reaktionsansatz:

5 µl cDNA
0,5 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
0,5 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
0,5 µl Sonde (10 µM)
\+ 12,5 µl Platinum® qPCR Supermix UDG
_____
ad 25 µl Aqua bidest.

Der Platinum® qPCR Supermix UDG hat folgende Bestandteile: 60U/ml Platinum® *Taq* DNA Polymerase, 40 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 mM KCl, 6 mM $MgCl_2$, 400 µM dGTP, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dUTP, 40 U/ml UDG, sowie Stabilisatoren.

Die Proben wurden in spezielle 96-Lochplatten pipettiert und diese anschließend in das Real-Time-PCR-Gerät gestellt. Die eingestellten Parameter für den Verlauf der Real-Time-PCR waren eine anfängliche Inkubation über 2 min bei 50°C sowie eine Denaturierung für 10 min bei 95°C. Abschließend wurden die Ansätze über 45 Zyklen jeweils mit einer Denaturierung 95°C für 15 sec sowie ein Anlagern der Primer und Verlängern der cDNAs bei 60°C für 1 min im Wechsel inkubiert. Die Reaktionsprodukte der abgeschlossenen Real-Time-PCR wurden anschließend mit dem Programm „SDS“ (Sequence Detection System) der Firma Applied Biosystems ausgewertet.

2.2.10 Mutagenese-PCR

Durch den QuikChange® Site directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene können an beliebigen Stellen einer DNA Mutationen bzw. Stopcodons eingebracht werden. Dazu werden zwei Primer, die die gewünschte Mutation einer Base enthalten und komplementär zur verwendeten DNA sind, in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Nach der PCR wurde der Original-DNA-Strang (der im Gegensatz zum neu synthetisierten Strang methyliert ist) mit dem Enzym *Dpn*I verdaut. Der alte Strang wurde durch den Verdau entfernt, und der neue Doppelstrang, der meist die Mutation enthielt, wurde in Bakterien transformiert. Nach einer Minipräparation von Plasmid-DNA wurde die DNA sequenziert, um die eingebrachte Mutation zu verifizieren. Für diese PCR wurde das Plasmid pGEX-4T-3-HDAC3 aus der Arbeitsgruppe Dr. Mahlknecht verwendet. Es wurden verschiedene Mutationen und Trunkationen in das Plasmid eingebracht (siehe unter Vektoren und Plasmide), nachfolgend die GST-Fusionsproteine isoliert und Pulldown-Assays durchgeführt. Die für die Mutagenese-PCR verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 6).

2.2.11 *In vitro* Transkription/Translation

Für die *in vitro* Transkription/Translation wurde das TNT® T7 (bzw. SP6) Quick Coupled Transcription/Translation System der Firma Promega verwendet. Mit einem im Kit enthaltenen Kaninchen-Retikoluzytenlysat kann „*in vitro*“ ein Protein aus DNA hergestellt werden. Dabei kann das Protein auch radioaktiv markiert werden. Für diesen radioaktiven Ansatz wurden 1 µg DNA mit 40 µl des Retikoluzytenlysats und 2 µl von [^{35}S]-Methionin (Stocklösung 10 µCi/µl) sowie Aqua bidest. zum Endvolumen von 50 µl für 90 min bei 30°C inkubiert. Die Probe kann danach entweder für einen Pulldown (s. 2.2.12) verwendet oder für eine längere Lagerzeit bei -20°C eingefroren werden. Der Vorteil der *in vitro* Translation/Tranksriptions-Methode besteht darin, dass in kurzer Zeit ein Protein hergestellt werden kann, ohne dass Bakterien oder eukaryote Zellen mit DNA transformiert bzw. transfiziert werden müssen. Außerdem muss das gewünschte Protein nicht erst anschließend aus den Zellen isoliert werden. Eine nicht-radioaktive *in vitro* Transkription/Translation wurde mit den Plasmiden pcDNA3.1, pcDNA3.1-HDAC3 sowie pcDNA3.1-MAPK11 für den Kinase Assay angesetzt (s. 2.2.14).

2.2.12 Pulldown

Mit der Pulldown-Methode können Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Dabei wird ein aufgereinigtes Protein aus Prokaryoten (z.B. HDAC3) mit einem eukaryotisch hergestellten, aber mit [^{35}S]-Methionin radioaktiv markiertem Protein (z.B. MAP Kinase 11) inkubiert. Das eukaryotisch synthetisierte Protein (z.B. MAP Kinase 11) war durch eine *in vitro* Transkription/Translation (s. 2.2.11) mit einem Kaninchen-Retikoluzytenlysat hergestellt und dabei mit [^{35}S]-Methionin radioaktiv markiert worden. Das prokaryotisch isolierte Protein wurde aus BL21 DE3-Bakterien isoliert, die vorher mit den Vektoren pGEX-4T-3 bzw. pGEX-4T-3-HDAC3 transfomiert worden waren.

Die isolierten Proteine besitzen eine GST- (Glutathion-S-Transferase-) Domäne. Aus den mit pGEX-4T-3 transfomierten BL21 DE3 wurde das Protein GST isoliert; aus den mit pGEX-4T-3-HDAC3 transfomierten Bakterien wurde das Fusionsprotein GST-HDAC3 isoliert. Eine im Pulldown nachgewiesene Bindung gibt einen ersten Hinweis auf eine mögliche (prokaryotische) Protein-Protein-Interaktion, die dann in weiter gehenden Versuchen bestätigt werden kann.

Beim Pulldown wurden 5 µl (etwa 100 µg) eines eukaryotisch *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten Proteins mit etwa 20 µg eines prokaryotisch aufgereinigten Proteins, das an GST-Sepharose gebunden war, inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit 200 µl PBS verdünnt und in einem Reaktionsgefäß über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfrotierer inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch bei 4°C für 2 min bei 2800 x g zentrifugiert, dreimal mit Puffer (PBS oder E1A) gewaschen, der Überstand verworfen und die restliche Sepharose für 3 min bei 95°C mit zweifach konzentriertem SDS-Ladepuffer aufgekocht, um die gebundenen Proteine durch die Hitzeeinwirkung von der Sepharose zu lösen. Die von der Sepharose gelösten Proteine wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, das Gel später getrocknet und ein Film aufgelegt. Nach 1-7 Tagen konnte der Film entwickelt und eine mögliche Bindung der Proteine durch eine Schwärzung des Films, verursacht durch die eingesetzte Radioaktivität, detektiert werden. Wenn ein *in vitro* translatiertes Protein an das sepharosegebundene Protein (HDAC3) gebunden hatte, war dies nach dem Waschen durch eine Schwärzung des Films sichtbar. Fand keine Bindung statt, war der Film „leer“, denn die Sepharose selbst war nicht radioaktiv. Als Kontrolle für den

Pulldown wurde jeweils 1 µl (etwa 20 µg) des radioaktiven *in vitro* translatierten Proteins mit auf das SDS-Gel aufgetragen.

2.2.13 Sequenzierungs-PCR, Aufreinigung der Reaktionsprodukte und anschließende Sequenzierung

2.2.13.1 Sequenzierungs-PCR

Bei einer Sequenzierungs-PCR werden zusätzlich zu unmarkierten Basen fluoreszenzmarkierte Basen an eine Plasmid-DNA angehängt. Dadurch entstehen zu einem gewissen Anteil Reaktionsprodukte, die in hohem Maße fluoreszenzmarkierte Basen besitzen, wobei mit der späteren Sequenzierung die Basenabfolge der Plasmid-DNA ermittelt werden kann. Die Sequenzierungs-PCR-Reaktion wurde mit dem Abi Prism® Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Applied Biosystems gemäß des angegebenen Protokolls durchgeführt. Für eine Sequenzierungs-PCR wurden zu 3 µl DNA (entspricht etwa 1-2 µg DNA) noch 2 µl Primer (10 pmol/µl) und 4 µl Big Dye Mix [*AmpliTaq*® DNA Polymerase; dNTPs; Tris-HCl pH 9.0; $MgCl_2$; fluoreszenzmarkierte ddNTPs mit Rhodaminfarbstoffen] gegeben und mit Aqua bidest. zum Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. In der PCR-Maschine wurden 35 Zyklen mit je 30 sec bei 95°C (Denaturierung), 15 sec bei 50°C (Anheften des Primers) sowie 4 min bei 60°C (Elongation) laufen gelassen. Die Proben wurden dann mit dem Centrisep-Kit (s. 2.2.13.2) aufgereinigt.

2.2.13.2 Aufreinigung der Seqenzierungs-PCR Reaktionsprodukte

Ein Sequenzierungs-PCR-Reaktionsprodukt wird mit Centrisep-Säulen der Firma Princeton Separation aufgereinigt. Hierbei werden überschüssige Salze und Primer entfernt, die die spätere Sequenzierreaktion beeinträchtigen könnten. Zunächst wurde die Säule für die Aufreinigung der Probe vorbereitet. Dazu wurden 800 µl steriles Aqua bidest. zu der Säule pipettiert und der Ansatz gemischt. Dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen mehr enthalten waren. Das entstehende Gel wurde mindestens für 1 h bei RT inkubiert, dann wurden Deckel und Boden der Säule entfernt. Nach Abtropfen des Aqua bidest. wurde die Säule bei 2800 x g (Hettich Tischzentrifuge „Mikro 22R“) für 2 min bei RT zentrifugiert und der Durchlauf

verworfen. Dann wurde das Seqenzierungs-PCR-Reaktionsprodukt auf die Säule gegeben, ohne das Gel zu berühren, die Säule auf ein sauberes Gefäß gesetzt und wieder bei 2800 x g für 2 min bei RT zentrifugiert. Das Eluat beinhaltete nun das aufgereinigte PCR-Produkt, das für den Sequenzer vorbereitet werden konnte.

2.2.13.3 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung wird die Basenabfolge einer DNA ermittelt. Die mit der Centrisep-Säule aufgereinigten Proben wurden für die Sequenzierreaktion im ABI PRISM® Sequencer (PE Applied Biosystems) vorbereitet. Für die Sequenzierreaktion wurden 5 µl TSR (Template Suppression Reagent) und 15 µl der aufgereinigten Sequenzierungs-PCR-Probe gemischt und bei 95°C für 5 min erhitzt. Nach Abkühlung auf Eis waren die Proben nun fertig für die Sequenzierung. Bei der Sequenzierung wird die Probe, die die fluoreszenzmarkierten Basen enthält, mit einem Laser angeregt und die Basenabfolge detektiert. Die fertigen Sequenzierungsreaktionen konnten dann als Datei geladen und mit dem Programm „Chromas“ ausgewertet werden.

2.2.14 Kinase Assay (radioaktiv)

Für die Analyse des Phosphorylierungsstatus eines Proteins wird der Protein Kinase Assay Kit der Firma Calbiochem verwendet. Dabei wird der Einbau von [γ-^{32}P]-ATP durch eine Proteinkinase in ein Peptidsubstrat mit einem β-Szintillationszähler gemessen. Der vorliegende Kinase Assay Kit basiert auf einer Reaktion, bei der eine Proteinkinase zusammen mit einem biotinylierten Peptidsubtrat sowie [γ-^{32}P]-ATP inkubiert wird. Dabei überträgt die Proteinkinase die gamma-Phosphatgruppe von [γ-^{32}P]-ATP auf das Peptidsubstrat. Nach dieser Reaktion wird Avidin dazu gegeben, das an das biotinylierte ^{32}P-Peptidprodukt bindet. Der Ansatz wird auf eine mit Streptavidin beschichtete Säule gegeben, wobei dann mittels Zentrifugation das freie [γ-^{32}P-ATP] entfernt wird und nur der Reaktionsprodukt-Avidin-Komplex auf der Membran der Säule gebunden bleibt. Nach mehreren Waschschritten wird die auf der Membran verbliebene Radioaktivität in einem β-Szintillationszählers gemessen.
Durch *in vitro* Transkription/Translation mit nicht-radioaktivem Methionin wurden

Proteine aus den Vektoren pcDNA3.1 und pcDNA3.1-HDAC3 hergestellt. Das Plasmid pcDNA3.1-MAPK11 wurde unter Zugabe von biotinylierter tRNA transkribiert und translatiert und stellte das Peptidsubstrat dar. Diese drei Proteine wurden in verschiedenen Kombinationen für den Kinase Assay eingesetzt. Je 10 µl (etwa 40 µg) des *in vitro* translatierten Proteins wurde mit 2,5 µl 0,15 mM ATP, 5 µl 5x Kinase-Puffer und 2,5 µl [γ-^{32}P]-ATP (spezifische Aktivität 2,5 µCi/µl) versetzt und in verschiedenen Kombinationen für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Stoplösung und 8 µl Avidin unterbrochen. Die Ansätze wurden auf eine Säule gegeben, die eine streptavidinbeschichtete Membran enthielt. Nach drei Waschschritten wurde die Menge des auf der Membran verbleibenden ^{32}P-ATPs in einem β-Szintillationszähler gemessen.

2.2.15 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.15.1 Kultivierung der Zellen

Arbeiten in der Zellkultur werden unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle Medien werden vorher auf 37°C erwärmt. Zum Medium zugegebenes FKS (fötales Kälberserum) wurde vorher bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert. COS-7-, U937- und THP-1-Zellen wurden bei 37°C und 5% (v/v) CO_2 im Brutschrank inkubiert, SF-9-Zellen bei 30°C im Brutschrank ohne CO_2-Zusatz. COS-7-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FKS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert, U937- und THP-1-Zellen in RPMI 1640-Medium mit den oben genannten Zusätzen. SF-9-Zellen wurden in SF-900-II-Medium ohne Zusätze (außer bei der Transfektion) inkubiert.

2.2.15.2 Kryokonservierung/Kryokultivierung

Eukaryote Zellen können in einem DMSO-haltigen Puffer für längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Für die Kryokonservierung wurden Suspensionszelllen oder gelöste adhärente Zellen bei 900 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R) für 5 min bei RT zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 1 ml Einfriermedium (90% FKS, 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen verteilt und für 48 h bei -80°C inkubiert. Für eine längere Lagerung wurden die Zellen in flüssigen

Stickstoff überführt.
Aus dem Stickstofftank entnommene Röhrchen wurden kurz in 70%igem Ethanol desinfiziert, dann die Zellen mit Medium resuspendiert und bei RT für 5 min bei 900 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R) zentrifugiert. Das Pellet wurde noch einmal mit Medium gewaschen und wieder zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit etwa 5 ml Medium aufgenommen, in eine Zellkulturflasche überführt und im Inkubator gelagert.

2.2.15.3 Inkubation von U937-Zellen mit GM-CSF bzw. LPS

Um U937-Zellen zu Makrophagen ausdifferenzieren zu lassen, werden sie für 24 h mit GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierungsfaktor) stimuliert. Die spätere Inkubation mit Lipopolysaccharid (LPS) soll die Expression der MAP Kinasen stimulieren (Jiang et al., 1996; Kumar et al., 1997). Es sollte außerdem ein möglicher Einfluss von HDAC3 auf die Expression der MAP Kinasen untersucht werden.
Dafür wurden die U937-Zellen entweder mit dem Leervektor pcDNA3.1 oder mit dem Plasmid pcDNA3.1-HDAC3 transfiziert. Die Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion für weitere 24 h mit 10 ng/ml GM-CSF stimuliert. Die U937-Zellen wurden dann mit 1 µg/ml LPS (verdünnt in RPMI) inkubiert, und nach 7, 14 und 21 min wurden aus den Zellen unter Verwendung des Passive Lysis Buffers Lysate hergestellt. Als Kontrolle wurden U937-Zellen ohne LPS inkubiert. Diese Proben wurden mittels einer Western Blot-Analyse z.B. auf die Expression von phosphoryliertem p38 MAP Kinase-Protein oder auf die Expression von phosphoryliertem ATF-2-Protein hin untersucht. Es soll geprüft werden, ob die Überexpression von HDAC3 einen Einfluss auf die der Kinase nachgeschalteten Signalwege hat.

2.2.15.4 Transfektion nach der Elektroporationsmethode

Bei der Elektroporation wird mit elektrischer Spannung DNA in eukaryote Zellen (meist Suspensionszellen) eingebracht. Für eine kurzfristige Einbringung von DNA (transiente Transfektion) wird die DNA nicht mit einem Restriktionsenzym behandelt. Die Zellen wurden vor der Elektroporation mit PBS gewaschen und dann in Elektroporationspuffer aufgenommen. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl in eine Elektroporationsküvette pipettiert und die Küvette anschließend in

das Elektroporationsgerät gestellt. Nach Einstellung der Parameter auf 200 V sowie „High Capacity“ wurden die Zellen in der Küvette elektroporiert und die Zellen in der Küvette danach auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Küvette steril mit Medium aufgefüllt und die Zellen danach rasch in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurde der Überstand entfernt und das Pellet wieder mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in Zellkulturflaschen überführt. Nach 24 h bis 48 h erfolgte bei der transienten Transfektion eine Proteinisolierung.

2.2.15.5 Transfektion nach der DEAE-Dextran-Methode

DNA kann durch eine Transfektion mit einer DEAE-Lösung in eukaryote Zellen (meist adhärente Zellen) eingebracht werden. DEAE ist ein Polymer, das an DNA bindet. Der DEAE-Dextran-DNA-Komplex bindet über elektrostatische Anziehung an die negativ geladene Zelloberfläche und wandert dann in die Zelle (Yang and Yang, 1997). 5-10 Millionen COS-7-Zellen wurden pro Ansatz verwendet. Die COS-7-Zellen wurden vor der Transfektion je einmal in PBS und STBS gewaschen. Pro Transfektion wurden je 450 µg DEAE eingesetzt. Die DNA wurde in einem Gefäß in STBS verdünnt. Das Gesamtvolumen betrug hierbei 500 µl, die Gesamtmenge an DNA war in allen Ansätzen gleich (10 µg). Für die Transfektion wurde das DEAE mit der STBS/DNA-Lösung vermischt, zu den COS-7-Zellen geben, und die Zellen darin resuspendiert. Die Ansätze wurden für 1 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und alle 15 min resuspendiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit STBS auf 10 ml aufgefüllt, gemischt und bei RT abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm^2 verteilt. Nach 48 h im Brutschrank wurde eine Lyse mit dem Passive Lysis Buffer (Promega) vorgenommen. Die erhaltenen Proteine wurden entweder für Immunpräzipitationen eingesetzt oder die Lysate wurden im Luciferase-Assay gemessen.

2.2.15.6 Mammalian Two Hybrid System

Mit dem CheckMate™ Mammalian Two Hybrid System der Firma Promega können Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* untersucht und nachgewiesen werden. Dafür werden COS-7-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden (in diesem Fall pBIND-HDAC3 und pACT-MAPK11 sowie Kontrollplasmiden) zusammen mit dem Plasmid

pG5luc (die COS-7-Zellen bilden nach der Transfektion das Luciferase-Protein) transfiziert und nach 48 h die Proteine isoliert. Dabei ist die MAPK11 mit der VP16-Aktivierungsdomäne fusioniert (pACT-MAPK11) und HDAC3 wird als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (pBIND-HDAC3) transfiziert. Der Vektor pBIND besitzt die Hefe-GAL4-Bindungsdomäne „oberhalb“ einer mehrfachen Klonierungsstelle (multiple cloning site) und bildet ein GAL4-Fusionsprotein aus. Die VP16-Aktivierungsdomäne weist die VP16-Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus auf, die ebenfalls „oberhalb“ einer mehrfachen Klonierungsstelle zu finden ist.
Eine Interaktion der exprimierten Proteine HDAC3 und MAP Kinase führt zu einer erhöhten Expression des Reportergens *Firefly Luciferase*. Die Lysate werden anschließend im Luciferase-Assay eingesetzt und im Luminometer gemessen.

2.2.15.7 Luciferase-Assay

Luciferase-Assay im Anschluss an eine Transfektion mit Plasmiden des Mammalian Two Hybrid-Assays

Mit dem Luciferase-Assay kann eine intrazelluläre Signalweiterleitung oder auch der Einfluss von Transkriptionsfaktoren bei einer Signalkaskade untersucht werden. COS-7-Zellen wurden mit der DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Aus den Zellen wurden nach 48 h mit dem Passive Lysis Buffer Lysate hergestellt. Kommt es nach Transfektion von zwei Plasmiden (im Falle des Mammalian Two Hybrid System mit den in dieser Arbeit verwendeten pACT-MAPK11 und pBIND-HDAC3) sowie dem Plasmid pG5-luc, das die Information für das *Firefly Luciferase*-Gen trägt, zu einer Bindung zwischen MAPK11 und HDAC3, wird die Expression der Firefly Luciferase erhöht. Hierbei wird unter Zugabe des Luciferase-Assay Reagents II durch die Firefly Luciferase aus „Beetle Luciferin“ anschließend „Oxyluciferin“ gebildet, was dann im Luminometer gemessen werden kann. Als interner Abgleich wurde der Proteingehalt der Lysate mit dem Proteinbestimmungsassay (Bio-Rad) gemessen und die Expression der Firefly Luciferase auf den Proteingehalt bezogen („normalisiert“).

Luciferase-Assay im Anschluss an eine Transfektion mit Plasmiden des Path Detect Systems

Der Luciferase-Assay wurde auch beim PathDetect® *in vivo* signal transduction pathway trans-reporting system eingesetzt. Hiermit können Signaltransduktionswege näher untersucht werden. Die jeweiligen Plasmide wurden ebenfalls in COS-7-Zellen transfiziert und die Lysate auf ihre *Firefly Luciferase*-Genexpression im Luminometer untersucht.

2.2.15.8 Transfektion des HDAC3-siRNA/siAB™ Assay Kits

Mit dem HDAC3-siRNA/siAB™ Assay Kit von Upstate Biotechnology werden siRNAs in Zellen transfiziert, wobei die siRNA die Expression von HDAC3 unterdrücken kann (siRNA = small interfering RNA). siRNAs sind 21-23 Basenpaare groß und werden als Doppelstrang synthetisiert. Diese siRNAs können posttranslational zur Unterdrückung der Expression der Gene führen, gegen die sie gerichtet sind. Dieser Prozess wird RNA-„Störung“ genannt (engl. RNAi = Abk. für RNA interference) (Holen et al., 2002; Tuschl, 2001). Der HDAC3-siRNA/siAB™ Assay Kit wurde mit der DEAE-Dextran-Methode in COS-7-Zellen transfiziert, für U937-Zellen wurde Elektroporation angewandt. Nach 48 h wurden Lysate aus den Zellen hergestellt und diese im Western Blot auf ihre HDAC3-Expression untersucht. Als Negativkontrolle wurde eine unspezifische siRNA eingesetzt, während die HDAC3-siRNA spezifisch gegen HDAC3 gerichtet war. Der Effekt einer HDAC3-Hemmung wurde auch im PathDetect-Experiment untersucht.

2.2.15.9 Transfektion von SF-9-Zellen

SF-9-Zellen werden mit kationischen Lipiden (Cellfectin-Reagenz der Firma Invitrogen) transfiziert. Hierzu wurden die SF-9-Zellen zentrifugiert, mit Medium gewaschen und auf eine 6-Lochplatte ausgesät (etwa 1 Million Zellen pro Loch). Die Anheftungszeit der Zellen betrug 2 h bei 27°C. In einem sterilen Gefäß wurden 5 µl der HDAC3-Virus-DNA (s. 2.2.3.7) sowie 100 µl vom SF-9-Medium gemischt, in einem anderen Reaktionsgefäß wurden 5 µl Cellfectin-Reagenz und 100 µl SF-9-Medium inkubiert. Beide Ansätze wurden gemischt, den Zellen wurde das

verbrauchte Medium entzogen und durch frisches Medium ersetzt, dann wurde der Virus-DNA/Cellfectin-Mix in 800 µl SF-9-Medium gelöst und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 5 h bei 27°C inkubiert, danach wurde das Medium abgesaugt und durch SF-9-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin ersetzt. Dieser Ansatz wurde 48 h im Brutschrank inkubiert, dann der Überstand abgenommen, filtriert und für eine erneute Infektion auf neue SF-9-Zellen gegeben. Dieser Ansatz wurde für 72 h stehen gelassen und der Überstand nach dieser Zeit wieder abgenommen. Der Überstand wurde anschließend filtriert und war für eine neue Infektion einsetzbar. Die infizierten SF-9-Zellen wurden anschließend lysiert, und die HDAC3-Proteinexpression wurde nach der Aufreinigung in einer Western Blot-Analyse untersucht.

2.2.15.10 Immunpräzipitation

Mit einer Immunpräzipitation können Proteininteraktionen *in vivo* untersucht und nachgewiesen werden. Dabei kann z.B. in COS-7-Zellen eine Bindung von endogen gebildeten Proteinen (ohne vorherige Transfektion mit Plasmiden) gezeigt werden, oder auch eine Interaktion von Proteinen, die nach einer Transfektion mit Plasmiden synthetisiert wurden. Die Immunpräzipitation wurde mit Lysaten aus COS-7-Zellen mit oder ohne Transfektion sowie mit U937-Zellen mit Transfektion durchgeführt. 48 h nach der Transfektion (mit den Plasmiden pcDNA3.1-HDAC3 und pcDNA3.1-MAP Kinase 11) wurden die Zellen lysiert und die Lysate mit Protein G Plus/Protein A-Agarose, die dreimal mit einer Lösung aus PBS/0,5% BSA und Proteaseinhibitoren gewaschen worden war, für 1 h bei 4°C inkubiert („Preclear“). Die Mischung wurde danach für 30 sec bei 10000 x g (Hettich Tischzentrifuge „Mikro 22R“) bei RT zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 1-5 µg eines Antikörpers inkubiert (in diesem Fall je ein Ansatz mit anti-HDAC3-Antikörper und ein Ansatz mit anti-MAPK11-Antikörper). Dies wurde über Nacht bei 4°C auf dem Rotierer gemischt und am nächsten Tag für 5 h mit neuer, gewaschener Protein G Plus/Protein A-Agarose bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugieren und dreimaligem Waschen wurde die restliche Agarose mit Ladepuffer aufgekocht und die von der Agarose gelösten Proteine auf ein SDS-Gel aufgetragen. Wurde die Immunpräzipitation mit dem HDAC3-Antikörper durchgeführt, erfolgte der Western Blot mit dem MAPK11-Antikörper, und umgekehrt.

2.2.16 Expression rekombinanter Proteine

2.2.16.1 Proteinisolierung aus prokaryotischen Zellen

Proteine können in Bakterien exprimiert und später in größeren Mengen isoliert werden. Für die Expression rekombinanter Proteine wurde der *E. coli*-Stamm BL21 DE3 verwendet. Dafür wurde die gewünschte DNA (hier HDAC3) durch Restriktionsverdau und Ligation in den Vektor pGEX-4T-3 eingebracht. Die Bakterien wurden mit dem Plasmid transfomiert, am nächsten Tag wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze in 20 ml LB-Medium mit 10 µg/ml Ampicillin über Nacht inokuliert. Am folgenden Tag wurden etwa 10 ml dieses Ansatzes in 200 ml neues LB-Medium mit Ampicillin gegeben und bei 225 U/min und bei 30°C bis zu einer OD_{600} von etwa 0,5 geschüttelt. Danach erfolgte die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 M) für 4-5 h. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 5 ml E1A-Puffer, dem ein Proteaseinhibitor-Cocktail der Firma Roche zugesetzt worden war, aufgenommen. Die Zellen wurden nach der Resuspendierung mit Ultraschall aufgeschlossen und zwischenzeitlich weiter auf Eis gekühlt. Der Zellaufschluss wurde dann in 50 ml-Röhrchen überführt und bei 12000 x g (Rotor SS-34, Sorvall RC-5B Zentrifuge) für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 1 ml GST-Sepharose, die mit E1A und Proteaseinhibitoren äquilibriert worden war, gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfrotierer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sepharose bei 500 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R) für 2 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Sepharose noch dreimal mit E1A-Puffer ohne Tritonzugabe gewaschen. Die Sepharose, die nun das GST-Fusionsprotein enthielt, wurde bei 4°C gelagert.

2.2.16.2 Proteinisolierung aus eukaryotischen Zellen

Bei der Proteinisolierung aus eukaryotischen Zellen ist die Proteinausbeute häufig geringer als aus prokaryotischen Zellen. Durch die Aufreinigung eines rekombinanten Proteins aus Bakterien sind andere Synthesebedingungen gegeben als in eukaryoten Zellen. Bakterien können keine posttranslationale Modifizierung eines gebildeten Proteins durchführen, d.h. bakteriell aufgereinigte Proteine werden nicht glykosyliert und sind dadurch z.B. weniger löslich. Dadurch verändert sich auch die

Sekundärstruktur des isolierten Proteins (Baneyx, 1999; Miesfeld, 2001; Zhang et al., 2000).

Proteinisolierung aus COS-7-, U937- und THP-1-Zellen

Die Proteinisolierung aus COS-7-, U937- und THP-1-Zellen erfolgte mit dem Passive Lysis Buffer der Firma Promega. Aus transfizierten COS-7-Zellen wurde nach 24 oder 48 h mit dem Passive Lysis Buffer Proteine isoliert. Die adhärenten COS-7-Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und für 10 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Medium aufgenommen, resuspendiert und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei RT und 900 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R) wurde das Pellet mit PBS gewaschen und resuspendiert, nochmals zentrifugiert, und das gewaschene Pellet in Passive Lysis Buffer, der 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt worden war, lysiert.
U937- und THP-1-Zellen wurden als Suspensionszellen ohne Zugabe von Trypsin pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und das Pellet dann mit Passive Lysis Buffer versetzt. Hierbei wurde das Pellet resuspendiert, für 15 min auf Eis gelagert und alle 5 min gemischt. Danach wurden die Zellextrakte für 15 min bei 11000 x g (Hettich Tischzentrifuge „Mikro 22R“) und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Lysate wurden z.B. für Western Blot oder Immunpräzipitationen eingesetzt. Eine Langzeitlagerung der Lysate erfolgt bei -80°C.

Proteinisolierung aus SF-9 Insektenzellen

Aus infizierten SF-9-Insektenzellen wird mit dieser Methode ein rekombinantes Protein isoliert, das über die Bindung an eine Matrix aufgereinigt und später eluiert werden kann. DH10bac Bakterien wurden mit dem Plasmid pFastBac-HT-c-HDAC3, das N-terminal für sechs Histidinreste kodiert, transformiert und anschließend HDAC3-Virus-DNA isoliert. Der Vektor pFastBac-HT-c entstammte dem Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System von Invitrogen, in diesen Vektor wurde HDAC3 eingebracht. Mit der isolierten HDAC3-Virus-DNA wurden SF-9-Zellen infiziert, die 72 h nach der Infektion mit einem Zellschaber geerntet wurden. Das in den SF9-Zellen gebildete HDAC3-Protein bildet N-terminal sechs Histidinreste aus, über die das

Protein an eine Matrix gebunden werden kann. Als Bindungsmatrix wird Nickel-NTA-Agarose (NTA = Nitrilotriacetic acid) der Firma Qiagen verwendet. Ni-NTA ist ein Chelatbildner und besitzt ein zentrales Ni^{2+}-Ion, von dessen sechs Bindungsstellen vier mit NTA besetzt sind, während die restlichen zwei Bindungsstellen für die Anlagerung eines Proteins mit Histidinresten genutzt werden können.

Nach der Zentrifugation der SF-9-Zellen bei 900 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R) für 5 min bei 4°C wurde der Überstand sterilfiltriert und konnte für weitere Infektionen eingesetzt werden. Das Zellpellet wurde mit Lysepuffer resuspendiert, für 15 min auf Eis stehen gelassen und anschließend für 15 min bei 4°C und 4000 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 1 ml Ni-NTA-Agarose gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfrotierer inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz auf eine 5 ml-Säule gegeben und der Durchlauf aufgefangen (der Durchlauf entspricht dem Lysat). Waschpuffer (pH 7) mit Imidazol-konzentrationen von 5 und 10 mM Imidazol sowie Elutionspuffer (20, 30, 50 und 100 mM Imidazol) wurden in aufsteigender Konzentration zu der Säule gegeben. Ab einer Imidazolkonzentration von 50 mM konnte das Protein (HDAC3) von der Matrix eluiert werden. Die erhaltenen Eluate wurden mittels einer Western Blot-Analyse auf ihre HDAC3-Expression überprüft. Dazu wurden je 10 µl Eluat auf ein SDS-Gel aufgetragen und das Protein nach dem Blotten auf Nitrozellulosemembranen mit einem HDAC3-Antikörper detektiert. Nicht verwendete Zellpellets wurden bei –20°C gelagert, die sterilfiltrierten Überstände bei 4°C.

Die folgende Abb. 6 zeigt eine Übersicht über die Unterschiede zwischen pro- und eukaryotischer Proteinaufreinigung.

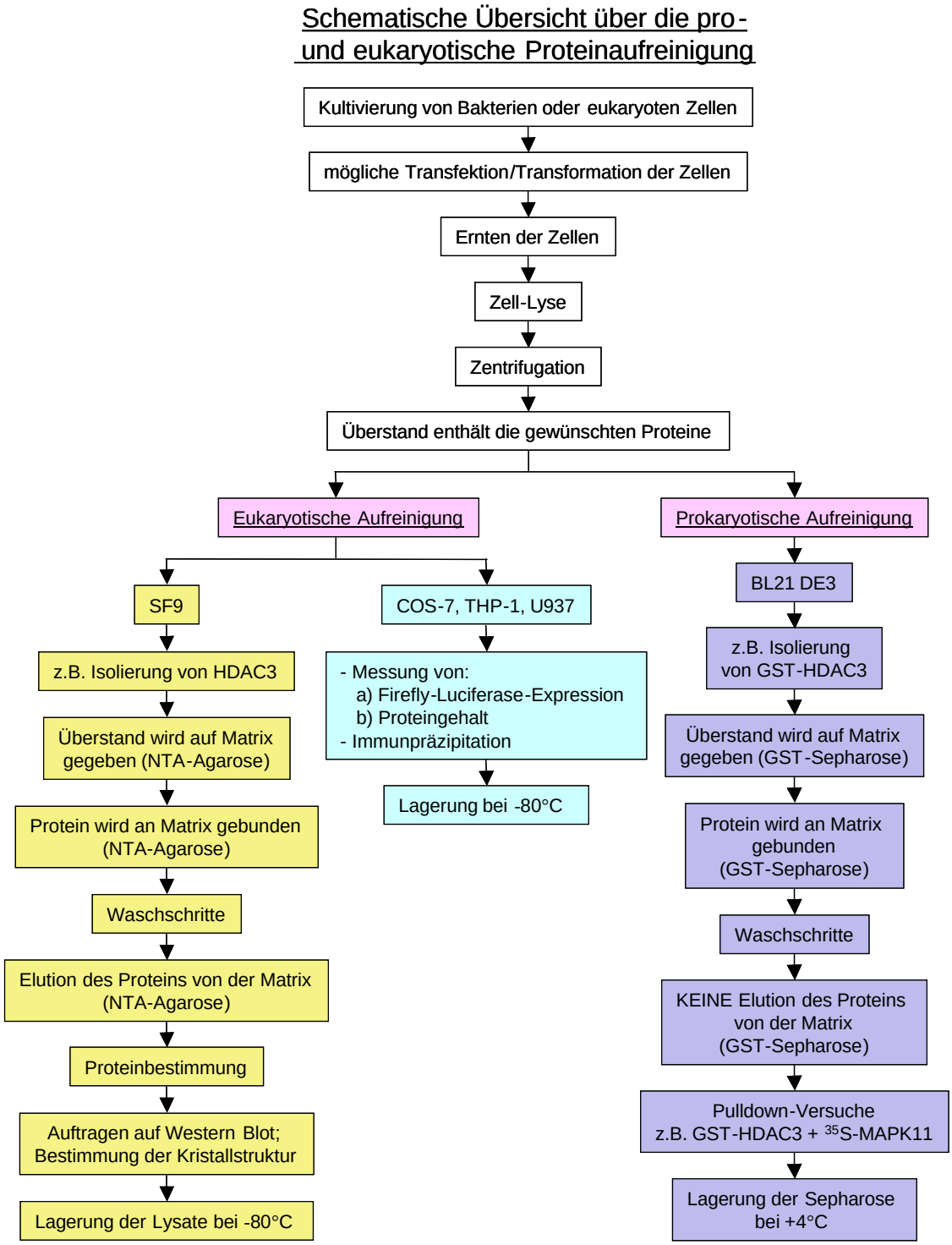


Abbildung 6: Übersicht über die pro- und eukaryotische Proteinaufreinigung

2.2.17 Biochemische und immunologische Methoden

2.2.17.1 Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt eines Lysates wird bestimmt, um z.B. einen Vergleich zur Firefly Luciferaseexpression ziehen zu können oder um gleiche Proteinmengen auf ein SDS-Gel auftragen zu können. Für die Quantifizierung von Proteinen wird der Protein-Detection Kit von Bio-Rad verwendet. Hierzu wird eine Eichkurve mit BSA oder Immunglobulin als Standard in Konzentrationen von 0,1 mg/ml bis 0,8 mg/ml erstellt. Die Proben wurden 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Zu den verdünnten Proben oder zu der Eichlösung wurden 500 µl Puffer A sowie 10 µl Puffer S gegeben. Dazu wurden 4 ml von Puffer B pipettiert und der Ansatz für 15 min bei RT stehen gelassen. Die Konzentration der Proteine wurde im Abgleich zur Eichkurve bei einer Wellenlänge von λ = 750 nm fotometrisch bestimmt.

2.2.17.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine auf einem Gel vertikal nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Hierzu wurde das Mini Protean III Vertikal Elektrophorese System von Bio-Rad verwendet. Es wurden 10% Acrylamid-Trenngele mit 2.7% N,N-Bisacrylamid und 4% Acrylamid-Sammelgele mit 0.11% N,N-Bisacrylamid kurz vor dem Verbrauch gegossen. Die Proben wurden mit zweifach konzentriertem Ladepuffer für 5 min gekocht, auf Eis abgekühlt und in die Geltaschen pipettiert. Gleichzeitig wurde ein Größenmarker in eine separate Spur mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für etwa 75 min, bis eine Auftrennung der Proben gegeben war.

2.2.17.3 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Für die Anfärbung von aufgetrennten Proteinen auf einem SDS-Gel wird das Gel für 5-10 min mit Fixierlösung inkubiert und danach für 30 min mit Coomassie-Lösung bei RT gefärbt. Der Hintergrund wurde anschließend mit Entfärbelösung entfärbt. Die Gele wurden danach bei 80°C für 30 min getrocknet.

2.2.17.4 Western Blot

Bei einem Western Blot werden Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit einem spezifisch an das Protein bindenden Antikörper detektiert. Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden mittels einer *Semidry*-Blot-Apparatur auf Nitrozellulosemembranen überführt. Das SDS-Gel wurde nach der Proteinauftrennung für 5 min in Transferpuffer inkubiert und dann auf eine ebenfalls mit Transferpuffer getränkte Nitrozellulose gegeben. Anschließend wurden Gel und Nitrozellulose zusammen mit zwei passend zugeschnittenen Chromatographie-filterpapieren (ebenfalls in Transferpuffer getränkt) entsprechend der Polung der *Semidry*-Blot-Apparatur zusammen gesetzt, wie Abb. 7 zeigt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose erfolgte pro SDS-Gel für 1 h bei 200 mA konstanter Stromstärke.

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Western Blot-Aufbaus

Die Membran wurde nach dem Blotten für 1 h in Blockierpuffer inkubiert, danach wurde der erste Antikörper (1:1000 verdünnt in Blockierpuffer) auf die Membran gegeben und über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für 10 min wurde der Sekundärantikörper (Peroxidase gekoppelter Antikörper), 1:10000 verdünnt in Blockierpuffer, auf die Membran gegeben. Nach drei weiteren Waschschritten wurde die Membran kurz getrocknet, mit dem Chemilumineszenz-system ECL® („enhanced chemiluminescence system“) inkubiert und die Proteinbanden durch Filmauflegen sichtbar gemacht.
Um den ersten Antikörper zu entfernen, wurde die Membran bei 56°C mit einer Lösung zum Entfernen des Primärantikörpers für 1 h inkubiert und war danach für weitere Analysen von Proteinen wieder verwendbar.

2.2.17.5 Far Western-Methode

Prokaryotische Protein-Protein-Interaktionen können mit der Far Western-Methode nachgewiesen werden. Dabei werden „high density protein filter arrays“ verwendet. Diese Membranen werden vom RZPD (Referenz-Zentrum des Deutschen Humangenomprojekts) zur Verfügung gestellt. Die Membranen enthalten mehrere Tausend Klone von Bakterien, die je doppelt auf die Membran aufgetragen sind. Kommt es nach Inkubation der Membran mit einem Protein „A“ (z.B. HDAC3) zu einer Interaktion mit Proteinen der Membran, so kann man diese Bindung mit einem spezifischen Anti-Protein „A“-Antikörper (anti-HDAC3) auf der Membran detektieren.
Die Membranen wurden für die Far Western-Methode auf einem mit Ethanol getränkten Whatmanpapier gelagert und dann in TBST-T-Puffer inkubiert. Die Oberfläche wurde vorsichtig abgewischt, um eine Lyse der Bakterien zu gewährleisten, und die Membranen dann weiter in TBST-T gelagert. Nach zwei Waschschritten in TBS wurden die Membranen in TBST-Puffer mit 3% BSA für 1 h geblockt, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, wieder mit TBST gewaschen und anschließend mit dem gewünschten Protein (hier HDAC3) bei 4°C inkubiert. Für die Aufreinigung von rekombinantem HDAC3-Protein waren BL21 DE3-Bakterien mit dem Vektor pET32-HDAC3 transformiert worden. Die Far Western-Membran wurde über Nacht mit etwa 1,5 mg HDAC3-Protein inkubiert. Nach Waschen mit TBST wurde die Membran für mindestens 1 h mit einem anti-HDAC3-Antikörper geschüttelt, gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach drei Waschschritten wurde die Membran mit ECL® („enhanced chemiluminescence system“) inkubiert und ein Film aufgelegt. Mit Hilfe der X- und Y-Koordinaten konnte das an HDAC3 gebundene Protein zugeordnet und die dazu gehörige cDNA beim RZPD bestellt werden (Mahlknecht et al., 2001). Diese Methode erlaubt ein schnelles Screening für potenzielle Protein-Protein-Interaktionen.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von HDAC3-Interaktionspartnern

HDAC3 liegt in der Zelle in Multiproteinkomplexen vor. Bisher wurden verschiedene Proteine, auch Nicht-Histonproteine, als Bindungspartner von HDAC3 identifiziert. HDAC3 interagiert mit Transkriptionsfaktoren wie GATA-2 (Ozawa et al., 2001) und RelA (eine Untereinheit des Zellkernfaktors NFκB) (Chen et al., 2001). Außerdem kann HDAC3 Homodimere und -trimere bilden (Yang et al., 2002), und HDAC3 bindet an das Hitzeschockprotein 70 (Johnson et al., 2002).
Welche anderen Proteine mit HDAC3 interagieren, sollte weiter untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden nach Vorarbeiten von Dr. Frank Landgraf und PD Dr. Ulrich Mahlknecht vier neue Bindungspartner von HDAC3 identifiziert: MAP Kinase 11, Rab3a, SCG-10 und MAP Kinase 13. Die Interaktion von HDAC3 mit der MAP Kinase 11 konnte näher charakterisiert und ein Einfluss von HDAC3 auf den MAP Kinase-Signaltransduktionsweg nachgewiesen werden.

3.2 Untersuchungen zur Interaktion von p38 beta 2 MAP Kinase (MAPK11) und HDAC3

3.2.1 Nachweis der Bindung zwischen der MAPK11 und HDAC3 mittels Far Western-Methode

Mit der Far Western-Analyse (Mahlknecht et al., 2001) wurde die MAP Kinase 11 (mitogenaktivierte Proteinkinase 11) nach Vorarbeiten von Dr. Frank Landgraf und PD Dr. Ulrich Mahlknecht in Screening-Versuchen als Bindungspartner von HDAC3 detektiert. Diese Interaktion wurde in dieser Arbeit in weiter gehenden Experimenten bestätigt. Die nicht-radioaktive Far Western-Methode (s. 2.2.17.5) ist für ein schnelles Screening nach potenziellen Interaktionspartnern auf Proteinebene sehr gut geeignet und kann innerhalb weniger Tage durchgeführt werden. Daher wurde diese Methode eingesetzt, um nach möglichen Bindungspartnern von HDAC3 zu suchen. Abb. 8 zeigt den Teil der Far Western-Membran, in dem die Interaktion von HDAC3 und der MAP Kinase 11 nachgewiesen wurde.

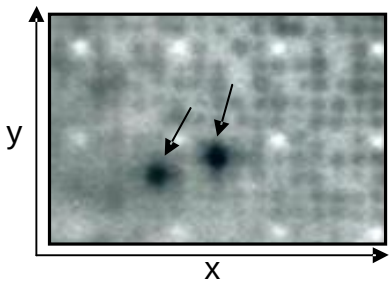


Abbildung 8: Nachweis der Bindung von HDAC3 an die MAPK11 mit der Far Western-Methode

Ein vom RZPD bezogener „high density protein filter array“ wurde mit etwa 1,5 mg bakteriellem HDAC3-Protein inkubiert. An der Membran gebundenes HDAC3 wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Durch Auflegen eines Films wurde die Bindung von HDAC3 an zwei Proteine auf der Membran (Pfeile) sichtbar gemacht. Durch Auswertung der X- und Y-Koordinaten (weiße Punkte auf der Membran) konnte die MAP Kinase 11 als Bindungspartner von HDAC3 identifiziert werden.

Abkürzungen: HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; MAPK11 = MAP Kinase 11

3.2.2 Untersuchung der Bindung von HDAC3 und MAPK11 durch Pulldown-Experimente

Um die Interaktion von HDAC3 und MAPK11 zu bestätigen, wurden Pulldown-Experimente (s. 2.2.12) angeschlossen. Die „Volle-Länge“-cDNA des Plasmids pcDNA3.1-MAP Kinase 11 (Accession Nr. U53442) mit 1119 Basenpaaren (bp) wurde *in vitro* transkribiert und translatiert. Das erhaltene Protein bestand aus 373 Aminosäuren (AS). Das vom RZPD bezogene Plasmid pQE30NST-MAP Kinase 11 (Accession Nr. AF031135) kodierte für eine am N-Terminus verkürzte Form der Kinase und besaß 561 bp. Das aus der cDNA transkribierte und translatierte Protein bestand aus 187 AS. Beide radioaktiv markierten *in vitro* translatierten Proteine wurden jeweils in separaten Pulldown-Experimenten eingesetzt. Es zeigte sich, dass sowohl die „Volle-Länge“-MAP Kinase (ohne Abb.) als auch die am N-Terminus trunkierte Form der MAP Kinase 11 (Abb. 9) in der Lage war, HDAC3 zu binden. Dieses *in vitro* translatierte, am N-Terminus verkürzte Protein wurde für alle weiteren Pulldown-Versuche verwendet. Frühere Pulldown-Analysen mit HDAC3 und der trunkierten MAP Kinase 11, durchgeführt von Dr. Frank Landgraf und PD Dr. Ulrich

Mahlknecht, konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Abb. 9 zeigt in Spur 1 den Input [etwa 20 µg *in vitro* translatiertes, [^{35}S]-markiertes (am N-Terminus verkürztes) MAPK11-Protein] sowie in Spur 2 den Pulldown von [^{35}S]-MAPK11 mit dem GST-Protein. Es ist keine Bindung der beiden Proteine aneinander zu beobachten. Spur 3 präsentiert den Pulldown des [^{35}S]-MAPK11-Proteins mit dem GST-HDAC3-Protein. Hier fand eine Bindung der Proteine aneinander statt, wie die Schwärzung des Films analog zu Spur 1 (Input) darstellt. Die Doppelbande zeigt die phosphorylierte bzw. nicht-phosphorylierte Form der MAP Kinase.

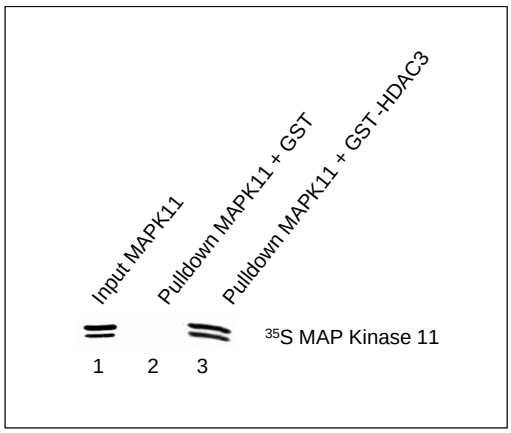


Abbildung 9: Pulldown-Experiment mit dem Nachweis der Bindung von radioaktiver MAPK11 an das HDAC3-Protein

Für die Pulldown-Versuche wurden etwa 20 µg der Proteine GST bzw. GST-HDAC3 zusammen mit etwa 100 µg radioaktiv markiertem MAPK11-Protein über Nacht inkubiert. Die Ansätze wurden gewaschen, erhitzt, und die von der Sepharose gelösten Proteine auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Trocknung des Gels wurde ein Röntgenfilm aufgelegt, der nach einer Woche entwickelt wurde.

Die Abb. zeigt die Schwärzung eines Röntgenfilms durch die *in vitro* translatierte, mit [^{35}S]-Methionin markierte MAPK11 (am N-Terminus verkürzt). In Spur 1 sind etwa 20 µg (1µl) des radioaktiv markierten MAPK11-Protein als Input aufgetragen. Spur 2 präsentiert den Pulldown zwischen dem [^{35}S]-MAPK11-Protein und dem Kontrollprotein (GST-Fusionsprotein), hier fand keine Bindung statt. Spur 3 zeigt die positive Bindung zwischen dem [^{35}S]-MAPK11-Protein und dem an GST-Sepharose gebundenen HDAC3-Protein. In Spur 2 und 3 wurden jeweils etwa 30 µg der von der GST-Sepharose gelösten Proteine aufgetragen. Die Doppelbande des Proteins zeigt die phosphorylierte bzw. nicht-phosphorylierte Form der MAP Kinase.

Abkürzungen: HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; MAPK11 = MAP Kinase 11

3.2.3 Untersuchungen zur Interaktionsdomäne im HDAC3-Protein anhand von Mutationsstudien

HDAC3 besitzt mehrere funktionelle Domänen und weist im C-Terminus einen Bereich auf, der für die Deacetylierung von Proteinen verantwortlich ist (AS 401-428). N-terminal ist zwischen den Aminosäuren 1 und 122 eine Oligomerisierungsdomäne zu finden (Yang et al., 2002). Anhand der erzielten Pulldown-Ergebnisse sollte nun untersucht werden, in welchem Bereich des HDAC3-Proteins die Interaktion mit der MAP Kinase 11 stattfindet. Zu diesem Zweck wurden Mutagenese-PCRs durchgeführt (s. 2.2.10) und im Plasmid pGEX-4T-3-HDAC3 an verschiedenen Positionen die Basenabfolge geändert. Dies führte in separaten Ansätzen in verschiedenen Bereichen des HDAC3-Proteins zur Ausbildung von Stopcodons.
Außerdem wurde an den Positionen AS 54 und AS 63 separat je eine Modifikation in der Basenabfolge eingebracht, was zur Mutation der Aminosäure Serin zur AS Alanin führte. Damit sollte getestet werden, ob Mutationen dieser potenziellen Phosphorylierungsstellen im HDAC3-Protein einen Einfluss auf die Bindung mit der MAP Kinase 11 besitzen. Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden mit radioaktiv markierter MAPK11 in Pulldown-Versuchen (s. 2.2.12) eingesetzt. Nach Auswertung des Röntgenfilms konnte der Bereich der Interaktion von MAPK11 und HDAC3 auf wenige Aminosäuren im HDAC3-Protein eingegrenzt werden. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abb. 10 dargestellt. Sie weisen darauf hin, dass die N-terminale Domäne von HDAC3 an MAPK11 bindet. Der Bereich der Bindung von MAPK11 an HDAC3 konnte hierbei zwischen Aminosäure 31 und 49 im HDAC3-Protein nachgewiesen werden. Ferner wurde gezeigt, dass eine Mutation im HDAC3-Protein von Serin zu Alanin in den Aminosäurepositionen 54 und 63 keinen Einfluss auf die Bindung der MAPK11 an HDAC3 hat.

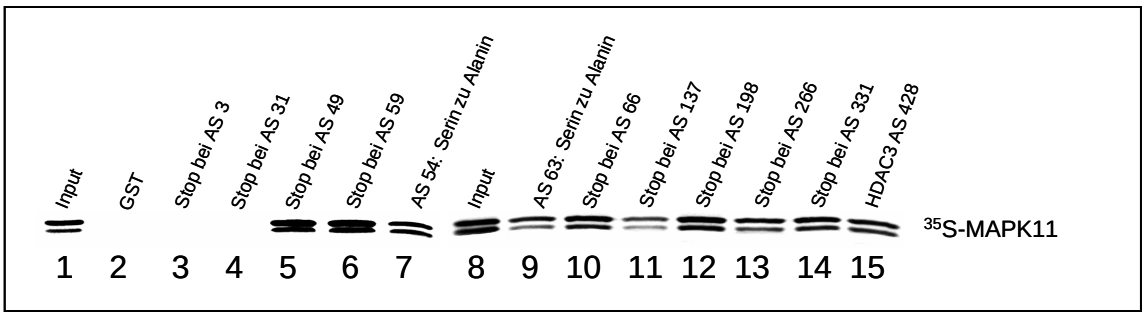


Abbildung 10: Übersicht über die Pulldown-Experimente mit radioaktiv markiertem MAPK11-Protein und verschiedenen Mutationen bzw. Trunkationen des GST-HDAC3-Proteins

Für die Pulldown-Ansätze wurden etwa 100 µg [^{35}S]-markierte MAPK11 mit etwa 20 µg des GST-Proteins bzw. mit 20 µg der GST-HDAC3-Fusionsproteine über Nacht inkubiert, anschließend gewaschen und erhitzt. Etwa 30 µg der von der Sepharose gelösten Proteine wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, das Gel nach Auftrennung der Proteine getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt, der nach sieben Tagen entwickelt wurde. Die Abb. zeigt die Schwärzung des Röntgenfilms durch die unter Verwendung von [^{35}S]-Methionin *in vitro* translatierte MAPK11 (N-terminal trunkiert).

In Spur 1 und Spur 8 sind etwa 20 µg des radioaktiv markierten MAPK11-Protein als Input aufgetragen. Spur 2 zeigt den Pulldown des *in vitro* translatierten MAPK11-Proteins mit dem GST-Fusionsprotein, wobei keine Bindung nachgewiesen werden konnte. Ebenfalls keine Bindung der Proteine wird in Spur 3 (Pulldown mit dem MAPK11-Protein und dem GST-HDAC3-Protein, das bei AS 3 ein Stopcodon besitzt) sowie Spur 4 (Pulldown zwischen dem MAPK11-Protein sowie dem GST-HDAC3-Protein, das bei AS 31 ein Stopcodon aufweist) gezeigt. In Spur 5 ist der erste Nachweis einer Bindung des radioaktiv markierten MAPK11-Proteins an das GST-HDAC3-Protein, das ein Stopcodon in der Position AS 49 besitzt, zu finden. Das MAPK11-Protein bindet auch an HDAC3, das bei AS 59 ein Stopcodon eingebaut hat (Spur 6). In Spur 7 ist der Pulldown bzw. die Bindung zwischen dem MAPK11-Protein und HDAC3 zu sehen, wobei die AS Serin in der Position 54 zu Alanin mutiert wurde. Die Bindung von MAPK11 an HDAC3 (Serin mutiert zu Alanin in der AS-Position 63) ist in Spur 9 gezeigt. Die weiteren Spuren zeigen den Pulldown zwischen dem MAPK11-Protein und HDAC3, das in folgenden AS-Positionen Stopcodons besitzt: AS 66 (Spur 10), AS 137 (Spur 11), AS 198 (Spur 12), AS 266 (Spur 13) und AS 331 (Spur 14). Spur 15 zeigt den Pulldown zwischen MAPK11 und GST-HDAC3 („Volle-Länge“-Protein; diese Spur entspricht Spur 3 in Abb. 9).

Die Doppelbande des Proteins repräsentiert die phosphorylierte bzw. nicht-phosphorylierte Form der MAP Kinase.

Abkürzungen: HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; MAPK11 = MAP Kinase 11

3.2.4 Nachweis der Interaktion von MAP Kinase 11 und HDAC3 *in vivo* mittels Immunpräzipitation

Ein weiteres Ziel dieses Forschungsvohabens bestand darin, eine mögliche Bindung von MAP Kinase 11 und HDAC3 *in vivo* zu untersuchen, da beim Pulldown durch die prokaryotische Proteinsynthese andere Interaktionsbedingungen gegeben sein können als im eukaryoten Organismus. Die Expression eines rekombinanten Proteins in Bakterien (z.B. *E. coli*) führt zur Isolierung einer großen Proteinmenge. Allerdings ist dabei zu beachten, dass Bakterien nicht bzw. kaum in der Lage sind, ein gebildetes Protein posttranslational zu modifizieren (z.B. zu glykosylieren). Da die Modifikation eines Proteins dessen Sekundärstruktur beeinflusst, kann dies in Prokaryoten und Eukaryoten zu einer unterschiedlichen Faltung des Proteins führen (Baneyx, 1999). Daher wurde die Interaktion der Proteine HDAC3 und MAPK11 in eukaryotischen Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Immunpräzipitationen (IP) mit Zelllysaten aus COS-7- und U937-Zellen durchgeführt (s. 2.2.15.10), die zuvor mit den Plasmiden pcDNA3.1-HDAC3 und pcDNA3.1-MAPK11 transfiziert worden waren. Die COS-7-Zellen wurden mit der DEAE-Dextran-Methode transfiziert (s. 2.2.15.5), während die U937-Zellen elektroporiert wurden (s. 2.2.15.4). Als Kontrolle für eine endogene Proteinexpression wurden COS-7-Zellen ohne Transfektion für die Immunpräzipitationen verwendet. Es zeigte sich, dass in beiden Zelllinien eine Bindung von HDAC3 und MAPK11 aneinander nachweisbar war. In Abb. 11 ist eine Immunpräzipitation gezeigt, bei der COS-7- (Teil A) sowie U937-Zellen (Teil B) mit HDAC3 und MAPK11 transfiziert worden waren. Als Kontrollen für die IP wurden nicht immunisierte Seren verwendet. Dabei war bei jedem positiven Ansatz (jeweils rechte Spur) eine Bindung der beiden Proteine zu sehen, während in der Negativkontrolle (jeweils linke Spur) keine Interaktion zu beobachten war. Die Versuchsansätze mit nicht transfizierten COS-7-Zellen stellen das gleiche Ergebnis dar (ohne Abb.). Die Doppelbande der MAPK11 zeigt die phosphorylierte bzw. nicht-phosphorylierte Form der Kinase.

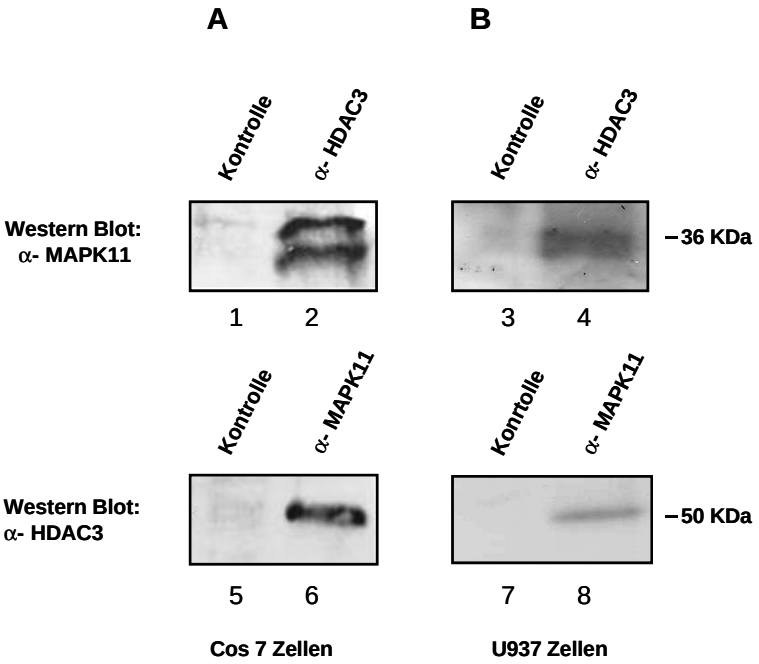


Abbildung 11: Nachweis der Bindung von MAPK11 und HDAC3 durch Immunpräzipitation

Teil A: IP mit COS-7-Zellen; Teil B: IP mit U937-Zellen. Die Spuren 1 bis 4 stellen die IP aus transfizierten COS-7 bzw. U937-Lysaten mit 2,5 µg HDAC3-Antikörper dar, wobei der Western Blot mit anti-MAPK11 durchgeführt wurde. Spuren 5 bis 8 zeigen den umgekehrten Ansatz, wobei die Lysate mit 2,5 µg MAPK11-Antikörper inkubiert wurden und der Western Blot mit anti-HDAC3 durchgeführt wurde. Die Kontrollen bei der Immunpräzipitation („Kontrolle“ in den Spuren 1, 3, 5 und 7) wurden mit nicht-immunisierten Seren angesetzt: In der IP mit HDAC3-Antikörper mit einem Serum aus Kaninchen, in der IP mit MAPK11-Antikörper mit einem Serum aus Ziege.

Die Spuren 2, 4, 6 und 8 („α-HDAC3“ bzw. „α-MAPK11“) zeigen die Immunpräzipitation, bei der die Bindung zwischen HDAC3 und MAPK11 nachgewiesen wurde. Pro Spur wurden 20 µg Protein aufgetragen.

Die Immunpräzipitation in nicht-transfizierten COS-7-Zellen zeigt im Western Blot das gleiche Ergebnis wie die transfizierten COS-7-Zellen (ohne Abb.).

Abkürzungen: α–HDAC3 = anti-HDAC3; α–MAPK11 = anti-MAPK11; HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; IP = Immunpräzipitation; kDA = Kilodalton; MAPK11 = MAP Kinase 11

3.2.5 Untersuchung der Interaktion von HDAC3 und MAPK11 *in vivo* mit dem Mammalian Two Hybrid-Assay

Mit dem CheckMate™ Mammalian Two Hybrid System (s. 2.2.15.6) können Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* untersucht werden. Neben der Immunpräzipitation stellt das Mammalian Two Hybrid System eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung bzw. Bestätigung von Proteinbindungen dar. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass es durch Positivkontrollen möglich wird, den Erfolg der Transfektion nachzuweisen. Außerdem ist durch die Negativkontrollen gewährleistet, dass keine falsch positiven Ergebnisse für Proteininteraktionen erzielt werden. Die Untersuchung von Proteininteraktionen ist bei diesem System nicht auf eine Zelllinie beschränkt, sondern es wurde gezeigt, dass diese Methode in fünf verschiedenen Zelllinien erfolgreich durchgeführt werden kann (s. 2.2.15.6).

Das Grundprinzip dieses Systems liegt darin, dass durch die Bindung zweier Proteine ein Reportergen, in diesem Fall die *Firefly Luciferase* (*Photinus pyralis*), aktiviert wird. Die zu transfizierenden Plasmide besitzen spezielle Domänen, die auch in Transkriptionsfaktoren gefunden werden: 1) Eine DNA-Bindungsdomäne, die an eine spezifische DNA-Sequenz bindet, und 2) eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne, die mit der Transkriptionsmaschinerie interagiert. Der verwendete Vektor pBIND hat eine GAL4-DNA-Bindungsdomäne, während das Plasmid pACT eine transkriptionelle VP16-Aktivierungsdomäne aufweist. Beide Plasmide werden zusammen mit dem Vektor pG5luc in eukaryote Zellen transfiziert (s. 2.2.15.5). Der Vektor pG5luc besitzt fünf GAL4-Bindungsstellen im Bereich der TATA-Box, die sich „oberhalb“ des *Firefly Luciferase*-Gens befindet. Die cDNAs von HDAC3 und MAPK11 wurden in diese Plasmide einkloniert (Expressionsplasmide: pBIND-HDAC3 sowie pACT-MAPK11). Als Negativkontrolle wurden die jeweiligen Leervektoren eingesetzt. Außerdem wurde eine Positivkontrolle mit den Plasmiden pACT-MyoD und pBIND-Id verwendet. pBIND besitzt GAL4:Id- und pACT weist VP16:MyoD-Fusionsproteine auf. Es wurde bereits nachgewiesen, dass diese beiden Proteine *in vivo* exprimiert werden und interagieren (Finkel et al., 1993). Abb. 12 zeigt schematisch die eingesetzten Plasmide für den Mammalian Two Hybrid-Assay.

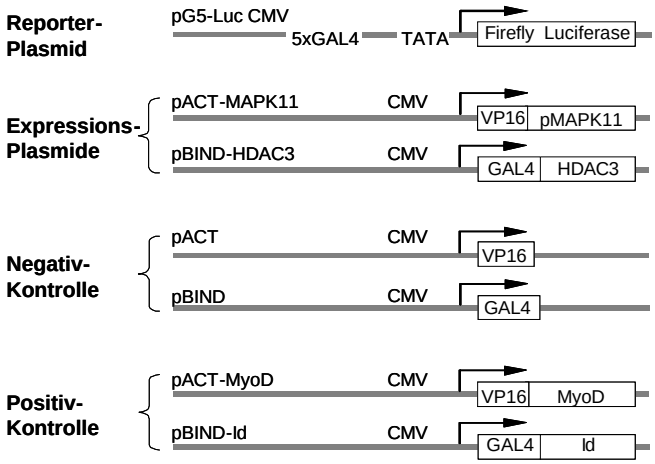


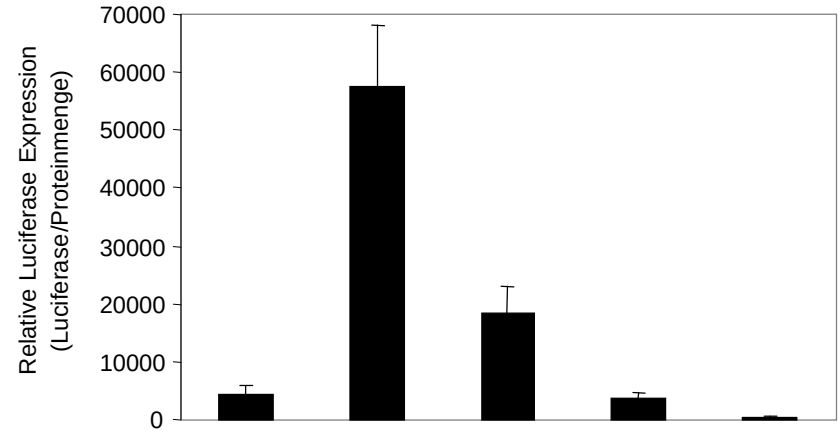
Abbildung 12: Schematische Darstellung der im Mammalian Two Hybrid-Assay verwendeten Plasmide

Der Vektor pG5luc stellt mit seinen fünf GAL4-Bindungsstellen das Reporterplasmid dar. Die Vektoren pBIND (mit DNA-Bindungsstelle) und pACT (mit Transkriptions-Aktivierungsdomäne) wurden als Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle wurden die Vektoren pACT-MyoD und pBIND-Id eingesetzt. Die Expression der Firefly Luciferase wurde 48 h nach der Transfektion in den Lysaten gemessen.

Abkürzungen: HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; Luc = Luciferase; MAPK11 = MAP Kinase 11

3.2.6 Messung der Firefly Luciferaseexpression in COS-7-Zellen nach Transfektion mit Plasmiden des Mammalian Two Hybrid Systems

Der Mammalian Two Hybrid-Assay dient zum Nachweis von Proteininteraktionen *in vivo*. Nach Transfektion der oben aufgeführten Plasmide in COS-7-Zellen wurde nach 48 h die Expression der Firefly Luciferase mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (s. 2.2.15.7) gemessen. Mit dieser Methode konnte ebenfalls eine Bindung von HDAC3 und der MAPK11 nachgewiesen werden. Durch den Abgleich der Luciferaseexpression auf den Proteingehalt der jeweiligen Lysate („Relative Luciferaseexpression“) wurden vergleichbare Bedingungen für die Auswertung des Versuchs geschaffen. Die folgende Abb. 13 zeigt die Auswertung eines Luciferase-Assays. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus drei Ansätzen.



	1	2	3	4	5
pG5-Luc	+	+	+	+	+
pBIND-HDAC3	-	-	+	+	-
pACT-MAPK11	-	-	+	-	+
pACT-MyoD	-	+	-	-	-
pBIND-Id	-	+	-	-	-
pACT	+	-	-	-	-
pBIND	+	-	-	-	-

Abbildung 13: Auswertung eines Mammalian Two Hybrid-Luciferase-Assays

COS-7-Zellen wurden mit Plasmiden des Mammalian Two Hybrid-Assays transfiziert. Nach 48 h wurden Lysate hergestellt, die Luciferaseexpression der Zelllysate wurde anschließend im Luminometer bestimmt. Ansatz 1: Luciferaseexpression der Negativkontrolle (Transfektion von pBIND + pACT + pG5luc): Das Reportergen wird schon in einem gewissen Grundniveau exprimiert. Ansatz 2: Der Messwert der Positivkontrolle (Transfektion von pBIND-Id + pACT-MyoD + pG5luc) steigt im Vergleich zur Negativkontrolle um mehr als das Zehnfache an. Ansatz 3 stellt die Luciferaseexpression nach Transfektion von MAPK11 und HDAC3 sowie pG5luc dar; durch die Transfektion der Expressionsplasmide pBIND-HDAC3 sowie pACT-MAPK11 zusammen mit pG5luc zeigt die im Vergleich zur Negativkontrolle vierfach erhöhte Firefly Luciferaseexpression eine Bindung der Proteine HDAC3 und MAP Kinase 11 an. Die Ansätze 4 und 5 weisen darauf hin, dass eine alleinige Transfektion von HDAC3 (Ansatz 4) oder MAPK11 (Ansatz 5) zusammen mit dem Vektor pG5luc eine ähnlich niedrige Luciferaseexpression hervor ruft wie die Negativkontrolle. Relative Luciferaseexpression heißt, dass die Expression auf den Proteingehalt der Proben bezogen wurde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder (N=3).

Abkürzungen: HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; Luc = Luciferase; MAPK11 = MAP Kinase 11

3.3 Untersuchungen zum Signaltransduktionsweg der MAPK11 mit der PathDetect-Methode

Weiterhin sollte geprüft werden, ob die Bindung von HDAC3 einen Einfluss auf die Signalweiterleitung der MAP Kinase 11 besitzt. Dazu wurde das PathDetect® *in vivo* signal transduction pathway trans-reporting system der Firma Stratagene eingesetzt, mit dem Signaltransduktionswege näher untersucht werden können. Hierbei wird (ähnlich wie im Mammalian Two Hybrid System) nach einer Plasmid-Transfektion in COS-7-Zellen die Expression eines Luciferase-exprimierenden Reportergens gemessen. Beim PathDetect-System werden Signalwege untersucht, während beim Mammalian Two Hybrid vorwiegend Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Die folgende Abb. 14 zeigt schematisch die für die Transfektion des PathDetect-Versuchs verwendeten Plasmide.

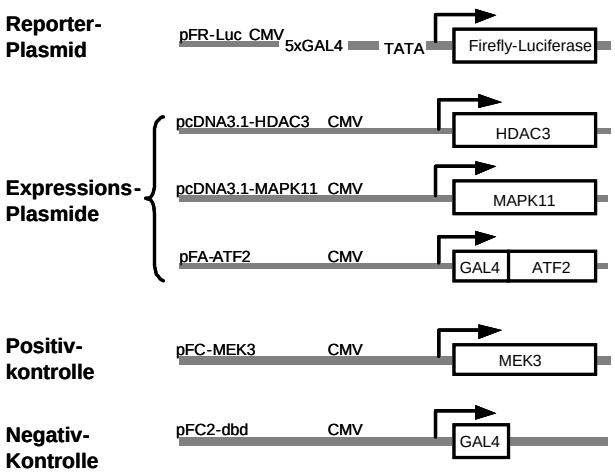


Abbildung 14: Schematische Darstellung der für die PathDetect-Analyse verwendeten Plasmide

Für die Negativkontrolle wurden die Plasmide pFR-Luc, pFA-ATF-2 und pFC2-dbd transfiziert, für die Positivkontrolle pFR-Luc + pFA-ATF-2 + pFC-MEK3. Expressionsplasmide: HDAC3, MAPK11 sowie der Transkriptionsfaktor ATF-2. Im PathDetect-Versuch wurde das Reporterplasmid pFR-Luc bei jeder Transfektion ebenfalls transfiziert. Die Luciferaseexpression wurde im Lysat gemessen.

Abkürzungen: ATF-2 = activating transcription factor 2; HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; Luc = Luciferase; MAPK11 = MAP Kinase 11; MEK3 = MAP Kinase Kinase 3

3.3.1 Messung der Firefly Luciferaseexpression in COS-7-Zellen nach Transfektion mit Plasmiden des PathDetect-Systems

Das PathDetect® *in vivo* signal transduction pathway trans-reporting system ist für eine schnelle und spezifische Bestimmung der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors *in vivo* sowie für eine Untersuchung von Signaltransduktionswegen geeignet. Im PathDetect-Experiment sollte untersucht werden, inwieweit sich die Aktivität des MAPK11-abhängigen Transkriptionsfaktors ATF-2 in An- und Abwesenheit von HDAC3 bzw. MAPK11 ändert. Damit könnte ein möglicher Einfluss von HDAC3 auf den MAP Kinase-Signalweg aufgezeigt werden. ATF-2 wird durch die MAP Kinase phosphoryliert und damit aktiviert (Enslen et al., 1998; Kawasaki et al., 2000).

In diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass HDAC3 die Aktivität von ATF-2 in Anwesenheit der Kinase vermindern kann. Durch Überexpression der MAP Kinase wird auch die Aktivität des nachgeschalteten Transkriptionsfaktors ATF-2 erhöht. HDAC3 ist in der Lage, diesen Effekt aufzuheben, d.h. die Luciferase-expression sinkt in Anwesenheit von HDAC3. Dabei wirkt HDAC3 nicht direkt auf ATF-2, denn eine gleichzeitige Expression von HDAC3 und ATF-2 verringert nicht die Aktivität von ATF-2. HDAC3 führt den inhibitorischen Effekt dagegen über die MAPK11 aus und hat möglicherweise keine direkt hemmende Wirkung auf die Aktivität von ATF-2. Als Negativkontrolle wurden mit der DEAE-Dextran-Methode die Plasmide pFC2-dbd, pFA-ATF-2 und pFR-Luc transfiziert, die Positivkontrolle bestand aus den Plasmiden pFC-MEK3, pFA-ATF-2 und pFR-Luc. Der Kinase-Inhibitor SB202190 wurde in einer Konzentration von 100 µM eingesetzt und hemmt die Luciferaseexpression sowohl in An- als auch in Abwesenheit von HDAC3. Abb. 15 zeigt die Auswertung eines PathDetect-Versuchs. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus drei Ansätzen.

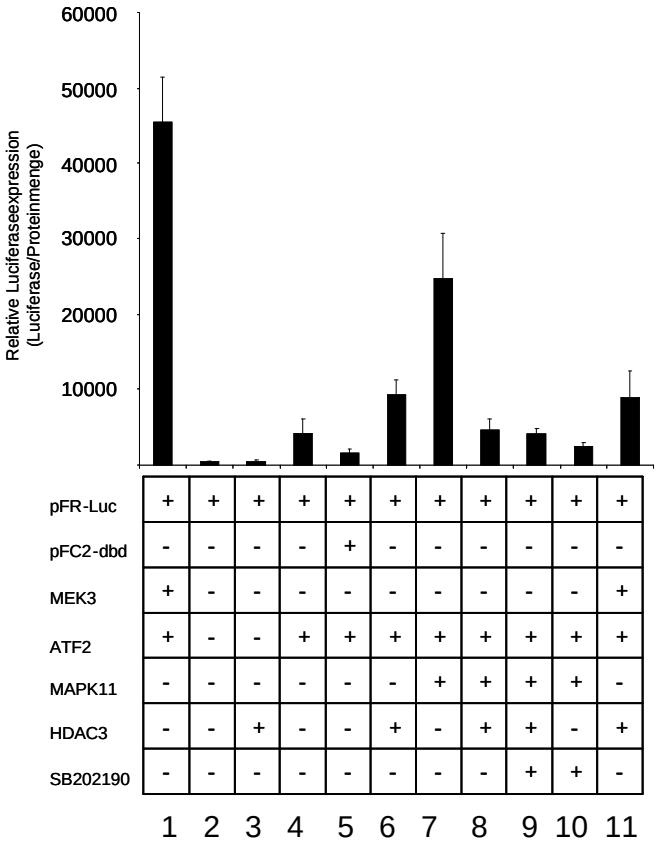


Abbildung 15: Auswertung eines PathDetect-Luciferase Assays

Die in der Tabelle aufgeführten Plasmide wurden in verschiedenen Kombinationen mit der DEAE-Dextran-Methode in COS-7-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurde die Luciferaseexpression in den Lysaten bestimmt. Ansatz 1: Die Positivkontrolle bestand aus den Plasmiden pFC-MEK3, pFA-ATF-2 und pFR-Luc und zeigt eine hohe Luciferaseexpression. Die Negativkontrolle (Ansatz 5) mit den Plasmiden pFC2-dbd, pFA-ATF-2 und pFR-Luc weist wie die anderen Kontrollen (Ansätze 2 bis 4) eine geringe Expression an Luciferase auf. Ansatz 6: HDAC3 nimmt nicht direkten Einfluss auf ATF-2. Der Transkriptionsfaktor ATF-2 ist im Signalweg der MAP Kinase nachgeschaltet und wird durch diese aktiviert (Ansatz 7). Die Expression der Luciferase durch die Aktivierung von ATF-2 wird durch die Anwesenheit von HDAC3 auf etwa 20% gemindert (Ansatz 8). Ansatz 9: Die Luciferaseexpression ist auch niedrig, wenn die MAP Kinase durch einen Inhibitor (SB202190) gehemmt wird. Ansatz 10: Wird die Aktivität der MAP Kinase durch SB202190 inhibiert, fällt die Luciferaseexpression auch in diesem Ansatz weiter ab. Ansatz 11: HDAC3 ist in der Lage, die Luciferaseexpression der Positivkontrolle (Ansatz 1) über den Einfluss auf MEK3 auf etwa 20% zu verringern. Der Kinase-Inhibitor SB202190 wurde in einer Konzentration von 100 µM eingesetzt. Relative Luciferaseexpression heißt, dass die Expression auf den Proteingehalt der Proben bezogen wurde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder (N=3).

Abkürzungen: ATF-2 = activating transcription factor 2; HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; Luc = Luciferase; MAPK11 = MAP Kinase 11; MEK3 = MAP Kinase Kinase 3; SB202190 = Kinase-Inhibitor

3.3.2 Messung der Firefly Luciferaseexpression in COS-7-Zellen nach Transfektion einer HDAC3-spezifischen siRNA im PathDetect-System

Der Einfluss von HDAC3 auf den Transkriptionsfaktor ATF-2 und damit auf die nachgeschaltete Luciferaseexpression wurde in einem weiteren PathDetect-Experiment untersucht. Hierbei wurde zusätzlich eine Hemmung der HDAC3-Expression durch die Transfektion einer HDAC3-spezifischen siRNA (small interfering RNA) hervorgerufen (s. 2.2.15.8). Als Negativkontrolle wurde mit der DEAE-Dextran-Methode eine siRNA transfiziert, die nicht gegen HDAC3 gerichtet war. siRNAs werden als 21-23 Basenpaare große Doppelstränge synthetisiert. Werden sie in Zellen transfiziert, können sie posttranslational zur Unterdrückung der Expression der Gene führen, gegen die sie gerichtet sind (Holen et al., 2002; Sui et al., 2002; Tuschl, 2001). Die weiteren Plasmide wurden bereits in Abb. 14 beschrieben. Nach Messung der Lysate im Luciferaseassay (s. 2.2.15.7.) ergaben sich folgende Ergebnisse: Die Positivkontrolle in Ansatz 5 bestand wie in Abb. 15 aus den Plasmiden pFC-MEK3, pFA-ATF-2 und pFR-Luc und zeigt eine hohe Luciferaseexpression. Die Ansätze 1 bis 4 stellen negative Kontrollen dar, d.h. hier ist kein größerer Einfluss auf die Luciferaseexpression zu sehen. Bei Ansatz 6 ergaben sich ähnliche Werte wie in Abb. 15, d.h. auch hier wird die Bindung von ATF-2 an die MAP Kinase durch eine erhöhte Luciferaseexpression angezeigt. Der hemmende Einfluss von HDAC3 ist in Ansatz 7 dargestellt. Wird nun eine siRNA transfiziert, die nicht gegen HDAC3 gerichtet ist (Ansatz 8), ist eine ähnliche Expression zu sehen wie in Ansatz 7. Wird dagegen eine siRNA, die gegen die HDAC3-mRNA gerichtet ist, transfiziert, verringert sich der hemmende Einfluss von HDAC3 auf die ATF-2-Aktivität, d.h. die Luciferaseexpression steigt durch die Hemmung von HDAC3 stark an (Ansatz 9). Wie auch in Abb. 15 sinkt die Aktivität der MAP Kinase und damit auch die Luciferaseexpression durch den Einsatz des Kinase-Inhibitors SB202190, der in einer Konzentration von 100 µM eingesetzt wurde. Die folgende Abb. 16 zeigt den PathDetect Luciferase-Assay, bei dem durch die Hemmung der HDAC3-Expression durch Transfektion mit HDAC3-siRNA die Repression der Aktivität von ATF-2 aufgehoben wird.

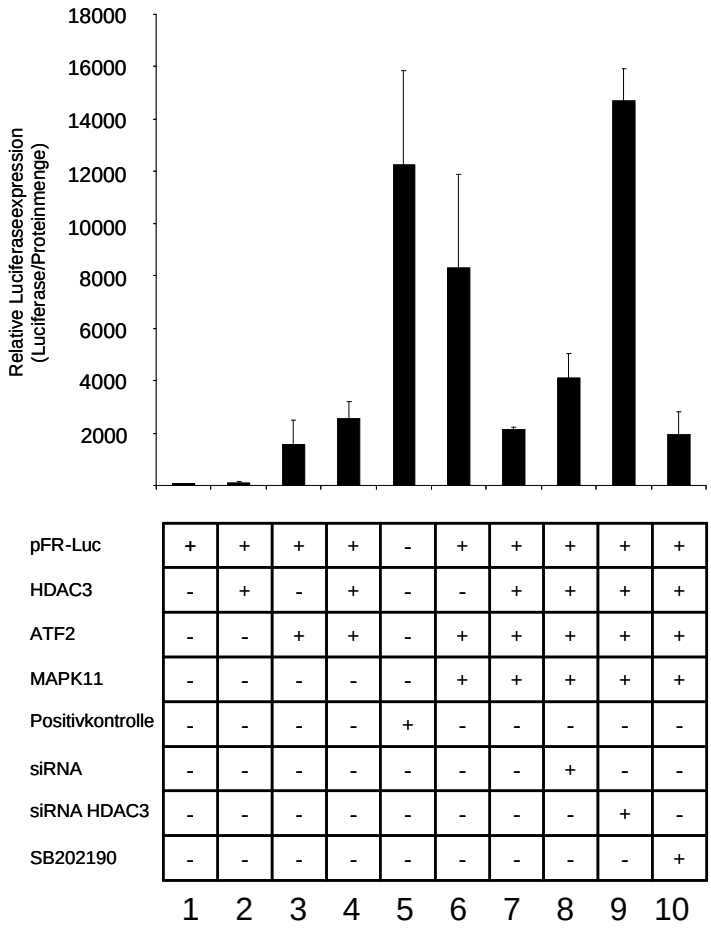


Abbildung 16: Auswertung eines PathDetect-Luciferase-Assays nach Transfektion von siRNA und HDAC3-siRNA

COS-7-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und die Luciferaseexpression nach 48 h in den Lysaten gemessen. Ansatz 1, 2 und 3 zeigen die niedrige Luciferaseexpression nach der Transfektion einzelner Plasmide. In Ansatz 4 wird der Effekt von HDAC3 auf die ATF-2-Aktivität ohne Einfluss der MAP Kinase dargestellt. Die Positivkontrolle zeigt eine hohe Luciferaseexpression (Ansatz 5). Die Bindung von ATF-2 und der MAP Kinase ist in Ansatz 6 dargestellt. Durch den Einfluss von HDAC3 wird die Luciferaseexpression im Vergleich zu Ansatz 6 stark reduziert (Ansatz 7). Wird zu den Plasmiden von Ansatz 7 noch eine Kontroll-siRNA mit transfiziert, steigt die Luciferaseexpression etwas an (Ansatz 8). Wird eine siRNA, die gegen HDAC3 gerichtet ist, mit transfiziert (Ansatz 9), wird die Repression der ATF-2-Aktivität aufgehoben, und die Luciferaseexpression steigt noch über den Wert der Positivkontrolle. Der Einsatz von SB202190, einem Kinase-Inhibitor, hebt die Bindung auf und führt zu einer geringen Luciferaseexpression (Ansatz 10). Die Expression der Luciferase wurde auf den Proteingehalt bezogen (Relative Luciferaseexpression). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (N=3).
Abkürzungen: ATF-2 = activating transcription factor 2; HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; Luc = Luciferase; MAPK11 = MAP Kinase 11; SB202190 = Kinase-Inhibitor; siRNA = small interfering RNA; siRNA HDAC3 = gegen HDAC3 gerichtete siRNA

3.3.3 Einfluss der HDAC3-Deacetylasedomäne auf die Luciferaseexpression im PathDetect-Experiment

In Abb. 10 wurde gezeigt, dass die Bindung zwischen der MAPK11 und HDAC3 im N-terminalen Bereich des HDAC3-Proteins statt findet. Um zusätzlich zu klären, welche Domäne von HDAC3 den hemmenden Einfluss auf die ATF-2-Aktivität besitzt (s. Abb. 15), wurde mit der Mutagenese-PCR (s. 2.2.10) in das Plasmid pcDNA3.1-HDAC3 bei Aminosäure 401 ein Stoppcodon eingebaut. Dadurch wird die Deacetylasedomäne, die sich im Bereich der Aminosäuren 401-428 befindet (Yang et al., 2002), nach der Transfektion nicht mehr exprimiert. Durch die fehlende Deacetylasedomäne von HDAC3 wird die Aktivität von ATF-2 gesteigert (Abb. 17).

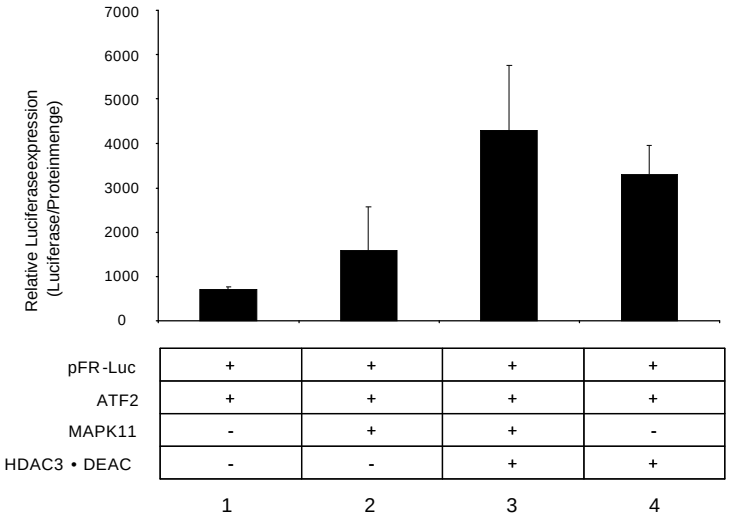


Abbildung 17: Darstellung eines Luciferase-Assays: Der Einfluss von HDAC3 ohne Deacetylasedomäne auf die Luciferaseexpression wird gezeigt

COS-7-Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert und die Luciferase-expression nach 48 h in den Lysaten gemessen. Ansatz 1: Luciferaseexpression nach Transfektion von pFR-Luc und ATF-2. Wird die MAPK11 überexprimiert, steigt die Luciferaseexpression an (Ansatz 2). Ansatz 3: Die fehlende Deacetylasedomäne von HDAC3 steigert die Aktivität von ATF-2 und damit die Expression der Luciferase. Ansatz 4: Die fehlende Deacetylasedomäne erhöht die Luciferaseexpression ohne Überexpression von MAPK11. Die Luciferaseexpression wurde auf den Proteingehalt des Lysats bezogen („Relative Luciferaseexpression“). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (N=3).

Abkürzungen: ATF-2 = activating transcription factor 2; • DEAC = fehlende Deacetylasedomäne in HDAC3; HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; MAPK11 = MAP Kinase 11; Luc = Luciferase

3.4 Verminderung der HDAC3-Proteinmenge nach Transfektion von HDAC3-siRNA in U937- und COS-7-Zellen

In Abb. 16 ist dargestellt, dass eine Verminderung der HDAC3-Proteinmenge zu einer erhöhten ATF-2-Aktivität führt. Um den Effekt der HDAC3-siRNA *in vivo* nachzuweisen, wurden U937- und COS-7-Zellen entweder ohne DNA, mit siRNA oder mit HDAC3-siRNA transfiziert. Die Lysate wurden mittels einer Western Blot-Analyse (s. 2.2.17.4) untersucht. Als Kontrolle für den HDAC3-Antikörper wurde ein HDAC3-Eluat aus SF9-Insektenzellen aufgetragen. Die spätere Inkubation der Blots mit dem Tubulin-Antikörper zeigte, dass pro Spur gleiche Proteinmengen pipettiert worden waren. Durch die Transfektion von HDAC3-siRNA konnte die Protein-expression von HDAC3 in U937- und COS-7-Zellen reduziert werden (Abb. 18).

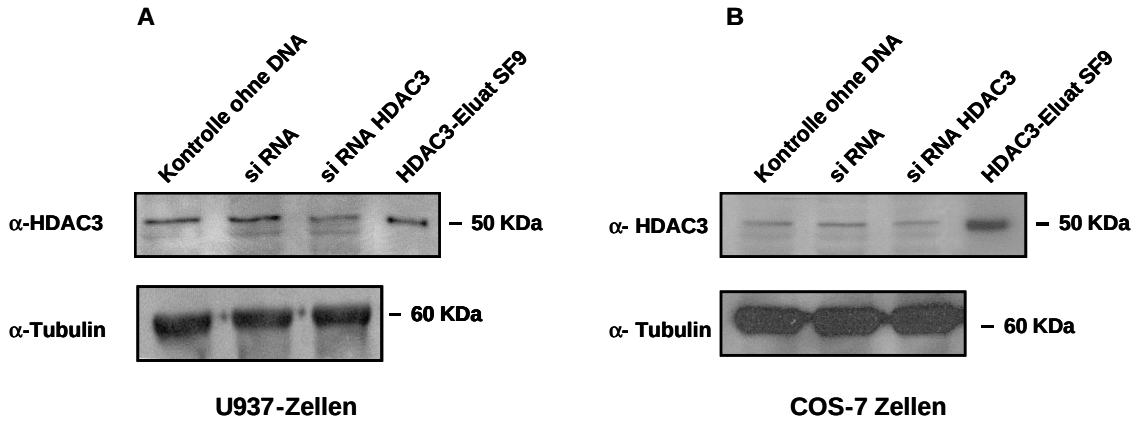


Abbildung 18: Die HDAC3-Proteinmenge in U937- und COS-7-Zellen wird durch Transfektion einer HDAC3-siRNA verringert

U937- und COS-7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden je 20 µg Protein aus U937- (Abb. Teil A) sowie COS-7-Zellen (Abb. Teil B) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Blots wurden mit einem HDAC3-Antikörper inkubiert (oberer Teil von Abb. A und B). Dabei zeigt sich eine gleichmäßige HDAC3-Expression, wenn keine DNA (Spur „Kontrolle ohne DNA“) oder siRNA, die nicht speziell gegen HDAC3 gerichtet war (Spur „siRNA“) transfiziert wurden. Wird dagegen eine gegen HDAC3 gerichtete siRNA transfiziert (Spur „siRNA HDAC3“), verringert sich die HDAC3-Proteinmenge *in vivo*. Als Kontrolle für den HDAC3-Antikörper wurde ein aus SF9-Zellen aufgereinigtes HDAC3-Protein aufgetragen (Spur „HDAC3-Eluat SF9“). Der Tubulin-Antikörper („α-Tubulin“) diente zur Kontrolle, dass bei den transfizierten Zellen in jeder Spur gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden (unterer Teil von Abb. A und B).

Abkürzungen: α = anti (Antikörper); HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; kDa = Kilodalton; SF-9 = SF-9-Insektenzellen; siRNA = small interfering RNA

Eine sterile Handhabung von siRNA ist wichtig für ein optimales Transfektionsergebnis, da siRNA wie RNA sehr anfällig gegen RNasen ist. Daher wurde die Transfektion von siRNA in COS-7- und U937-Zellen als Kontrolle genutzt, ob die siRNA nach der Transfektion in der Zelle stabil bleibt und ihren hemmenden Effekt auf die HDAC3-Proteinexpression ausüben kann. Mit diesem Versuch (Abb. 18) konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass die HDAC3-Proteinmenge durch die Transfektion der HDAC3-siRNA reduziert wird.

3.5 Einfluss von HDAC3 auf den Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine

3.5.1 Messung des Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase 11 *in vitro* mittels Kinase Assay

MAP Kinasen werden von übergeordneten Kinasen phosphoryliert und damit aktiviert (Enslen et al., 1998). Bisher konnte ein inhibitorischer Effekt von HDAC3 auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors ATF-2, der der MAPK11 nachgeschaltet ist, aufgezeigt werden. In den folgenden Experimenten sollte daher untersucht werden, ob HDAC3 einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der MAPK11 hat. Ein möglicher Einfluss der Bindung von HDAC3 an die MAPK11 wurde zuerst in einem radioaktiven Kinase Assay (s. 2.2.14) untersucht. Mit dieser Methode konnte der Phosphorylierungsstatus der MAPK11 in An- und Abwesenheit von HDAC3 *in vitro* überprüft werden. Es zeigte sich, dass der Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase 11 in Anwesenheit von HDAC3 vermindert wurde, wie die repräsentative Auswertung eines Kinase Assays in Abb. 19 darstellt.

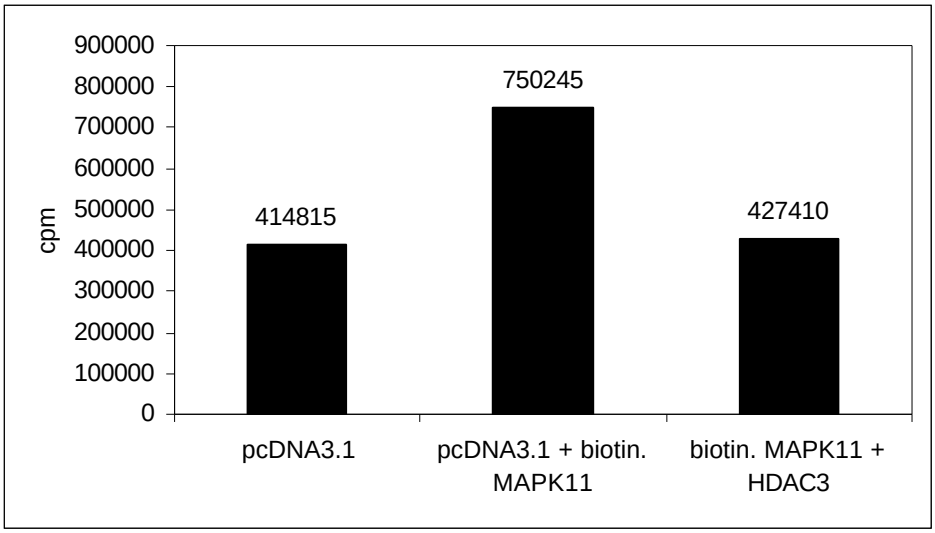


Abbildung 19: Auswertung eines radioaktiven Kinase Assays

Die Abb. zeigt repräsentativ die Auswertung eines Kinase Assays. Die unter Verwendung von nicht-radioaktivem Methionin *in vitro* transkribierten und translatierten Plasmide pcDNA3.1, pcDNA3.1-HDAC3 und pcDNA-MAPK11 wurden in verschiedenen Kombinationen unter Zugabe von [γ-^{32}P]-ATP für 30 min bei 30ºC inkubiert. Das Plasmid pcDNA-MAPK11 wurde unter Verwendung von biotinylierter tRNA *in vitro* transkribiert und translatiert, wobei das translatierte MAP Kinase Protein das Peptidsubstrat darstellte.

Nach der Inkubation wurden Stoplösung sowie Avidin zu den Ansätzen gegeben. Die Reaktionsprodukte wurden auf eine mit Streptavidin beschichtete Membran überführt, die Ansätze gewaschen und die auf der Membran der Säule verbliebene Radioaktivität im β-Szintillationszähler gemessen. Der Kontrollansatz links zeigt die Menge an gebundenem ^{32}P-ATP, wenn nur der Leervektor pcDNA3.1 *in vitro* transkribiert und translatiert und im Kinase Assay eingesetzt wurde. Der mittlere Ansatz stellt den Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase dar. Wird HDAC3 zusammen mit der MAPK11 inkubiert (Ansatz rechts), sinkt die Menge des gebundenen ^{32}P-ATPs auf den Wert des Kontrollansatzes, d.h. in Abwesenheit von HDAC3 ist der Phosphorylierungsstatus der MAPK11 am höchsten.

Abkürzungen: cpm = counts per minute (Zählungen pro Minute im Szintillationszähler); biotin. = biotinyliert, HDAC3 = Histon-Deacetylase 3, MAPK11 = MAP Kinase 11

3.5.2 Verminderung des MAP Kinase-Phosphorylierungsstatus *in vivo* durch HDAC3

Im Kinase Assay konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase 11 in Anwesenheit von HDAC3 vermindert ist (Abb. 19). Nun sollte geprüft werden, ob dies auch in einer Zelllinie, d.h. *in vivo*, der Fall ist. Da *in vivo* andere Bedingungen zu finden sind als in einem *in vitro*-Versuch, kann von den Ergebnissen des Kinase Assays nicht unbedingt auf die Gegebenheiten in der Zelle geschlossen werden. MAP Kinasen, die vermindert phosphoryliert werden, besitzen damit einen geringeren Aktivitätsgrad. Eine mögliche Überexpression von HDAC3 kann einen Einfluss auf die Signalweiterleitung in der Zelle haben. Für diesen *in vivo*-Versuch wurde die humane Histiozytom-Zelllinie U937 verwendet. U937-Zellen exprimieren endogen die MAP Kinase sowie HDAC3 und sind für diese Versuche geeignet, weil die Expression der endogenen MAP Kinase durch die Gabe von Lipopolysaccharid (LPS) stimulierbar ist. Ebenso wird der Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase durch LPS erhöht (Goh et al., 2000; Han et al., 1994).

Daher wurden U937-Zellen nach der Transfektion (s. 2.2.15.4) und der Inkubation mit GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierungs-Faktor) mit LPS stimuliert (s. 2.2.15.3). Die Lysate wurden in einer Western Blot-Analyse (s. 2.2.17.4) auf ihre Expression an phosphorylierter MAP Kinase 11 untersucht. Parallel dazu wurde die Bandenintensität auf dem Western Blot mit dem Computerprogramm „TotalLab“ ermittelt und die Werte in einer Tabelle dargestellt. Abb. 20 zeigt die relative Phosphorylierung der MAP Kinase 11 (oberer Teil) sowie die mittels Antikörper detektierte Menge an phosphorylierter MAP Kinase 11 in den verwendeten Zelllysaten (unterer Teil). Die phosphorylierte MAPK11 wird in beiden Ansätzen (ohne HDAC3 bzw mit HDAC3-Überexpression) in einem Grundniveau exprimiert (0 min), steigt nach 7 min etwas an und erreicht nach 14 min ein Maximum. Nach 21 min ist der Ausgangswert etwa wieder erreicht. Wichtig ist, dass der Phosphorylierungsstatus der MAPK11 bei Überexpression von HDAC3 im Vergleich zur Kontrolle in allen vier Ansätzen (weiße Balken) vermindert ist.

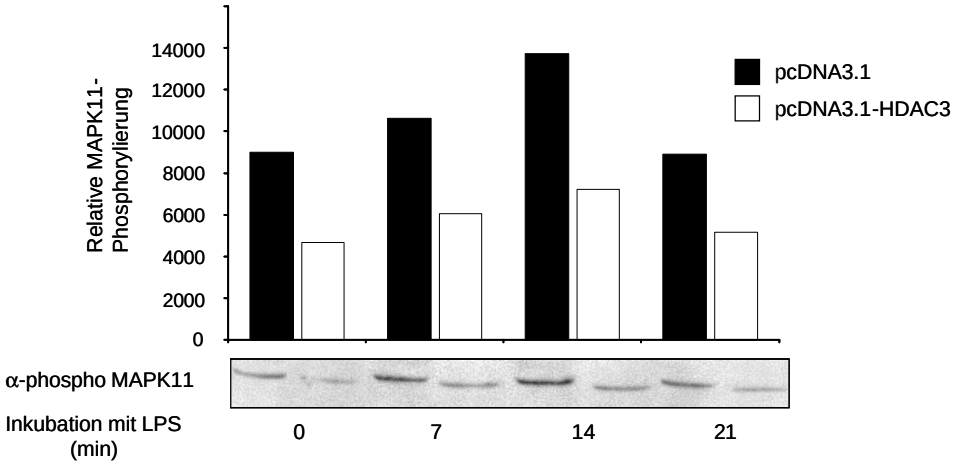


Abbildung 20: Darstellung des relativen Phosphorylierungsstatus von LPS-stimulierten U937-Zellen mittels Computerprogramm „TotalLab“ (oben) sowie Western Blot derselben U937-Lysate nach Inkubation mit dem anti-phospho-MAPK11-Antikörper (unten)

Die Abb. zeigt repräsentativ den relativen Phosphorylierungsstatus von transfizierten U937-Zellen. U937 wurden mit Leervektor (pcDNA3.1) oder mit HDAC3 (pcDNA3.1-HDAC3) transfiziert und nach 24 h mit 10 ng/ml GM-CSF stimuliert. Nach 48 h wurden die U937 mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet (7, 14 und 21 min). Als Kontrolle wurden U937 ohne LPS inkubiert (0 min). Je 20 µg Protein wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Banden im Western Blot mit einem Antikörper gegen phosphorylierte MAP Kinase detektiert („α-phospho-MAPK11“; unten). Die im Western Blot nachgewiesenen Banden wurden mit dem Programm „TotalLab“ auf Grund ihrer Intensität in Relation zueinander gesetzt und die relative Expression von phosphorylierter MAP Kinase anhand der Balken dargestellt (oben). Schwarze Balken: Transfektion mit pcDNA3.1, weiße Balken: Transfektion mit pcDNA3.1-HDAC3.

Abkürzungen: α–phospho = anti-phospho; GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierungs-Faktor HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; LPS = Lipopolysaccharid; MAPK11 = MAP Kinase 11

3.5.3 Verminderung des Phosphorylierungsstatus von ATF-2 *in vivo* durch HDAC3

Durch die Aktivierung der MAP Kinase wird eine Phosphorylierung und damit eine Erhöhung der Aktivität des Transkriptionsfaktors ATF-2 erreicht (Ouwens et al., 2002). Um einen Effekt bei Überexpression des HDAC3-Proteins auf die Aktivierung

von ATF-2 zu zeigen, wurden U937-Zellen entweder mit Leervektor oder mit HDAC3 transfiziert. Die Lysate aus LPS-stimulierten U937-Zellen wurden in einer Western Blot-Analyse (s. 2.2.17.4) untersucht. Der Phosphorylierungsstatus von ATF-2 wurde ebenso wie der von MAPK11 (s. Abb. 20) durch die Überexpression von HDAC3 reduziert (oberer Teil der folgenden Abb. 21). Um einen internen Vergleich der Proteinexpression aller Lysate zu haben, wurden die zuvor im Western Blot verwendeten Membranen nach Entfernen des HDAC3-Antikörpers mit neuem Tubulin-Antikörper inkubiert. Tubulin wurde hier als Abgleich genutzt, um zu gewährleisten, dass jeweils gleiche Proteinmengen pro Spur aufgetragen worden waren. Der untere Teil der Abb. 21 zeigt die mit Tubulin-Antikörper inkubierten Blots.

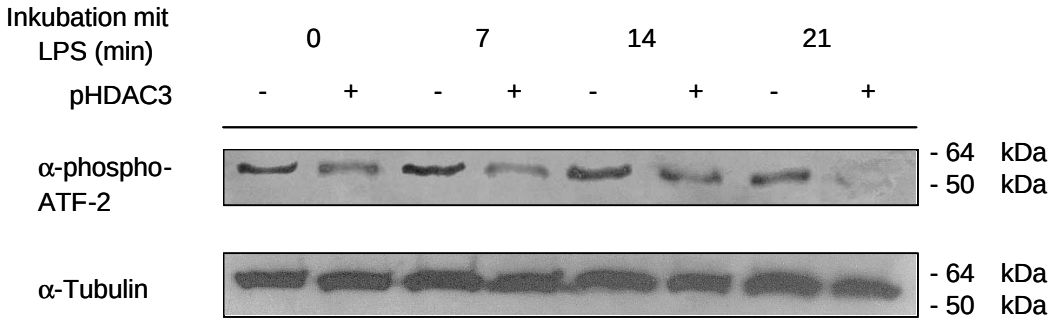


Abbildung 21: Phosphorylierungsstatus von ATF-2 in LPS-stimulierten U937-Zelllysaten nach Transfektion von Leervektor oder HDAC3

U937-Zellen wurden mit pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-HDAC3 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 10 ng/ml GM-CSF stimuliert, nach 48 h mit 1 µg/ml LPS inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten (7, 14 und 21 min) Lysate hergestellt. Als Kontrolle wurden transfizierte U937 ohne LPS lysiert (0 min). Je 20 µg Protein wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Blots mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes ATF-2 (oben) oder mit anti-Tubulin (unten) inkubiert. Auch hier wird durch die Überexpression von HDAC3 der Phosphorylierungsstatus eines Proteins, in diesem Fall der des Transkriptionsfaktors ATF-2, reduziert (oben). Die Expression von Phospho-ATF-2 steigt nach LPS-Stimulierung an, fällt aber nach 14 min wieder ab und erreicht nach 21 min ein niedrigeres Niveau als ohne LPS-Stimulierung. Der untere Teil der Abb. (Tubulin-Antikörper) zeigt, dass bei allen Lysaten gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Abkürzungen: α = anti (Antikörper); ATF-2 = activating transcription factor; HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; KDa = Kilodalton; LPS = Lipopolysaccharid; MAPK11 = MAP Kinase 11

3.5.4 Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase in Patientenzellen nach Behandlung mit LPS

In Makrophagen eines Patienten, der bei der Erstdiagnose eine Akute Myeloische Leukämie (myelomonozytär) aufwies, sollte untersucht werden, ob nach einer LPS-Inkubation der Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase *in vivo* vergleichbar ist mit dem einer Zelllinie. Die Makrophagen wurden vom Universitätsklinikum Frankfurt zur Verfügung gestellt. Auf eine Transfektion mit Plasmiden (pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-HDAC3) wurde verzichtet, da Primärzellen sehr schlecht neue DNA aufnehmen bzw. bei der Transfektion auch schnell absterben können (Li et al., 2001). Daher wurden die Patientenzellen mit LPS inkubiert (s. 2.2.15.3). Zuerst wurde die Menge an phosphorylierter MAP Kinase nach den verschiedenen Inkubationszeiten in einer Western Blot-Analyse (s. 2.2.17.4) untersucht. Dieses Protein wurde auch ohne Stimulierung mit LPS in einer Grundmenge exprimiert. Dabei stieg die Expression nach 7 min schon stark an, fiel nach 14 min aber schon wieder ab, und erreichte nach 21 min etwa das Ausgangsniveau. Ein ähnlicher Verlauf der Expression von phosphorylierter MAP Kinase ist in Abb. 20 zu sehen, als U937-Zellen nach LPS-Stimulierung auf ihre Expression von phosphorylierter MAP Kinase untersucht wurden. Abb. 22 zeigt den Western Blot, bei dem Lysate aus LPS-stimulierten AML-Patientenzellen mit einem phospho-MAPK11-Antikörper inkubiert worden waren.

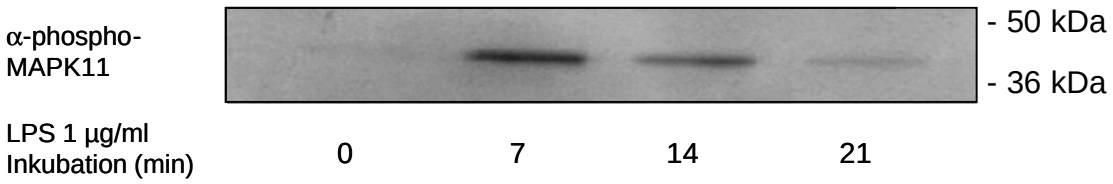


Abbildung 22: Übersicht über den Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase in Makrophagen eines Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um Makrophagen eines Patienten mit einer Akuten Myeloischen Leukämie (myelomonozytär) bei Erstdiagnose. Die Zellen wurden ohne vorherige Plasmid-Transfektion für 0, 7, 14 und 21 min mit 1 µg/ml LPS inkubiert. Der Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase wurde nach Stimulation der Makrophagen mit LPS zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessen, d.h. nach der Inkubation für 7, 14 und 21 min mit LPS wurden Lysate hergestellt. Als Kontrolle wurden Zellen ohne LPS inkubiert (0 min). In einem SDS-Gel wurden pro Spur jeweils 20 µg Protein aufgetragen.

Im Western Blot wurden die Membranen mit einem phospho-MAPK11-Antikörper inkubiert. Die Expression der phosphorylierten MAP Kinase stieg im Vergleich zum Grundniveau (0 min) nach LPS-Gabe schon nach sieben min stark an, fiel nach 14 min wieder ab und erreichte nach 21 min fast wieder das Grundniveau.

Die Expression der phosphorylierten MAP Kinase ist im Verlauf ähnlich zur Expression in LPS-behandelten U937-Zellen (Abb. 20).

Abkürzungen: α-phospho = anti-phospho; kDa = Kilodalton; LPS = Lipopolysaccharid; MAPK11 = MAP Kinase 11

Für einen internen Abgleich der aufgetragenen Proteinmenge wurde die Membran vom ersten Antikörper befreit, geblockt und danach mit dem Tubulin-Antikörper inkubiert. In Abb. 23 ist die Tubulin-Expression in den LPS-stimulierten Makrophagen eines AML-Patienten dargestellt. In dieser Abb. wird gezeigt, dass in jeder Spur die gleiche Proteinmenge aufgetragen worden war. Die Expression der phosphorylierten MAPK11 nach verschiedenen Zeitpunkten (s. Abb. 22) ist damit nicht auf unterschiedliche Proteinmengen zurück zu führen.

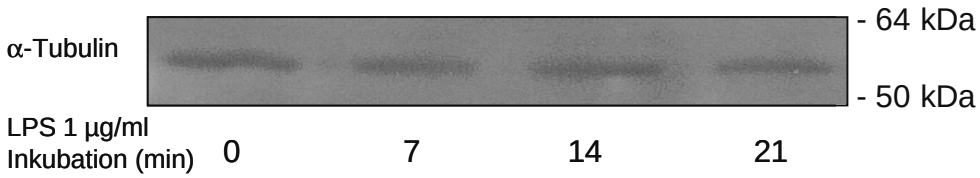


Abbildung 23: Western Blot-Analyse der Tubulinexpression in Lysaten aus LPS-stimulierten Makrophagen eines AML-Patienten

Die Abb. zeigt einen Western Blot mit Zelllysaten aus LPS-stimulierten Makrophagen eines AML-Patienten, bei dem die Membran mit anti-Tubulin inkubiert wurde. Dies diente zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge. Die Proteinmenge war in allen Ansätzen gleich, so dass ein Unterschied in der phospho-MAPK11-Expression (Abb. 22) nachgewiesen werden konnte. Abkürzungen: α-Tubulin = anti-Tubulin; kDa = Kilodalton; LPS = Lipopolysaccharid

Dieselben Proben wurden ebenfalls mit dem phospho-ATF-2-Antikörper inkubiert, allerdings konnten hier auch nach mehreren Versuchen keine Proteine nachgewiesen werden.

3.6 Hemmung der LPS-induzierten TNF alpha-Expression durch HDAC3

LPS ruft eine erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine hervor (Lee et al., 1994). Es sollte untersucht werden, ob HDAC3 im Prozess der TNF alpha-Produktion ebenfalls einen Einfluss hat. Daher wurden THP-1-Zellen (eine Modellzelllinie für die Akute Monozytische Leukämie) mit einem TNF-Promotor-Luciferase-Plasmid sowie anderen Plasmiden transfiziert. Der TNF-Promotor besitzt sowohl eine ATF-2- als auch eine NF-κB-Bindungsstelle (Udalova et al., 1998). Die Lysate wurden auf ihre Luciferaseexpression hin untersucht. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Audrey Varin (AG Prof. Georges Herbein, Abteilung für Virologie, Universität Besançon) durchgeführt. Abb. 24 zeigt, dass die Luciferaseexpression durch die Stimulierung mit LPS um das Doppelte gesteigert wird (Ansatz 4 im Vergleich zu Ansatz 2 bzw. Ansatz 1). Durch Transfektion von HDAC3-siRNA konnte die

Expression noch erhöht werden (Ansatz 5), während eine nicht gegen HDAC3 gerichtete siRNA (als Kontrolle) keinen steigernden Effekt ausübte (Ansatz 2).

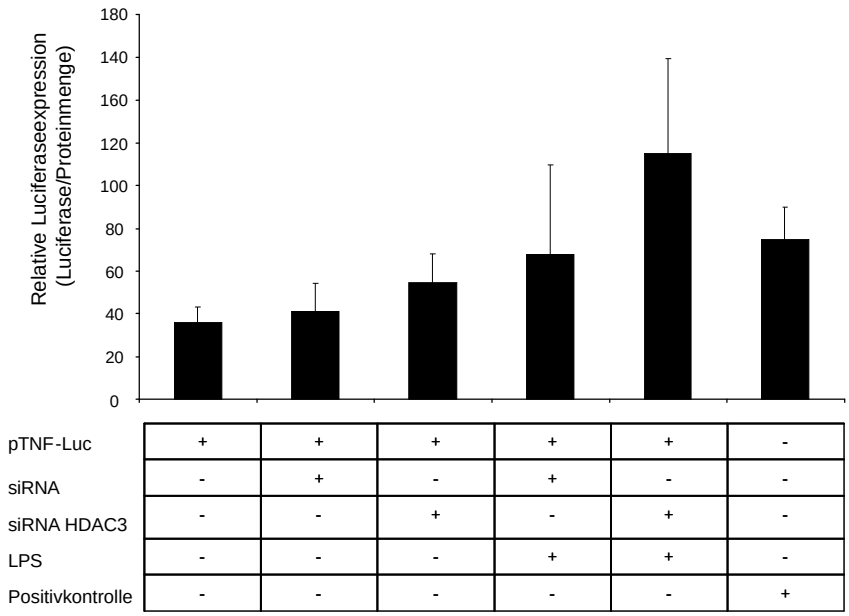


Abbildung 24: Darstellung eines Luciferase-Assays, bei dem die HDAC3-vermittelte Hemmung der LPS-stimulierten TNF alpha-Expression durch die Inhibition von HDAC3 aufgehoben wird

THP-1-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Nach 24 h wurde mit 10 ng/ml GM-CSF inkubiert. Nach 48 h wurden die THP-1-Zellen in einigen Ansätzen für 20 min mit LPS stimuliert und aus allen Ansätzen Lysate hergestellt. Die Luciferaseexpression wurde in den Lysaten gemessen und auf den Proteingehalt der Lysate bezogen („Relative Luciferaseexpression“). Wurde nur das Plasmid TNF-Promotor-Luciferase transfiziert, ergab sich die Grundexpression an Luciferase (Ansatz 1). Der Einsatz von siRNA steigerte die Expression kaum (Ansatz 2). Durch eine Hemmung von HDAC3 über HDAC3-siRNA wurde die TNF-Luciferaseexpression erhöht (Ansatz 3). Durch Zugabe von LPS konnte die Expression noch gesteigert werden (Ansatz 4). Eine Hemmung von HDAC3 und die gleichzeitige Zugabe von LPS ließ die Grundexpression um das Doppelte ansteigen (Ansatz 5). Ansatz 6 stellte die Positivkontrolle dar, hier wurde das Plasmid TNF-Promotor-Luciferase transfiziert und die THP-1-Zellen vor der Ernte noch für 20 min mit LPS stimuliert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder (N=3). Der Versuch wurde zusammen mit Audrey Varin durchgeführt.

Abkürzungen: HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; LPS = Lipopolysaccharid; Luc = Luciferase; siRNA = small interfering RNA; siRNA HDAC3 = gegen HDAC3 gerichtete siRNA

3.7 Bestimmung der TNF alpha-Expression durch Real-Time-PCR

3.7.1 Einfluss von HDAC3 auf die Expression von TNF alpha in THP-1-Zellen

Mit der Real-Time-PCR (s. 2.2.9.3) werden Nukleinsäuretemplates amplifiziert und können mittels einer spezifischen, farbstoffmarkierten Sonde nachgewiesen werden. Mit dieser Methode werden Molekülzahlen in einer cDNA-Probe untersucht. Die Real-Time-PCR wurde genutzt, um die Expression von TNF alpha, einem ATF-2-abhängigen Gen, zu bestimmen. Außerdem sollte ein möglicher Einfluss von HDAC3 auf die TNF alpha-Expression geprüft werden. Durch die zusätzliche Bestimmung von GaPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) kann die Expression von TNF alpha auf die Grundexpression von GaPDH bezogen werden, womit die Expression eines Gens in verschiedenen Versuchsbedingungen verglichen werden kann. Für diesen Versuch wurden THP-1-Zellen nach der Gabe von GM-CSF transfiziert und anschließend mit verschiedenen Substanzen inkubiert: Der MAP Kinase-Inhibitor SB202190 wurde jeweils eine Stunde vor der Zugabe von LPS zu den Zellen gegeben. Aus der isolierten RNA wurde cDNA für die Real-Time-PCR hergestellt. Die verwendeten Primer und die Sonde waren spezifisch für TNF alpha sowie für GaPDH (ein Enzym der Glykolyse) (von Schnakenburg et al., 2002).

Die Expression von GaPDH ist als Grundexpression zu sehen, auf die die Expression von TNF alpha bezogen werden kann („Quotient TNF alpha/GaPDH“). Die folgende Abb. 25 zeigt die Unterschiede zwischen den mit Leervektor und den mit HDAC3 transfizierten THP-1-Zellen. Durch Überexpression von HDAC3 wurde die TNF alpha-Expression in allen Ansätzen um etwa 50% reduziert, auch in der Kontrolle (Balken „ohne Zugabe“). Die durch LPS stimulierte TNF alpha-Expression wurde durch HDAC3 ebenso gemindert (Balken „LPS“). Die TNF alpha-Expression wurde durch Zugabe von LPS und SB202190 (Balken „LPS + SB202190“), aber auch von der alleinigen Zugabe von SB202190 (Balken „SB202190“) verringert, was die Rolle der MAP Kinase in diesem Prozess zeigte. Die jeweilige Expression wurde in diesen Ansätzen auch durch die Überexpression von HDAC3 vermindert, wie Abb. 25 darstellt.

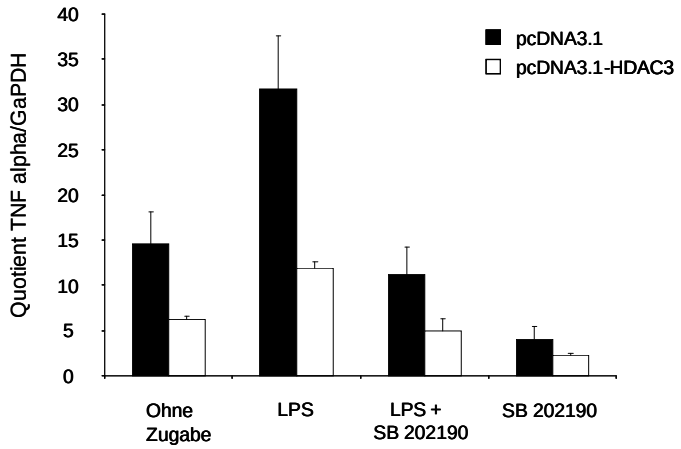


Abbildung 25: Darstellung einer Real-Time-PCR mit THP-1-Zellen – Untersuchungen zum Einfluss von LPS, SB202190 und HDAC3 auf die TNF alpha-Expression

THP-1-Zellen wurden mit Leervektor (schwarze Balken) oder HDAC3 (weiße Balken) transfiziert und nach einem Tag für 24 h mit GM-CSF stimuliert. Die Zellen wurden jeweils ohne Zugabe bzw. einzeln oder in Kombination mit LPS und SB202190 inkubiert. 100 µM SB202190 wurde 1 h vor dem LPS zu den Zellen gegeben, mit LPS wurde im Anschluss für 2 h stimuliert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen, dann wurde RNA isoliert und daraus cDNA synthetisiert. Je 5 µl cDNA wurden pro Real-Time-PCR-Ansatz eingesetzt. Es wurden jeweils Primer und Sonde für TNF alpha bzw. für GaPDH dazu gegeben. Die fertige Reaktion konnte dann am Real-Time-PCR-Gerät ausgewertet werden, da für jede Reaktion Molekülzahlen für TNF alpha und GaPDH ausgewiesen wurden. Die Expression von TNF alpha wurde auf die GaPDH-Expression bezogen („Quotient TNF alpha/GaPDH“).

Durch Transfektion von HDAC3 verringert sich jeweils der Quotient in allen Ansätzen, auch ohne Zusatz von Reagenzien („ohne Zugabe“). Außerdem wird die LPS-stimulierte Expression von TNF alpha durch HDAC3 ebenso gehemmt („LPS“). Durch LPS und den Kinase-Inhibitor SB202190 („LPS + SB202190“) verringert sich die TNF alpha-mRNA unter das Grundniveau; wird nur Kinase-Inhibitor dazu gegeben („+ SB202190“) fällt die TNF alpha-Expression stark ab. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (N=2).

Abkürzungen: GaPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierungsfaktor, LPS = Lipopolysaccharid, SB202190 = MAP Kinase-Inhibitor; TNF = Tumornekrosefaktor

3.7.2 Einfluss von TSA auf die TNF alpha-Expression in THP-1-Zellen

Um zu bestätigen, dass die Hemmung der TNF alpha-Expression durch HDAC3 ausgelöst wird, wurde in einem nachfolgenden Real-Time-PCR-Versuch der Einfluss von Trichostatin A (TSA), einem HDAC-Inhibitor getestet. Dazu wurden THP1-Zellen

entweder mit Leervektor oder mit HDAC3 transfiziert, anschließend unter verschiedenen Bedingungen inkubiert und die hergestellte cDNA in einer Real-Time-PCR eingesetzt. Die Auswertung ergab folgende Ergebnisse (Abb. 26): LPS stimulierte die TNF alpha-Produktion um mehr als das Doppelte („LPS“ im Vergleich zu „ohne Zugabe“). Zusätzlich hemmte HDAC3 die LPS-induzierte TNF alpha-Expression („LPS + HDAC3“). Diese Hemmung konnte durch den HDAC-Inhibitor Trichostatin A wieder aufgehoben werden („LPS + HDAC3 + TSA“). Die Expression von TNF alpha wurde auf die GaPDH-Expression bezogen („Quotient TNF alpha/GaPDH“).

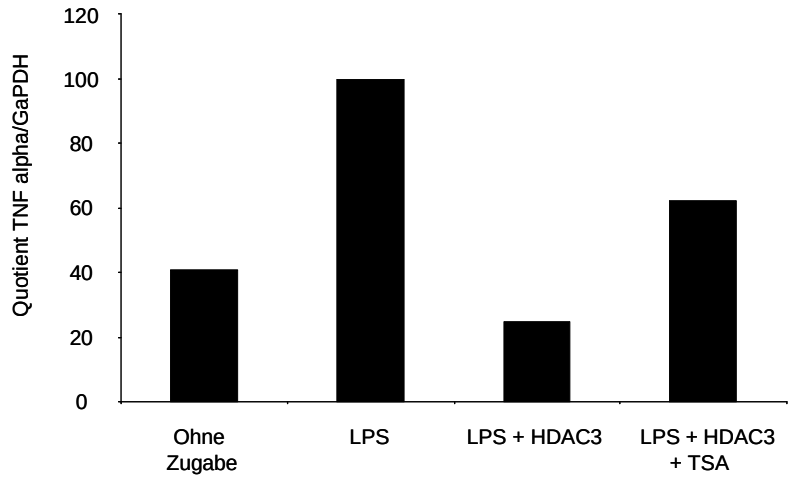


Abbildung 26: Auswertung einer Real-Time-PCR mit THP-1-Zellen – Untersuchungen zum Einfluss von HDAC3 und TSA auf die TNF alpha-Expression

Die gezeigte Abb. ist repräsentativ für die Real-Time-PCR unter den angegebenen Bedingungen. THP-1-Zellen wurden entweder mit Leervektor oder mit HDAC3 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 10 ng/ml GM-CSF stimuliert. Nach 48 h wurde ein Ansatz der Zellen ohne Zugabe von Reagenzien, ein weiterer für 1 h mit 1 µM TSA inkubiert. Anschließend erfolgte zu dem TSA sowie in einem separaten Ansatz eine Inkubation mit 500 ng/ml LPS für 2 h. Die Zellen wurden gewaschen, und es wurde RNA isoliert, aus der cDNA synthetisiert wurde. Je 5 µl cDNA wurden für die Real-Time-PCR eingesetzt, die verwendeten Sonden und Primer waren spezifisch für TNF alpha und GaPDH. Die als Ergebnis ausgewiesene Molekülzahl an TNF alpha je Probe wurde auf die Molekühlzahl GaPDH derselben Probe bezogen.

Abkürzungen: GaPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; LPS = Lipopolysaccharid; TNF = Tumornekrosefaktor; TSA = Trichostatin A

3.7.3 Messung der Expression von TNF alpha in AML-Patientenzellen

Um zu vergleichen, ob die Expression von TNF alpha auch *in vivo* durch HDAC3 gehemmt werden kann, wurden Makrophagen eines Patienten mit einer Akuten Myeloischen Leukämie (myelomonozytär) ähnlich wie THP-1-Zellen (s. Abb. 25 und 26) mit verschiedenen Reagenzien inkubiert. Die Makrophagen wurden anschließend für eine Real-Time-PCR vorbereitet, in der die TNF alpha-Expression untersucht werden sollte. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die Inkubationsbedingungen der Makrophagen vor der RNA-Isolierung.

Tabelle 5: Übersicht über die Inkubationsbedingungen der zur Untersuchung der TNF alpha-Expression verwendeten Makrophagen eines AML-Patienten

Inkubations-ansatz	Inkubationsbedingungen
1	Ohne Zugabe
2	LPS 500 ng/ml für 2 h
3	LPS 500 ng/ml für 2 h und SB202190 100 µM (1 h vor LPS-Gabe)
4	LPS 500 ng/ml für 2 h und TSA 1 µM (1 h vor LPS-Gabe)

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob sich die TNF alpha-Expression der AML-Zellen im Vergleich zu der Expression der Zelllinie THP-1 unterscheidet. Um einen möglichen Einfluss von Histon-Deacetylasen und Kinasen zu testen, wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt. Die Makrophagen des AML-Patienten wurden ohne vorherige Transfektion mit verschiedenen Reagenzien inkubiert (s. Tabelle 5), bevor RNA isoliert wurde. Die daraus synthetisierte cDNA wurde für eine Real-Time-PCR verwendet. Die verwendeten Sonden und Primer waren spezifisch für TNF alpha bzw. GaPDH. Abb. 27 zeigt repräsentativ eine Real-Time-PCR der verwendeten Makrophagen eines AML-Patienten. Die Expression von TNF alpha wurde in Relation zur Expression von GaPDH gesetzt.

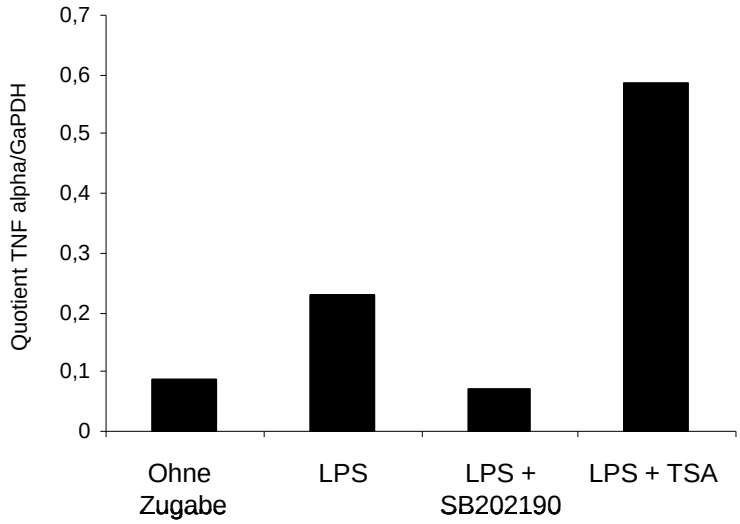


Abbildung 27: Untersuchung der TNF alpha-Expression in Makrophagen eines AML-Patienten mittels Real-Time-PCR nach Behandlung mit verschiedenen Reagenzien

Die Abb. zeigt die Auswertung einer repräsentativen Real-Time-PCR. Makrophagen eines AML-Patienten wurden mit verschiedenen Reagenzien inkubiert, aber nicht mit Plasmiden transfiziert. Aus der isolierten RNA wurde cDNA hergestellt. Die Real-Time-PCR wurde mit je 5 µl cDNA und mit TNF alpha- sowie GaPDH-spezifischen Primern und Sonden durchgeführt. Die Expression von TNF alpha wurde auf die Expression von GaPDH abgeglichen. Der Ansatz ohne Reagenzien („ohne Zugabe“) zeigt die Grundexpression von TNF alpha, die nach Zugabe von LPS um etwa das Dreifache anstieg. Nach Zugabe von LPS und dem Kinase-Inhibitor SB202190 sank die TNF alpha-Expression. Durch die Gabe von TSA konnte die Expression von TNF alpha gesteigert werden, obwohl kein HDAC3 transfiziert worden war.

Abkürzungen: GaPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; LPS = Lipopolysaccharid; SB202190 = Kinase-Inhibitor; TNF = Tumornekrosefaktor; TSA = Trichostatin A

Des weiteren sollte in AML-Patientenzellen die Expression von Interleukin 1 beta, das wie TNF alpha ein ATF-2-abhängiges Gen darstellt, durch Real-Time-PCR untersucht werden. Trotz mehrerer Versuche konnte kein Interleukin 1 beta detektiert werden. Allerdings war in jedem Real-Time-PCR-Experiment eine TNF alpha-Expression zu messen.

3.8 Interaktion von HDAC3 mit der p38 MAP Kinase delta (MAPK13)

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte eine mögliche Bindung der anderen p38-Isoenzyme (p38 alpha, gamma und delta) an HDAC3 mit Pulldown-Experimenten (s. 2.2.12) überprüft werden. Die einzelnen MAP Kinase-Proteine weisen eine etwa 50%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auf (Wang et al., 1997). Daher wurde untersucht, welche weitere MAPK an HDAC3 bindet. Mit Pulldown-Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die p38 MAP Kinase delta-Isoform an GST-HDAC3, aber nicht an das GST-Protein allein gebunden hatte. Allerdings konnte weder bei p38 MAP Kinase alpha (ohne Abb.) noch bei p38 gamma eine Interaktion mit HDAC3 nachgewiesen werden. Bei der MAP Kinase gamma-Isoform stellte sich heraus, dass die *in vitro* translatierte MAP Kinase gamma bereits an das GST-Protein gebunden hatte, was bedeutet, dass die Bindung an HDAC3 damit als negativ zu bewerten war (Abb. 28).

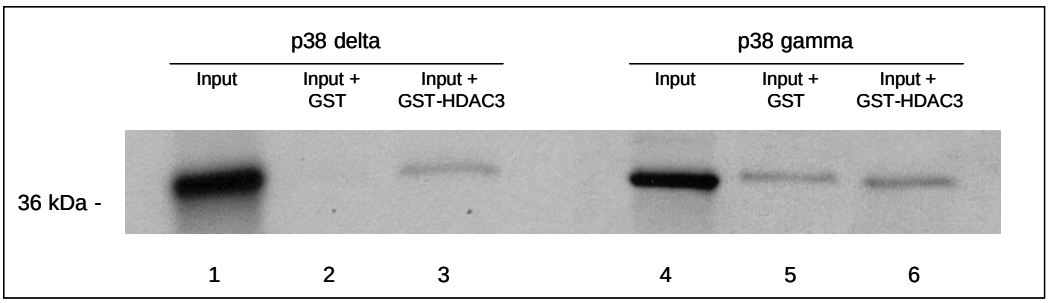


Abbildung 28: Darstellung radioaktiver Pulldown-Assays mit *in vitro* translatierter p38 MAP Kinase delta sowie p38 MAP Kinase gamma

Die Pulldown-Analyse mit der MAP Kinase delta ist links aufgetragen (Spur 1 bis 3), das Experiment mit MAP Kinase gamma ist rechts dargestellt (Spur 4 bis 6). Spur 1 und 4 zeigen etwa 20 µg der *in vitro* Translationen der MAP Kinase-Proteine p38 delta und gamma mit [^{35}S]–Methionin. Spur 2 und 5 stellen die Kontrolle der Pulldown-Ansätze mit *in vitro* Translationen und dem Kontrollprotein GST dar. In Spur 2 wurde keine Bindung nachgewiesen, während in Spur 5 eine Bindung statt gefunden hatte. Spur 3 zeigt den Nachweis der Bindung von radioaktiver MAP Kinase delta an HDAC3. Eine Bindung zwischen MAP Kinase gamma und HDAC3 fand dagegen nicht statt, denn hier hatte die *in vitro* translatierte MAP Kinase gamma an den Leervektor gebunden (Spur 5) sowie an das GST-HDAC3-Protein (Spur 6).

Abkürzungen: HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; p38 delta/gamma = p38 MAP Kinase delta/gamma; kDa = Kilodalton

3.9 Interaktion von HDAC3 mit den Proteinen Rab3a und SCG-10

Anhand der Far Western-Analysen konnte neben der Bindung von HDAC3 an zwei Isoenzyme der p38 MAP Kinase auch eine Interaktion mit anderen Proteinen gezeigt werden. Die Bindung von HDAC3 an Rab3a und SCG-10 wurde im Far Western nachgewiesen, denn auch hier zeigten sich positive Spots (ohne Abb.). Bisher sind keine Untersuchungen zu der Interaktion von Rab3a und HDAC3 bzw. SCG-10 und HDAC3 in der Literatur bekannt.

3.9.1 Rab3a, ein Mitglied der *ras*-Gen-Superfamilie, als potenzieller HDAC3-Bindungspartner

Rab3a gehört zu der *ras*-Gen-Superfamilie (Burstein et al., 1991). Die *ras*-Gen-Superfamilie wird in mehrere Gruppen aufgeteilt, wobei die erste Gruppe die klassischen *ras*-Gene sowie die *ral*-Gene und die *rras-Gene* enthält. Die *rho*-Gene gehören zu der zweiten Gruppe, und die *rab*-Gene zu der dritten (Albright et al., 1993; Huber et al., 1994; Takai et al., 2001). Die cDNA von Rab3a wurde 1989 neben noch sechs weiteren Rab-cDNAs kloniert. Die *Rab* Genprodukte bilden ein Polypeptid von etwa 23-25 kDa (Zahraoui et al., 1989), das Rab3a-Protein ist 25 kDA groß (Burstein et al., 1991). Die Rab-Proteine bekamen ihren Namen daher, weil sie zuerst im Rattengehirn isoliert wurden („Rat brain“). Die chromosomale Lokalisierung von Rab3a wurde mit der in situ Hybridisierung auf Chromosom 19p13.2 festgelegt (Rousseau-Merck et al., 1989). Die *rab*-Gene sollen eine regulatorische Funktion im sich entwickelnden Nervensystem haben. Bisher wurde keine onkogene Aktivität nachgewiesen, allerdings ist die 19p13.2-Stelle im Chromosom in maligne Prozesse, wie z.B. Akute Leukämien, involviert (Hromas et al., 2000). Die Gruppe um Trask et al. (Trask et al., 1993) lokalisierte Rab3a auf dem Chromosom 19p13.1-p12.

3.9.2 Nachweis der Bindung von HDAC3 an Rab3a mittels Pulldown-Analyse

Mit der Far Western-Methode konnte Rab3a als Bindungspartner von HDAC3 entdeckt werden (ohne Abb.). Zusätzlich wurden Pulldown-Experimente durchgeführt, um die Interaktion zu bestätigen. Abb. 29 stellt die Bindung zwischen Rab3a und HDAC3 dar.

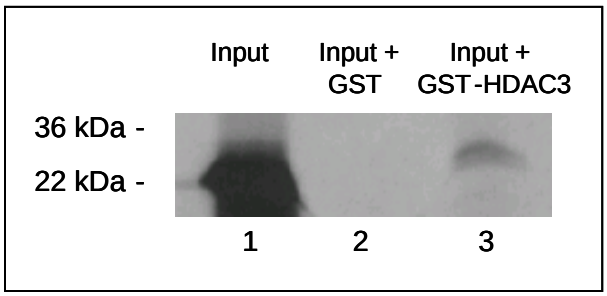


Abbildung 29: Pulldown-Experiment von *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem Rab3a mit prokaryotisch aufgereinigtem GST- sowie GST-HDAC3-Protein

Das Plasmid pQE30NST-Rab3a wurde unter Verwendung von [^{35}S]–Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert und mit prokaryotisch aufgereinigtem GST- bzw. GST-HDAC3-Protein in einem Pulldown-Experiment inkubiert. Die Ansätze wurden gewaschen und die von der Sepharose gelösten Proteine auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Trocknen des Gels wurde ein Film aufgelegt, der nach einer Woche entwickelt wurde. Spur 1: Input: etwa 20 µg *in vitro* translatiertes, radioaktiv markiertes Rab3a-Protein; Spur 2: Pulldown Rab3a + GST (Negativkontrolle, etwa 20 µg Protein), hier zeigte sich keine Bindung der beiden Proteine aneinander; Spur 3: Pulldown Rab3a + GST-HDAC3 (etwa 10 µg Protein). Spur 3 zeigt, dass eine Interaktion der beiden Proteine statt gefunden hatte.

Abkürzungen: HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; kDa = Kilodalton

3.9.3 Das neuronale Protein SCG-10 als potenzieller Bindungspartner von HDAC3

SCG-10 (superior cervical ganglion-10) ist auf dem Chromosom 8 lokalisiert und ist ein neuronales, mit Wachstum assoziiertes Protein, das eine hohe Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz mit dem Phosphoprotein Stathmin besitzt (Sobel et al., 1989). Die SCG-10-cDNA wurde in der Ratte 1988 zuerst von Stein et al. kloniert (Stein et al., 1988), die Gruppe um Okazaki et al. isolierte einen großen Teil des Maus-Gens (Okazaki et al., 1993). Das *SCG-10*-Genprodukt ist ein Protein von 21 kDa, dessen Expression besonders in der embryonalen und postnatalen Phase hoch ist (Stein et al., 1988). SCG-10 ist ein membrangebundenes Protein und liegt konzentriert in sich entwickelnden Neuronen vor (Stein et al., 1988). Die C-terminale Domäne von SCG-10 zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu dem ubiquitär vorhandenen Phosphoprotein Stathmin/Op18. Die beiden Proteine haben eine Homologie in der

Aminosäuresequenz der überlappenden Region von 74%. Stathmin ist *in vitro* und *in vivo* ein Substrat für viele Serin/Threonin-Kinasen wie z.B. MAP Kinase, PKA (Protein Kinase A) und $p34^{cdc2}$ Kinase (Antonsson et al., 1998; Neidhart et al., 2001). Es wurde außerdem herausgefunden, dass SCG-10 und Stathmin *in vitro* für dieselben Proteinkinasen als Substrate dienen (Antonsson et al., 1998). Möglicherweise besitzen beide Proteine eine ähnliche Funktion in unterschiedlichen Zellkompartimenten. In der aktuellen Literatur ist bisher kein Hinweis auf eine Interaktion zwischen SCG-10 und HDAC3 zu finden.

3.9.4 Nachweis der Bindung von HDAC3 an SCG-10 mittels Pulldown-Analyse

Anhand der Far Western-Methode konnte auch SCG-10 als Bindungspartner von HDAC3 detektiert werden (ohne Abb.). Mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem SCG-10-Protein sowie den bakteriell aufgereinigten GST- bzw. GST-HDAC3-Proteinen wurde ein Pulldown-Experiment durchgeführt, das die Bindung zwischen SCG-10 und HDAC3 bestätigte, wie Abb. 30 zeigt.

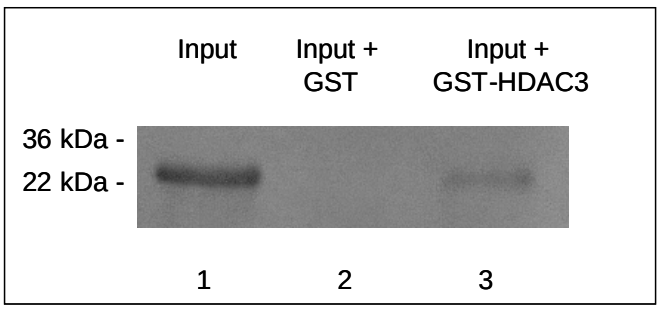


Abbildung 30: Pulldown-Experiment von *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem SCG-10-Protein mit prokaryotisch aufgereinigtem GST- sowie GST-HDAC3-Protein

Das Plasmid pQE30NST-SCG-10 wurde unter Verwendung von [^{35}S]–Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert und in einem Pulldown-Experiment mit aus Bakterien isoliertem GST- oder GST-HDAC3-Protein inkubiert. Nach Waschen der Ansätze wurden die an der Sepharose gebundenen Proteine durch Erhitzen gelöst und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Trocknen des Gels wurde ein Film aufgelegt, der nach sieben Tagen entwickelt wurde. Spur 1: Input, etwa 20 µg *in vitro* translatiertes SCG-10-Protein, Spur 2: Pulldown SCG-10 + GST (Negativkontrolle, 10 µg Protein); Spur 3: Pulldown SCG-10 + GST-HDAC3 (10 µg Protein), hier wurde die Bindung zwischen den beiden Proteinen nachgewiesen.

Abkürzungen: HDAC3 = Histon-Deacetylase 3; kDa = Kilodalton

3.10 Aufreinigung von rekombinantem HDAC3 aus SF-9-Insektenzellen

Bakterien wie *E. coli* spielen schon seit Jahren eine wichtige Rolle, um rekombinante Proteine in großen Mengen herzustellen. Eine Aufreinigung in Insektenzellen wird dagegen bevorzugt, wenn ein Protein eukaryotisch aufgereinigt werden soll und das Protein eine posttranslationale Modifizierung benötigt, um enzymatisch aktiv zu sein. HDAC3 sollte daher aus eukaryoten Zellen isoliert und aufgereinigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür SF-9-Insektenzellen verwendet. Die Transfektion von Insektenzellen mit dem Baculovirussystem hat mehrere Vorteile:

- die isolierten Proteine sind meist enzymatisch aktiv und löslich
- es können cDNAs bis zu einer Größe von 15 kb transfiziert werden
- die Arbeit mit dem Virussystem ist unschädlich für den Menschen
- unter optimalen Bedingungen können 1-5 mg Protein in einem Liter von Insektenzellen produziert werden

(Miesfeld, 2001; Zhang et al., 2000)

Bisher waren wenige Studien veröffentlicht worden, in denen die Aufreinigung einer Histon-Deacetylase mit dem Baculovirussystem beschrieben wurde. In einem Paper war die Isolierung von HDAC1 dargestellt (Hassig et al., 1997a), in einem weiteren die Aufreinigung von HDAC3 (Guenther et al., 2001), hier waren allerdings jeweils keine Untersuchungen zur Bestimmung der Kristallstruktur gemacht worden.
Das in dieser Arbeit aufgereinigte HDAC3-Protein diente als Positivkontrolle für Western Blot-Analysen. Außerdem sollte noch die Kristallstruktur aufgeklärt werden, was aber im Rahmen des Promotionsvorhabens nicht mehr durchgeführt werden konnte.
SF-9-Zellen wurden nach der Transfektion mit einer HDAC3-Virus-DNA (s. 2.2.15.9) lysiert und das Lysat mit Nickel-NTA-Agarose inkubiert. Durch die exprimierten Histidinreste kann das synthetisierte Protein an die Nickel-NTA-Agarose binden. Anschließend wurde das Protein eluiert. Die folgende Abb. 31 zeigt eine Western Blot-Analyse, bei der das Lysat und die Eluate aus infizierten SF-9-Zellen mit einem HDAC3-Antikörper inkubiert worden waren.

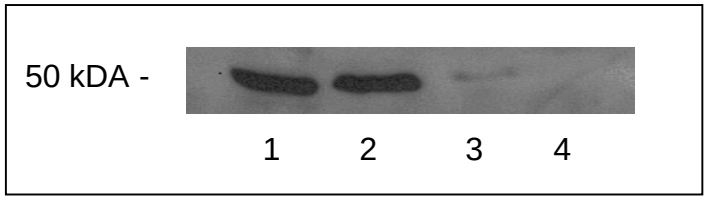


Abbildung 31: Western Blot-Analyse mit aufgereinigtem HDAC3-Protein aus SF-9-Insektenzellen

SF-9-Zellen wurden mit einer für HDAC3 spezifischen Virus-DNA infiziert, die Zellen lysiert und das Lysat über Nacht auf einer Ni-NTA-Agarose inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch auf eine Säule gegeben und der Durchlauf jeweils aufgefangen. Nach Waschschritten mit 5 mM- und 10 mM-Imidazol-haltigem Puffer wurde das HDAC3-Protein von der Ni-NTA-Matrix mit Puffern eluiert, die 500 mM, 1 M und 1,5 M Imidazol enthielten. Die Abb. zeigt eine Western Blot-Analyse, bei dem aufgereinigtes HDAC3 aus SF-9-Insektenzellen mit einem spezifischen HDAC3-Antikörper detektiert wurde. Spur 1: Erstes Eluat, nachdem das Lysat auf die Säule aufgegeben wurde; Spur 2: Eluat nach Elution mit 0,5 M Imidazol; Spur 3: Eluat nach Elution mit 1 M Imidazol; Spur 4: Eluat nach Elution mit 1,5 M Imidazol.

Abkürzung: kDa = Kilodalton

Die Abb. zeigt, dass HDAC3 in großen Mengen im Lysat enthalten war. HDAC3 konnte gut von der Säule eluiert werden. Schon mit einer Konzentration von 500 mM Imidazol waren fast 100% des Proteins von der NTA-Matrix eluiert. Die Inkubation der Säule mit 1 M bzw. 1,5 M Imidazol im Puffer brachte kaum bzw. keine zusätzliche Proteinelution mehr.

Um auszutesten, ab welcher Imidazolkonzentration das HDAC3-Protein schon eluiert werden kann, wurde neues Lysat aus infizierten SF-9-Zellen ebenfalls auf eine Ni-NTA-Agarose gegeben, über Nacht inkubiert und am nächsten Tag auf eine Säule gegeben. Die Matrix auf der Säule wurde dann mit 5 mM und 10 mM Imidazol im Puffer gewaschen. Anschließend wurde HDAC3 mit stetig steigenden Imidazolkonzentrationen von der Ni-NTA-Agarose eluiert. Hierbei zeigte sich, dass bei 20, 30 und 50 mM Imidazol eine ähnlich hohe Proteinmenge von der Ni-NTA-Matrix eluiert werden kann, wie die folgende Abb. 32 darstellt. Mit noch höheren Imidazolkonzentrationen konnte die Proteinmenge nicht weiter gesteigert werden.

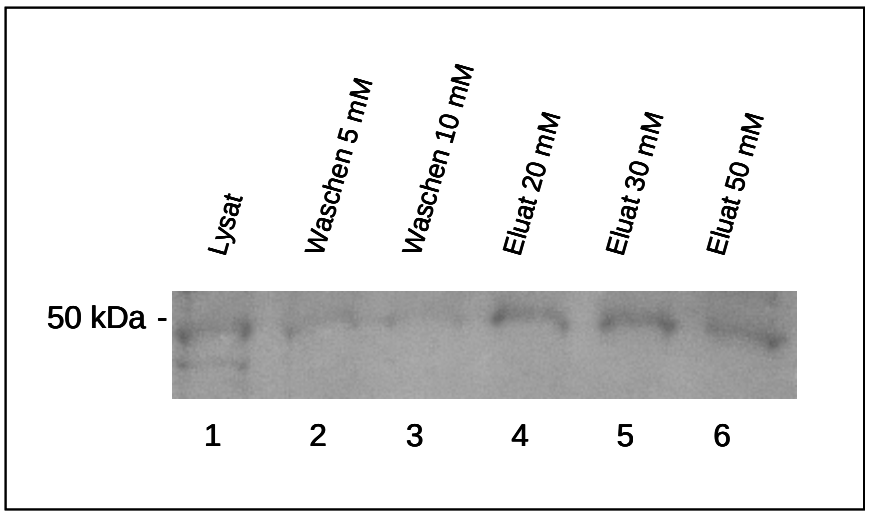


Abbildung 32: Nachweis der Aufreinigung von HDAC3-Protein aus infizierten SF-9-Zellen

SF-9-Zellen wurden mit einer HDAC3-Virus-DNA infiziert und die Zellen geerntet. Das Lysat wurde über Nacht mit einer Ni-NTA-Matrix inkubiert und das Gemisch am nächsten Tag auf eine Säule gegeben. Der erste Durchlauf enthielt das Lysat (Spur 1). Die Matrix wurde anschließend mit verschiedenen Puffern gewaschen, die 5 mM Imidazol (Spur 2) und 10 mM Imidazol (Spur 3) enthielten. Danach wurde mit 20 mM Imidazol im Puffer eluiert (Spur 4), dann mit 30 mM (Spur 5) und mit 50 mM (Spur 6).

Die Zugabe von Puffern mit noch höheren Imidazolkonzentrationen brachte keine gesteigerte Proteinelution (ohne Abb.).

Abkürzungen: kDa = Kilodalton, mM = millimolar

4 Diskussion

Die Untersuchung der „Genexpression“ ist in den letzten Jahren Gegenstand vieler Forschungsarbeiten geworden. Es soll weiter ermittelt werden, unter welchen Bedingungen Gene exprimiert werden und wann ihre Expression unterdrückt wird. Dabei kommt der Funktion von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) eine immer größere Bedeutung zu, denn diese beiden Enzymgruppen beeinflussen den Acetylierungszustand von Proteinen, insbesondere von Histonen, die zusammen mit der DNA einen Baustein des Chromatingerüsts bilden (Grunstein, 1997; Hassig and Schreiber, 1997). Der Acetylierungszustand von Histonen verändert wiederum die Verfügbarkeit von DNA für Transkriptionsfaktoren. Das Zusammenspiel zwischen Histon-Deacetylasen und Histonen bzw. Nicht-Histonproteinen ist in der letzten Zeit vermehrt untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher anfangs ein Screening durchgeführt, um weitere potenzielle Bindungspartner der Histon-Deacetylase 3 zu detektieren. Mittels der Far Western-Methode konnten mehrere Proteine (MAPK11, Rab3a, SCG-10 und MAPK13) als mögliche Interaktionspartner entdeckt werden. Die Bindung von HDAC3 an die beiden Proteine SCG-10 und Rab3a wurde in Pulldown-Experimenten bestätigt. Es wurden allerdings keine Immunpräzipitationen und keine funktionellen Assays durchgeführt, die bestätigen könnten, dass die Interaktion auch *in vivo* vorliegt. Die Bindung von HDAC3 an die MAP Kinase Isoform p38 beta 2 (MAPK11) war Inhalt weiterer Untersuchungen, da eine solche Interaktion in der Literatur noch nicht beschrieben worden war.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung der Interaktion der MAPK11 an HDAC3. Dabei sollte untersucht werden, ob bzw. inwieweit sich diese Proteine in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen und ob Einfluss auf Signalwege genommen werden kann, da alle MAP Kinasen in Signaltransduktionswege involviert sind und eine große Rolle bei der Signalweiterleitung eines Reizes von „außen“ in das Zellinnere spielen.

4.1 Identifizierung von HDAC3-Interaktionspartnern

4.1.1 Untersuchungen zur Interaktion von MAPK11 mit HDAC3

Erste Studien zu möglichen Interaktionspartnern von HDAC3 wurden mit der Far Western-Methode erstellt (Mahlknecht et al., 2001). Bereits in früheren Studien wurde die Interaktion von Histon-Deacetylasen mit z.B. BRCA-1, Retinoblastom und den beiden Proteinen RbAp46 und RbAp48 mit der Far Western-Analyse beschrieben (Yarden and Brody, 1999). Ferner wurde von Palaparti et al. (1997) mit dieser Methode nachgewiesen, dass der transkriptionelle Repressor Groucho mit dem Histon H3, aber nicht mit den anderen Histonproteinen interagiert. In dieser Arbeit konnte die Bindung der Histon-Deacetylase 3 mit der p38 MAP Kinase beta 2 zum ersten Mal gezeigt werden. Die verwendeten Membranen wurden vom RZPD (Referenz-Zentrum des Deutschen Humangenomprojekts) bezogen (Bussow et al., 1998). Es handelt sich dabei um eine Bindung von zwei prokaryotischen Proteinen, die noch weiter untersucht werden sollte.

Pulldown-Experimente sind zur Bestätigung von Proteininteraktionen geeignet, da anhand einer Negativkontrolle falsch positive Bindungsnachweise ausgeschlossen werden können. Dressel et al. (2001) beschrieben mit einem Glutathion S-Transferase-Pulldown die Interaktion zwischen HDAC7 und dem Transkriptionsfaktor MEF2 (myocyte enhancer factor 2), der die Expression von muskelspezifischen Genen kontrolliert. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der MEF2-Genexpression durch die N-terminale Domäne von HDAC7 vermittelt wird und die Deacetylase-Domäne nicht involviert ist. Ebenso wurde die Bindung von HDAC3 an RIP140 (receptor-interacting protein 140) mit der Pulldown-Methode beschrieben (Wei et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden im Anschluss an die Far Western-Methode ebenfalls Pulldown-Analysen angeschlossen, die die Interaktion von HDAC3 mit der MAP Kinase 11 bestätigten (Abb. 9). Außerdem wurde festgestellt, dass die Bindung der radioaktiv markierten MAP Kinase zwischen den Aminosäuren 31 bis 49 im HDAC3-Protein erfolgt (Abb. 10). Die Bindung der MAP Kinase 11 an HDAC3 findet damit am N-Terminus der Histon-Deacetylase statt. Die Interaktion befindet sich innerhalb der Oligomerisierungsdomäne von HDAC3, die die Aminosäuren der Positionen 1 bis 122 umfasst (Yang et al., 2002). Möglicherweise

beinhaltet die Fähigkeit von HDAC3 zur Oligomerisierung eine Funktion bei der Bindung an die MAP Kinase. Eventuell trägt auch die Struktur von HDAC3 als Oligomer zu einer verbesserten Repressorfunktion im nachgeschalteten Signaltransduktionsweg der Kinase bei. Allerdings lassen die Pulldown-Experimente keine genaue Aussage über eine mögliche Interaktion der beiden Proteine *in vivo* zu. Da Bakterien nicht bzw. kaum glykosylieren können, ist die Sekundärstruktur eines prokaryotisch hergestellten Proteins nicht unbedingt mit der eines eukaryotisch synthetisierten Proteins identisch (Baneyx, 1999). Daher sollte eine Untersuchung der Interaktion zweier Proteine nicht nur auf pro-, sondern auch auf eukaryotischer Ebene erfolgen.

Die Interaktion von Proteinen in Zelllinien lässt sich mit einer Immunpräzipitation überprüfen. Der weiter oben erwähnte Nachweis einer Bindung zwischen HDAC3 und RIP140 (receptor-interacting protein 140) wurde ebenfalls mit einer Immunpräzpitation bestätigt (Wei et al., 2000). In weiteren Studien wurde mit dieser Methode z.B. gezeigt, dass die Klasse II-HDACs im Gegensatz zu HDAC1 und 2 nicht im Multiproteinkomplex Sin3/NuRD zu finden sind (Grozinger et al., 1999). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass HDAC1 in der Maus über eine N-terminale Domäne zur Oligomerisierung fähig ist und als Homodimer in den Zellkern transportiert werden kann (Taplick et al., 2001). Die Interaktion der MAPK11 innerhalb der Oligomerisierungsdomäne von HDAC3 lässt auf den Einfluss eines HDAC3-Dimers auf den Kinase-Signalweg schließen. Möglicherweise kann ein Dimer des HDAC3-Proteins ebenfalls in den Zellkern wandern und dort auf die Genexpression der MAP Kinase bzw. auf die Expression von der Kinase nachgeschalteten Genen einwirken. Mit der Immunpräzipitation wurde hier gezeigt, dass die endogen exprimierten Proteine HDAC3 und MAPK11 miteinander interagierten (ohne Abb.). Außerdem konnte die Interaktion *in vivo* in beiden transfizierten Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 11). Mit Hilfe des Mammalian Two Hybrid Systems sollte die Bindung der beiden Proteine nochmals bestätigt werden.

Das Mammalian Two Hybrid System stellt eine weitere Methode zur Überprüfung der Bindung von HDAC3 und MAPK11 dar. Die für den Mammalian Two Hybrid-Assay

eingesetzten Plasmide sind in Abb. 12 schematisch dargestellt. Eine Interaktion der beiden Proteine der Positivkontrolle war bereits in der Literatur nachgewiesen worden (Finkel et al., 1993). In mehreren, unabhängig voneinander durchgeführten Mammalian Two Hybrid-Assays resultierte die Transfektion von COS-7-Zellen mit den Positivkontrollen jeweils in einer hohen Luciferaseexpression (ohne Abb.). Daher konnte angenommen werden, dass eine erhöhte Expression der Firefly Luciferase nach der Transfektion der Expressionsplasmide ebenfalls über eine Bindung der Proteine HDAC3 und MAPK11 zu Stande gekommen war. Die Messung der Luciferaseexpression in den Zelllysaten im Luminometer zeigte, dass eine Interaktion zwischen HDAC3 und der MAP Kinase stattgefunden hat (Abb. 13). Mit der Methode des Mammalian Two Hybrid-Assays sind allerdings keine Aussagen über die Wirkung der HDAC3-Bindung an die MAP Kinase möglich. In einer Arbeit von Lee et al. (2000) wurde mit dem Mammalian Two Hybrid System gezeigt, dass eine Koexpression von SMRT die Transaktivierung von AP-1 (activating protein-1), NFκB und SRF (serum response factor) dosisabhängig unterdrückt. Diese Repression konnte allerdings durch TSA aufgehoben werden, was darauf hinweist, dass Histon-Deacetylasen involviert sind. Entsprechend dieser Ergebnisse wurde bestätigt, dass eine Koexpression von HDAC1 und mSin3a einen hemmenden Effekt ausübt (Lee et al., 2000). Im Mammalian Two Hybrid-Assay kann allerdings noch keine Aussage über einen inhibitorischen Effekt von HDAC3 auf die Genexpression gemacht werden. Nachdem gezeigt wurde, dass auch endogen gebildetes HDAC3- und MAP Kinase-Protein interagieren können, sollte untersucht werden, ob ein möglicher Einfluss von HDAC3 auf die Funktion der MAP Kinase in der Signaltransduktion besteht.

Daher wurden Versuche mit dem PathDetect® *in vivo* signal transduction pathway trans-reporting system angeschlossen. Mit dieser Methode kann ein Einfluss von HDAC3 auf den MAP Kinase-Signaltransduktionsweg näher untersucht werden. Auch hier wird wie beim Mammalian Two Hybrid System die Expression eines Reportergens (*Firefly Luciferase*) gemessen. Die verwendeten Plasmide sind in Abb. 14 schematisch dargestellt. Mit dem PathDetect System konnte gezeigt werden, dass durch HDAC3 die Aktivität von ATF-2 vermindert wird (Abb. 15). ATF-2 ist ein Transkriptionsfaktor und wurde vor einigen Jahren als Histon-Acetyltransferase

identifiziert (Kawasaki et al., 2000). Transkriptionsfaktoren besitzen funktionelle Domänen, die für die DNA-Bindung oder die transkriptionelle Aktivierung zuständig sind. ATF-2 bindet an cAMP-response Elemente (CREs) und bildet entweder ein Homodimer oder mit c-Jun ein Heterodimer und stimuliert die CRE-abhängige Transkription. ATF-2 bindet *in vitro* an die Histone H2B und H4 (Kawasaki et al., 2000). ATF-2 ist ein Substrat für p38 beta, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Die Ergebnisse des Mammalian Two Hybrid-Assays lassen vermuten, dass HDAC3 dabei auf die Kinase und nicht direkt auf ATF-2 wirkt. Allerdings kann hier ein Einfluss von HDAC3 auf den Transkriptionsfaktor ATF-2 nicht ganz ausgeschlossen werden, da die Luciferaseexpression in Abb. 15 Ansatz 8 etwa 50% des Wertes in Ansatz 6 darstellt. Hätte HDAC3 keinen Effekt auf die Aktivität von ATF-2, dann sollte die Expression der Firefly Luciferase in Ansatz 6 höher sein. ATF-2 ist kein Substrat für p38 gamma (Li et al., 1996), was darauf hinweisen könnte, dass die Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Kinasen einen Einfluss auf ihre Bindungskapazität haben.

Um den Einfluss von HDAC3 auf eine Hemmung von ATF-2 *in vivo* zu zeigen, wurde durch die Transfektion einer HDAC3-spezifischen siRNA (small interfering RNA) die Expression von HDAC3 unterdrückt (Abb. 16). Durch Transfektion einer siRNA kann gezielt die Expression bestimmter mRNAs vermindert werden (Holen et al., 2002; Tuschl, 2001). Der Einsatz einer gegen HDAC1 und HDAC3 gerichteten siRNA wurde bereits in der Literatur beschrieben (Glaser et al., 2003). In dieser Studie wurde gezeigt, dass durch die Hemmung der Histon-Deacetylase-Expression in HeLa S3-Zellen morphologische Veränderungen hervor gerufen werden konnten, die mit denen von HDAC-Inhibitoren vergleichbar waren. Dagegen wurden mit einer gegen HDAC4 und HDAC7 gerichteten siRNA keine Veränderungen der Zellmorphologie in HeLa S3-Zellen erreicht, was darauf hindeutet, dass Klasse I-HDACs in der Regulierung von Zellproliferation und Apoptose in Krebszellen eher involviert sind als HDACs der Klasse II. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine HDAC3-Überexpression die Aktivität von ATF-2 stark vermindert (Abb. 16), während dagegen durch die HDAC3-siRNA die Repression der ATF-2-Aktivität wieder aufgehoben werden kann. Dadurch, dass HDAC3 nicht direkt auf ATF-2 wirkt, wie Abb. 15 vermuten lässt, wurde der Effekt auf die ATF-2-Aktivität in diesem

Ansatz wohl durch die MAP Kinase vermittelt. Diese These wird dadurch gestützt, dass bei Zugabe des Kinase-Inhibitors SB022190 die Expression der Luciferase stark abnimmt. Durch die Hemmung der Kinase war gleichzeitig keine Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 möglich, was auf die direkte Signalweiterleitung zwischen der MAP Kinase und dem Transkriptionsfaktor hinweist.

Für die Beantwortung der Frage, ob siRNAs in der Zelle nach der Transfektion stabil bleiben und ihren inhibitorischen Effekt ausüben können, konnte eine Hemmung der HDAC3-Expression sowohl in COS-7- als auch in U937-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 18 oben). Die anschließende Western Blot-Analyse der Lysate mit anti-Tubulin belegte, dass in jeder verwendeten Lysatprobe die gleichen Proteinmengen vorhanden waren (Abb. 18 unten). Damit wurde der Unterschied in der HDAC3-Expression durch eine unterschiedliche Menge des HDAC3-Proteins verursacht, und nicht durch ungleichmäßige Proteinmengen in den Lysaten. Der Effekt einer Hemmung von HDAC3 wurde z.B. in Abb. 16 gezeigt, da eine verminderte HDAC3-Expression zu einer erhöhten Aktivierung von ATF-2 führte.

Um den inhibitorischen Einfluss von HDAC3 auf die Kinase weiter zu charakterisieren, wurde untersucht, welche Domäne von HDAC3 bei diesem Prozess möglicherweise beteiligt ist. Mittels Mutagenese-PCR wurde in das Plasmid pcDNA3.1-HDAC3 durch Mutation der Basenabfolge ein Stopcodon eingebracht. Dadurch wurde die Deacetylasedomäne (AS 401-428) von HDAC3 nach der Transfektion nicht mehr exprimiert. In Abb 17. konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von HDAC3 ohne Deacetylasedomäne die Aktivität von ATF-2 steigern kann. Dies wird gestützt von Studien von Yang et al. (2002), die gezeigt hatten, dass der C-terminale Bereich von HDAC3 nicht nur für die Lokalisierung des Proteins im Zellkern, sondern auch für die transkriptionelle Repressorfunktion notwendig ist. Die Aktivierung von ATF-2 durch die MAP Kinase wird demnach durch die Deacetylasedomäne von HDAC3 unterdrückt. Der Effekt auf die ATF-2-Aktivität kann bei einem Fehlen der Deacetylasedomäne sogar im Vergleich zur Kontrolle sogar gesteigert werden, wenn die MAP Kinase nicht überexprimiert wird. Dies lässt den Schluss zu, dass endogen synthetisierte MAP Kinase in diesem Prozess involviert sein könnte, über die die Aktivierung von ATF-2 vermittelt werden kann. Im

Unterschied zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen wurde von Chan et al. (2003) beschrieben, dass der aminoterminale Bereich von HDAC4 ebenso wie das Volle-Länge-Protein in der Lage ist, MEF2 zu binden und dessen Expression zu unterdrücken. Hierbei ist der Carboxyterminus, in dem sich die Deacetylasedomäne befindet, nicht notwendig für die Repression. Im Gegensatz zu der Studie von Chan et al. (2003) waren Miska et al. (1999) vor einigen Jahren noch davon ausgegangen, dass die Deacetylasedomäne von HDAC4 für die Hemmung der Genexpression erforderlich ist. Wie weiter oben schon ausgeführt wurde, ist auch die Deacetylase-Domäne von HDAC7 nicht für die Hemmung der MEF2-Genexpression notwendig (Dressel et al., 2001). Diese Ergebnisse zeigen wie die Studien mit siRNAs (Glaser et al., 2003) einen Unterschied zwischen den Klasse I- und den Klasse II-HDACs .

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, mögliche Effekte von HDAC3 auf die MAP Kinase zu untersuchen. Um eine Aussage über den Phosphorylierungsstatus der MAPK11 unter Einfluss von HDAC3 zu machen, wurde ein *in vitro* Kinase Assay durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase 11 *in vitro* durch die Anwesenheit von HDAC3 vermindert wurde (Abb. 19). Möglicherweise blockiert HDAC3 die potenzielle(n) Phosphorylierungsstelle(n) von MAPK11 oder übergeordnete MAP Kinase Kinasen könnten in ihrer Aktivität durch HDAC3 ebenfalls gehemmt werden. In einer Untersuchung von Shin et al. (2003) wurde dagegen gezeigt, dass eine Gabe von HDAC-Inhibitoren die Aktivierung von p38 sowie von ERK-Kinasen vermindert. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit, denn hier wurde nachgewiesen, dass HDAC3 die Expression von MAPK11 verringert. Dieser Effekt könnte vermutlich durch die Gabe von HDAC-Inhibitoren wieder aufgehoben werden.

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung der MAP Kinase 11 auch *in vivo* durch HDAC3 beeinflusst wird, wurde die humane Histiozytom-Zelllinie U937 für weitere Studien eingesetzt. Diese Zellen exprimieren endogen MAPK11 oder ein Gemisch von MAP Kinasen und HDAC3. Eine Überexpression von HDAC3 wurde mit der Transfektion eines HDAC3-Plasmids gewährleistet. Es sollte geprüft werden, ob der Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase durch HDAC3 auch in einer Zelllinie verändert werden kann. In der Literatur ist schon seit längerem bekannt, dass MAP

Kinasen durch die Gabe von Lipopolysaccharid (LPS) induziert werden (Jiang et al., 1996; Lee et al., 1994). Ebenso wurde in den Versuchen hier verfahren: Die transfizierten Zellen wurden nach der Elektroporation für 24 h mit 10 ng/ml GM-CSF stimuliert und anschließend mit LPS in einer Konzentration von 1 µg/ml inkubiert. Diese Menge reicht sehr gut aus, um die Expression von p38 Kinasen zu induzieren (Jiang et al., 1996; Lee et al., 1994). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der phosphorylierten MAP Kinase grundsätzlich in den HDAC3-transfizierten U937-Lysaten geringer war als in den Lysaten aus U937-Zellen, die mit Leervektor transfiziert worden waren (Abb. 20). Der Verlauf der Aktivierung der MAPK11 zeigte, dass die Bildung der Phospho-Kinase schnell auf äußere Reize reagierte, was bedeutet, dass hier wahrscheinlich keine Neusynthese von Proteinen stattfand, sondern dass bereits synthetisierte Proteine, die in Vesikeln gespeichert waren, ins Zytoplasma abgegeben wurden. Eine weitere Studie von Koch et al. (2003) mit LPS-stimulierten Makrophagen zeigte einen ähnlichen Verlauf der p38-Phosphorylierung, allerdings war hier ein Maximum an phosphorylierter MAP Kinase nach 60 min erreicht, und nicht nach 14 min, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen. Im Gegensatz zu den hier angeführten Ergebnissen war bei Untersuchungen von Schmidt et al. (2001) ohne LPS-Gabe keine phosphorylierte p38 MAP Kinase nachzuweisen. Dies könnte durch den in dieser Studie verwendeten Antikörper bedingt sein, oder in den hier verwendeten Zellen lag schon endogen phosphorylierte MAP Kinase 11 vor, die dann ohne LPS-Stimulierung detektiert werden konnte. MAP Kinasen sind im allgemeinen in die frühe Geninduktion involviert („early response genes“) (Cheung et al., 2000; Thomson et al., 1999a). Um zu überprüfen, ob die Synthese der phosphorylierten Kinase ohne neue Proteinbiosynthese abläuft, könnte der Einsatz von Cycloheximid geeignet sein. Sano and Kitajima konnten 1996 nachweisen, dass eine Gabe von Cycloheximid die Proteinneusynthese um 97% hemmen kann, was durch den Einbau von radioaktivem Methionin bzw. Cystein gezeigt wurde.

In dieser Arbeit wurde zudem untersucht, ob sich der Phosphorylierungsstatus von ATF-2 ebenfalls durch die Überexpression von HDAC3 ändert. Ouwens et al. konnten 2002 nachweisen, dass ATF-2 an Threonin^{69} und Threonin^{71} phosphoryliert und damit aktiviert wird. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von

ATF-2 in Fibroblasten durch die Gabe von Insulin, Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und durch Serum gesteigert werden kann. Ein hemmender Einfluss von HDAC3 auf die Phosphorylierung von ATF-2 konnte auf Grund der bisher erzielten Ergebnisse angenommen werden. Anhand einer Western Blot-Analyse wurde nachgewiesen, dass in U937-Zellen die Expression von Phospho-ATF-2 bei HDAC3-Überexpression im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten U937-Zellen vermindert ist (Abb. 21). Der Verlauf der Aktivierung von ATF-2 war vergleichbar mit dem der MAPK11. Bei diesem Versuch war der Repression-Effekt durch HDAC3 allerdings nicht so ausgeprägt wie auf den Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase. Dies unterstützt die Ergebnisse des PathDetect-Experiments, die vermuten lassen, dass HDAC3 eher einen Effekt auf die Kinase als auf ATF-2 ausübt. Die Inkubation der jeweiligen Blots mit dem Tubulin-Antikörper zeigte, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden und Unterschiede in der Bandenintensität somit durch unterschiedliche Expressionen der untersuchten phosphorylierten Proteine zu Stande gekommen waren.

Die verwendete Zelllinie U937 ist ein Modell für ein Histiozytom (Paas and Fishelson, 1995). Eine Aussage über die Verhältnisse der Proteinexpressionen im Menschen kann daher nur mit Einschränkungen gemacht werden. Daher wurden für einen *in vivo*-Versuch Makrophagen eines Patienten verwendet, der an einer Akuten Myeloischen Leukämie (myelomonozytär) erkrankt war. Die Makrophagen wurden vom Universitätsklinikum Frankfurt zur Verfügung gestellt. Ein Einfluss von HDAC3 konnte allerdings nicht untersucht werden, weil diese Makrophagen als Primärzellen sehr schlecht zu transfizieren sind (Li et al., 2001). Es zeigte sich, dass die Gabe von LPS in den Makrophagen des AML-Patienten zu einem Anstieg der phosphorylierten Kinase führte. Das Grundniveau von Phospho-MAPK11 war hier sehr niedrig bzw. kaum zu erkennen. Nach 7 min war ein starker Anstieg der phosphorylierten MAP Kinase 11 zu verzeichnen, der nach 14 min wieder abfiel und nach 21 min nur noch gering vorhanden war. Dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, zeigte die Inkubation des Blots mit dem Tubulin-Antikörper (Abb. 23). Dies deutete darauf hin, dass in Patientenmakrophagen ähnliche Proteinexpressionsmuster vorlagen wie in den verwendeten U937-Kulturzellen. Inwieweit allerdings Substanzen, die in der Zellkultur eingesetzt werden, um die Proteinexpressionen zu hemmen bzw. zu

stimulieren (z.B. Inhibitoren von MAP Kinasen oder von Histon-Deacetylasen, oder auch LPS), einen ähnlichen Effekt auch *in vivo* haben, kann nicht genau beurteilt werden. Daher sollte eine Applikation von Inhibitoren oder anderen Substanzen zuerst im Tiermodell ausgetestet werden, bevor Versuche am Menschen gemacht werden.

Der Einfluss von HDAC3 auf ATF-2, einen Transkriptionsfaktor, der der Kinase nachgeschaltet ist (Kawasaki et al., 2000), wurde bisher in der vorliegenden Arbeit untersucht. Es sollte ferner geprüft werden, inwieweit TNF alpha, ein ATF-2-abhängiges Gen, durch eine Hemmung der HDAC3-Expression beeinflusst wird (Abb. 24). Zusätzlich zur Transfektion eines TNF-Luciferase-Promotor-Plasmids sollte der Einfluss einer HDAC3-siRNA untersucht werden. Durch die Transfektion von HDAC3-siRNA stieg die Luciferaseexpression an. Dieser Effekt wurde durch die Stimulierung der Zellen mit LPS noch verstärkt. Dies könnte so interpretiert werden, dass HDAC3 die Bildung von TNF durch die Hemmung des TNF-Promotors in den Zellen normalerweise unterdrückt, und dass dieser Effekt durch die reprimierte HDAC3-Expression aufgehoben werden kann. Vanden Berghe et al. konnten 1999 nachweisen, dass eine Hemmung der HDAC-Aktivität durch TSA den Effekt einer TNF alpha-abhängigen Genexpression verstärken kann. Dieser Nachweis bestätigt die in dieser Arbeit durch die Real-Time-PCR erzielten Ergebnisse. Die Messung der TNF alpha-Expression in der Real-Time-PCR wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Es zeigte sich, dass die durch HDAC3 unterdrückte TNF-Expression durch die Gabe von TSA, einem HDAC-Inhibitor, aufgehoben werden konnte.

Für eine weitere Untersuchung der Expression des Einflusses von HDAC3 auf die TNF alpha-Expression wurde ebenfalls die Real-Time-PCR genutzt. Durch die Überexpression von HDAC3 wurde in allen Ansätzen die TNF alpha-Expression vermindert (Abb. 25). Die Gabe von SB202190, einem Kinase-Hemmer, reduzierte die Expression ebenfalls, wobei eine gleichzeitige LPS-Inkubation die Hemmung wieder aufhob. Durch die alleinige Gabe von LPS konnte die Expression von TNF alpha um ein Vielfaches gesteigert werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass HDAC3 in der Lage ist, die Expression von TNF alpha bereits auf RNA-Ebene, d.h.

im Bereich der Transkription, z.B. durch Inhibition des TNF-Promotors oder vorgeschalteter Transkriptionsfaktoren, zu beeinflussen. Dieses Ergebnis lässt sich auch aus Abb. 24 ableiten. Eine in der Literatur beschriebene ähnliche Studie hatte gezeigt, dass eine Überexpression von Histon-Deacetylasen zu einer Hemmung der TNF alpha-Transkription führt (Tong et al., 2004). Dies ist vergleichbar mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, denn durch die HDAC3-Überexpression war eine Hemmung der TNF alpha-Expression zu erkennen.

Die Makrophagen eines AML-Patienten wurden ebenfalls mit LPS, TSA und SB202190 behandelt. Hier wurde allerdings nicht mit HDAC3 transfiziert. Bei diesen Zellen war eine Induktion der Expression von TNF alpha nach LPS-Gabe sichtbar (Abb. 27). Die Expression von TNF alpha wurde durch die gleichzeitige Gabe von LPS und SB202190 gehemmt. Nach LPS- und TSA-Gabe stieg die Expression dagegen an, was bedeutet, dass in diesen Zellen das endogen exprimierte HDAC3 durch die Gabe von TSA gehemmt wurde. Auch ohne eine HDAC3-Überexpression wurde demnach wohl die Repression des TNF-Promotors aufgehoben und die Expression von TNF stieg an.

Ein weiteres Ziel dieses Promotionsvorhabens bestand darin zu klären, ob HDAC3 auch an andere MAP Kinase-Isoenzyme bindet. Dazu wurden Pulldown-Experimente durchgeführt, die zeigten, dass HDAC3 auch an die p38 MAP Kinase delta (MAPK13) gebunden hatte (Abb. 28). Hierzu wurden bisher allerdings keine weiteren Untersuchungen wie z.B. Immunpräzipitationen mehr durchgeführt. Eine Bindung von HDAC3 an p38 alpha (ohne Abb.) oder p38 gamma konnte nicht nachgewiesen werden. Die radioaktiv markierte p38 gamma-Isoform hatte bereits an das GST-Kontrollprotein gebunden, was bedeutete, dass eine weitere Bindung an HDAC3 als negativ zu bewerten war. Es ist daher denkbar, dass die Unterschiede zwischen den Kinase-Isoformen (z.B. über die Aminosäuresequenz und die Sekundärstruktur) zu einem veränderten Interaktionsverhalten führen könnten. Mit der Isolierung und Identifizierung der p38 MAP Kinase-Isoform delta konnte gezeigt werden, dass p38 delta (MAPK13) zu p38 alpha eine 57%ige Homologie in der Aminosäuresequenz besitzt (Wang et al., 1997). Außerdem ist p38 delta zu 55% homolog zu p38 beta und zu 62% der Aminosäuresequenz von p38 gamma ähnlich. Dadurch kann vermutet

werden, dass p38 delta trotz geringerer Homologie zu p38 beta (als z.B. p38 gamma) in dem Bereich des Proteins, der an HDAC3 bindet, eine gleiche oder zumindest ähnliche Aminosäuresequenz besitzt. Ein Unterschied in der Tertiärstruktur der verschiedenen p38 MAP Kinase-Proteine könnte dann zu einem unterschiedlichen Interaktionsverhalten mit HDAC3 führen.

4.1.2 Interaktion von HDAC3 und Rab3a

Rab3a gehört zur *ras*-Superfamilie (Familie der kleinen G-Proteine). Inzwischen besteht die Familie der Rab-Proteine aus 60 Mitgliedern. Rab ist eine GTPase und benötigt für diese Funktion einen Isoprenylrest am C-Terminus (Pereira-Leal et al., 2003). Rab3a reguliert Ca^{2+}-abhängig die Exozytose von Neurotransmittern (Kawabe et al., 2003) und auch von Insulin (Regazzi et al., 1996; Yaekura et al., 2003). Das Rab3a-Protein ist 25 kDA groß (Burstein et al., 1991). Rab3a wird vor allem im neuralen Gewebe, aber auch im endokrinen Gewebe exprimiert (Burstein et al., 1991; Park et al., 2002). *Rab3a* ist auf dem Chromosom 19p13.2 lokalisiert, das bei malignen Erkrankungen wie Akuten Leukämien beteiligt sein kann (Hromas et al., 2000; Trask et al., 1993). Bisher ist noch keine Verbindung zwischen Rab3a und HDAC3 in der Literatur bekannt.

In dieser Arbeit wurde eine Interaktion zwischen prokaryotischen HDAC3 und dem Rab3a-Protein mittels Far Western-Analyse (ohne Abb.) und mit der Pulldown-Methode gezeigt (Abb. 29). Die Ergebnisse lassen allerdings bisher noch keine Aussage über die Bindung dieser beiden Proteine *in vivo* zu. Weitere Untersuchungen wären erforderlich, um die Interaktion von HDAC3 und Rab3a zu manifestieren, außerdem wären funktionelle Assays wichtig, um den möglichen Einfluss von HDAC3 auf Signalkaskaden, bei denen Rab3a involviert ist, zu untersuchen.

Rab3a wird verstärkt im Gehirn sowohl bei Mäusen (Olofsson et al., 1988) als auch beim Menschen exprimiert (Zahraoui et al., 1989). Eine gewebespezifische Expression von Rab3a könnte durch eine spezielle Funktion von Rab3a in diesen Geweben bedingt sein. Ein Einfluss von HDAC3 auf Rab3a könnte eventuell

vorhanden sein, andererseits könnte die Interaktion von HDAC3 an Rab3a auch nur *in vitro* zu Stande gekommen sein, ohne dass sie *in vivo* existiert.

Bisher ist in verschiedenen Studien untersucht worden, welche Funktion die Rab-Proteine in Geweben ausüben. Dabei wurde heraus gefunden, dass eine Dysfunktion von Rab27A zum sog. „Griscelli“ Syndrom führt (Izumi et al., 2003; Menasche et al., 2003; Pereira-Leal et al., 2001). Dabei kommt es einerseits zu Pigmentstörungen von Haaren und der Haut, andererseits aber auch zu Immundefekten beim Menschen. Ein Defekt im Protein Rab-Geranylgeranyl-Transferase führt zum sog. „Hermansky-Pudlak“ Syndrom (Pereira-Leal et al., 2001; Richards-Smith et al., 1999; Seabra et al., 2002). Bei dieser Erkrankung kommt es ebenfalls zu einer Hypopigmentierung der Haut (partieller Albinismus). Eine Hemmung der Rab27-Funktion durch HDAC3 in diesem Zusammenhang wäre denkbar, aber bisher noch nicht nachgewiesen worden.
Bei der Signalkaskade, die über die Ras- und Raf-Proteine zu einer Aktivierung von MAP Kinasen führen (Takai et al., 2001), könnte ein inhibitorischer Effekt durch HDAC3 vermutet werden. Rab3a bindet wie ras in seiner inaktiven Form GDP und wird durch die Bindung von GTP aktiviert. Hier wäre es möglich, dass HDAC3 einen hemmenden Einfluss haben könnte, so dass die Kinase-Signalkaskade unterbrochen werden kann. Andererseits könnte durch eine spezifische Hemmung mit HDAC-Inhibitoren ein möglicher HDAC-Effekt aufgehoben werden.

Rab-Proteine besitzen eine wichtige Funktion beim Vesikeltransport (Zerial and McBride, 2001). Eine Freisetzung von Neurotransmittern wird u.a. über Phosphorylierung reguliert. Es wurde herausgefunden, dass Rabphilin3a, ein mit Rab3a interagierendes Protein, *in vitro* von der Ca^{2+}/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II phosphoryliert wird. Diese Kinase phosphoryliert Rabphilin3a an den Aminosäuren in den Positionen 234 und 274. Außerdem wurde in dieser Studie nachgewiesen, dass die PKA Rabphilin3a an der AS in Position 234 ebenfalls phosphorylieren kann (Fykse et al., 1995).

Studien mit Rab3a-exprimierenden Mäusen [Rab3a(+/+)] sowie Rab3a-Knockout-Mäusen [Rab3a(-/-)] haben gezeigt, dass Rab3a eine wichtige Funktion bei der Freisetzung von Insulin spielt (Yaekura et al., 2003). Es wurden keine Unterschiede bei der Zellmasse der Inselzellen und bei der Insulinproduktion zwischen [Rab3a(-/-)]- und [Rab3a(+/+)]-Mäusen festgestellt. Inzwischen wurde nachgewiesen, dass neben Rab3a auch Rab27a in beta-Zellen des Pankreas exprimiert wird. Allerdings scheinen beide Proteine eine unterschiedlichen Einfluss auf die Insulinfreisetzung zu haben (Izumi et al., 2003). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass ein Gleichgewicht zwischen den beiden Proteinen die Freisetzung von Insulin reguliert. Eine gestörte Freisetzung des Insulins könnte durch eine HDAC3-induzierte Hemmung der Rab-Proteine bei diesen Vorgängen erklärt werden. Über HDAC-Inhibitoren könnte möglicherweise eine verstärkte Rab-Expression und damit Insulinfreisetzung induziert werden.

4.1.3 Interaktion von HDAC3 mit dem neuronalen Protein SCG-10

SCG-10 ist ein Protein von 21 kDa, das besonders in der embryonalen und postnatalen Phase in großem Umfang gebildet wird (Stein et al., 1988). SCG-10 (superior cervical ganglion-10) kommt an Membranen gebunden vor und ist hoch konzentriert in sich entwickelnden Neuronen. Stein et al. isolierten als erste Gruppe die SCG-10 cDNA in der Ratte (Stein et al., 1988). Die Forschungsgruppe um Okazaki klonierte einen großen Teil des Mausgens (Okazaki et al., 1993). SCG-10 hat eine hohe Homologie in der Aminosäuresequenz zu Stathmin (Zhu et al., 1989). Stathmin kommt ubiquitär vor und gehört zu den zytosolischen Proteinen. Es bindet Tubulin und wird über extrazelluläre Effektoren reguliert bzw. phosphoryliert (Sobel et al., 1989). Außerdem werden zelluläre Mikrotubuli durch Stathmin destabilisiert (Liedtke et al., 2002). SCG-10 ist (wie Stathmin) ein Substrat für verschiedene Kinasen wie z.B. MAP Kinase oder PKA (Antonsson et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde eine Bindung von prokaryotisch aufgereinigtem HDAC3 an SCG-10 mit der Far Western-Methode gezeigt (ohne Abb.). Die Pulldown-Analyse von HDAC3 mit SCG-10 weist auf eine mögliche Bindung beider Proteine hin (Abb. 30). Auch hier fehlen noch weitere Untersuchungen, die zeigen, dass diese beiden

Proteine auch *in vivo* interagieren. Zum einen könnten Immunpräzipitationen prüfen, ob die beiden Proteine *in vivo* interagieren, zum anderen könnte durch Mutationsanalysen untersucht werden, in welchem Bereich von HDAC3 das SCG-10-Protein bindet. Es könnte außerdem erforscht werden, ob die hemmende Wirkung von SCG-10 auf die Tubulinbildung durch HDAC3 vermittelt wird. Es wurde bereits gezeigt, dass HDAC6 Tubulin und Mikrotubuli deacetylieren kann (Zhang et al., 2003). Eine Interaktion bzw. gegenseitige Beeinflussung von Histon-Deacetylasen und SCG-10 ist hier denkbar. Bisher sind kaum Studien über die Rolle von SCG-10 im Zusammenhang mit HDACs bekannt. SCG-10 ist ein Substrat für MAP Kinasen, ebenso wie ATF-2 ein Substrat für die MAPK11 darstellt. Daher kann ein inhibitorischer Effekt von HDAC3 bei der Phosphorylierung von SCG-10 vermutet werden. HDAC3 könnte ebenfalls inhibierend auf die Expression von SCG-10 wirken, z.B. indirekt über die Hemmung der p38 MAP Kinase.

Aktuelle Studien zeigen, dass SCG-10 als Protein, das für Neuronen-spezifisches Wachstum verantwortlich ist, in einen Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit gebracht wird. Sowohl SCG-10- als auch Stathmin-mRNAs werden in bestimmten neuronalen Populationen des alternden Gehirns nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass die SCG-10-Proteinmenge in den Zellen des Gehirns ansteigt, die von der Alzheimer Erkrankung betroffen sind (Okazaki et al., 1995).

Der MAP Kinase Signaltransduktionsweg ist bei der Alzheimer Krankheit ebenfalls beeinflusst. MAP Kinasen phosphorylieren Proteine, die bei der Alzheimer Erkrankung beteiligt sind. Alle Kinase-Signaltransduktionswege, vor allem die ERK, JNK und p38-Signalwege, sind bei der Pathophysiologie und der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung involviert. Die ERKS sind u.a. beteiligt am Mechanismus des LTP (long term potentiation), der dem Lernen und der Erinnerung unterliegt. Die basal exprimierten Mengen von p38 MAP Kinasen sind in Neuronen sehr hoch. Auch diese Kinasen könnten eine Rolle bei LTP spielen (Zhu et al., 2002). *Ras* aktiviert den ERK-Signaltransduktionsweg, daher wird eine veränderte Expression von *Ras* bei der Alzheimer Erkrankung diskutiert (Ferrer et al., 2001). HDACs könnten hier einen Einfluss auf den Signaltransduktionsweg haben. Bisher gibt es noch keine Studien über einen Zusammenhang zwischen Histon-Deacetylasen und der

Alzheimer Erkrankung. Durch weitere Untersuchungen bei Erkrankungen wie Alzheimer könnte ein möglicher Einfluss von HDAC3 geprüft werden.

SCG-10 ist in Neuronen hoch exprimiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass SCG-10 von c-Jun-Kinasen sowie p38 MAP Kinasen phosphoryliert werden kann. Eine Phosphorylierung von SCG-10 vermindert dessen Fähigkeit zur Destabilisierung von Tubulin (Neidhart et al., 2001). Da p38 MAP Kinasen in Neuronen ebenfalls stark exprimiert werden und eine Rolle bei der Übertragung von Informationen sowie der neuronalen Differenzierung spielen, kann vermutet werden, dass einerseits ein Einfluss von HDAC3 bzw. Histon-Deacetylasen allgemein möglich ist. Andererseits könnte eine Fehlfunktion von SCG-10 oder p38 MAP Kinasen durch die Repressoreigenschaft von HDAC3 z.B. bei Krankheiten wie Alzheimer diskutiert werden.

Die Expression neuronaler Gene wird in nicht-neuronalen Geweben durch einen Transkriptionsfaktor unterdrückt, der REST (RE1-silencing transcription factor) genannt wurde (Thiel et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass REST ein Zinkfingerprotein ist und zusammen mit Sin3 und HDAC1 einen Komplex bildet. Wird HDAC1 durch die Gabe von TSA gehemmt, kommt es in nicht-neuronalen Zellen zur Expression von u.a. SCG-10 und Cholinacetyltransferase. Die Expression von SCG-10 in nicht-neuronalen Zellen (ohne Zugabe eines HDAC-Inhibitors) ist noch nicht beschrieben worden (Naruse et al., 1999). Eine Bindung von HDAC3 und SCG-10 könnte möglicherweise indirekt über REST zu Stande kommen. Kürzlich wurde der Proteinkomplex von REST, Sin3, HDAC1 und HDAC2 untersucht und gezeigt, dass dieser Komplex auf die Expression von Genen unterschiedlich wirken kann (Belyaev et al., 2003). Bisher wurde eine direkte Interaktion von SCG-10 und HDAC3 noch nicht nachgewiesen. Weitere Studien sind nötig, um eine Bindung zu verifizieren und einen möglichen gegenseitigen Effekt der Proteine zu prüfen.

4.2 Aufreinigung von HDAC3 aus SF9-Insektenzellen

Die Aufreinigung von Histon-Deacetylasen aus SF-9-Insektenzellen war bei Beginn dieses Promotionsvorhabens in der Literatur kaum beschrieben worden. Da es sich

bei SF-9-Zellen um eukaryotische Zellen handelt, die daher Proteine posttranslational modifizieren können, wurde diese Zelllinie gewählt, um das HDAC3-Protein aufzureinigen. Die Aufreinigung aus prokaryotischen Bakterienzellen kann zu einer veränderten Sekundärstruktur des HDAC3-Proteins führen, da Bakterien ein gebildetes Protein nicht oder kaum posttranslational modifizieren können (Baneyx, 1999). Für die SF-9-Zellen wurde das Baculovirus-Expressionssystem genutzt (Invitrogen).

Die Aufreinigung von HDAC3 aus den infizierten Insektenzellen konnte erfolgreich durchgeführt werden. Das isolierte Protein diente bei Western Blot-Analysen als Kontrolle für den HDAC3-Antikörper. HDAC3 konnte von der Ni-NTA-Matrix schon mit niedrigen Imidazolkonzentrationen (etwa 50 mM) im Puffer eluiert werden. Dies hätte den Vorteil, dass wenig Imidazol aus dem Eluat entfernt werden müsste, um das Eluat für eine Bestimmung der Tertiärstruktur einzusetzen. Die Aufklärung der Kristallstruktur von HDAC3 war ein weiteres Ziel, dies konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Inzwischen sind mehrere Forschungsarbeiten bekannt, die die Aufreinigung von Histon-Deacetylasen aus infizierten Insektenzellen beschreiben. In früheren Studien wurde HDAC1 mit einem Flag-Rest mit dem Baculovirussystem aufgereinigt. Dabei wurde herausgefunden, dass HDAC1 für die repressive Aktivität von mSin3a nötig ist (Hassig et al., 1997a). HDAC3 wurde inzwischen mit einem Flag-Rest mit dem Baculovirussystem aufgereinigt. Dabei zeigte sich, dass „pures“ HDAC3 ohne weitere Proteinkomponenten keine enzymatische Aktivität besaß (Guenther et al., 2001). In einer weiteren Untersuchung wurde außerdem festgestellt, dass für eine volle Aktivität von HDAC3 eine Proteinfaltung notwendig ist, die über einen sog. TCP-Ring-Komplex unter Verbrauch von ATP vermittelt wird (Guenther et al., 2002). In einer aktuellen Arbeit ist die Aufreinigung von HDAC1 und HDAC3 aus SF-9-Zellen beschrieben worden. Bei dieser Studie wurde herausgefunden, dass beide Proteine nach der Aufreinigung sowohl löslich als auch enzymatisch aktiv waren (Hu et al., 2003). Dagegen besagt die oben erwähnte Studie, dass aufgereinigtes HDAC3 ohne weitere Proteinkomponenten enzymatisch inaktiv ist (Guenther et al., 2001).
Eine Bestimmung der Tertiärstruktur von HDAC3 ist bisher allerdings noch nicht

publiziert worden. Inzwischen ist die Kristallstruktur des katalytischen Zentrums von SIRT2 veröffentlicht worden (Finnin et al., 2001). Die Untersuchung der Kristallstruktur von HDAC3 könnte z.B. zu einem gezielten „Design“ von HDAC-inhibierenden Reagenzien genutzt werden. Anhand der bisherigen Studien ist nur wenig über eine effektive Hemmung einzelner HDAC-Isoformen bekannt. Erst vor kurzem wurde heraus gefunden, dass TSA viele Klasse I-HDACs in einer niedrigen Konzentration hemmen kann, und dass HDAC8 z.B. eher insensitiv gegenüber dem HDAC-Inhibitor MS-27-275 ist (Hu et al., 2003). Weitere Studien zur Effektivität von HDAC-Hemmstoffen könnten erfolgreich durchgeführt werden, wenn die Kristallstruktur der einzelnen Histon-Deacetylasen bekannt wäre.

4.3 Die Art der Modifizierung von Histonen entscheidet über die Genexpression

4.3.1 Der Einfluss der Histon-(De-)Acetylierung auf die Genexpression

Die Verfügbarkeit von DNA entscheidet darüber, ob ein Gen exprimiert wird oder ob seine Expression unterdrückt wird. DNA ist im Zellkern um basische Proteine, die Histone, gewunden. Diese Histone werden u.a. von zwei Enzymgruppen modifiziert: Histon-Deacetylasen deacetylieren Lysinreste an Histonen, während Histon-Acetyltransferasen Acetylgruppen an die Lysinreste anlagern. Die Deacetylierung der Histone führt zu einem dichter gepackten Chromatin, die Acetylierung lockert das Chromatingerüst auf und ermöglicht Transkriptionsfaktoren und anderen DNA-bindenden Regulatoren einen besseren Zugriff auf die DNA (Grunstein, 1997; Hassig and Schreiber, 1997; Kuo and Allis, 1998). Dass Histonreste modifiziert werden können, wurde schon in den 60er-Jahren entdeckt (Allfrey et al., 1964). Der molekulare Hintergrund blieb allerdings Jahrzehnte nicht erklärbar, bis Mitte der 90er-Jahre erstmals Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen isoliert und charakterisiert wurden (Brownell et al., 1996; Taunton et al., 1996).

Die Bedeutung von HDACs und HATs für die Expression verschiedener Gene wurde in den letzten Jahren zunehmend untersucht und beschrieben. Seit einiger Zeit wird ein „Histon-Code“ propagiert, der besagt, dass die Transkription eines Gens davon abhängt, welche Histone acetyliert und welche deacetyliert sind (Cheung et al., 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2000). Die weiteren Untersuchungen dieser neuen

Zusammenhänge wird die Frage nach dem Einfluss der (De-)Acetylierung auf die Regulierung der Transkription besser beantworten können. Auf Grund der bisherigen Forschungsergebnisse kann der Therapieerfolg bei der Bekämpfung von Krebserkrankungen durch die Gabe von HDAC-Hemmstoffen verbessert werden (Kelly et al., 2002; Marks et al., 2001b). In der Zukunft könnte es möglich sein, dass z.B. durch Medikamente die Transkriptionsrate so beeinflussbar wird, dass verschiedenste Krebserkrankungen endgültig bekämpft werden können.

4.3.2 Die Funktion der Histon-Methylierung bei der Genexpression

Die Modifizierung von Histonen kann neben einer (De-)Acetylierung auch eine Methylierung sein. Für die Methylierung von DNA sind DNA-Methyltransferasen verantwortlich. Neuere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Transkriptionshemmung. So ist z.B. ist die Methylierung bestimmter Promotoren der Grund dafür, dass Gene des zweiten X-Chromosoms bei Frauen nicht exprimiert werden. Inzwischen sind mehrere Isoformen von DNA-Methyltransferasen isoliert worden (DNMT 1, 2, 3a und 3b) (Bestor, 2000). DNMT1 wurde zuerst detektiert und ist bisher am besten charakterisiert. Studien zeigen, dass die Isoform DNMT1 durch die Bindung von HDACs zu inaktivem Chromatin führt. Das *dnmt1*-Gen unterliegt einer Rückkopplung. Die Reaktion findet zwischen CpG-reichen Inseln der DNA und S-Adenosylmethionin mit Hilfe von DNA-Methyltransferasen statt und führt zu einer Methylierung der DNA (Bestor, 2000; Wolffe et al., 1999). CpG-Inseln bestehen aus Cytosinen, die in CG-reichen Dinukleotiden zu finden sind. Diese CpG-Inseln sind unterschiedlich methyliert und führen daher zu einem bestimmten Methylierungsmuster (Bestor, 2000). Das chromosomale Protein MeCP2 (Methyl CpG Binding protein) bindet spezifisch über seine Methyl-CpG-Bindungsdomäne an methylierte DNA. Außerdem ist es über seine transkriptionelle Repressordomäne (TRD, transcriptional repression domain) mit dem mSin3a/HDAC-Repressorkomplex verbunden und hemmt darüber die Transkription (Ng and Bird, 1999). Die Cytosin-5-Methylierung an CpG-Inseln der Promotorregion bestimmter Gene (z.B. Zellzyklusregulatoren oder Tumor-suppressoren) führt zu deren Repression (Baylin and Herman, 2000; Patra et al., 2001). DNA ist innerhalb des Genoms oft methyliert, allerdings findet sich eine

vermehrte Methylierung in transkriptionell inaktivem Heterochromatin (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998; Patra et al., 2001). Hier ist ein Zusammenhang mit Histon-Deacetylasen gegeben, denn in inaktivem Chromatin sind die Histonreste überwiegend deacetyliert (El-Osta et al., 2001; Ng et al., 1999; Patra et al., 2001).

Ein Ungleichgewicht im Methylierungsstatus kann Krankheiten hervorrufen, z.B. gibt es bei einigen Krebsarten Gene, die hypermethyliert sind, wie *BRCA-1* (breast cancer protein 1) und *RB* (Retinoblastom). Beim Retinoblastom kommt es bei Kindern zu einer Tumorentwicklung im Auge (Richter et al., 2003). Bei Brustkrebs oder dem Retinoblastom kommt es zu einem Anstieg von hypermethylierten Promotorregionen (Baylin et al., 2001; Baylin and Herman, 2000). Der Zusammenhang von Deacetylierung und Hypermethylierung bei der Entstehung von Tumoren ist Gegenstand von zahlreichen Untersuchungen (Chiurazzi et al., 1999). Zu den therapeutischen Maßnahmen gehören die Gabe von HDAC-Inhibitoren sowie die Verabreichung von Methyltransferasehemmern wie 5-Aza-2'-Cytidin und 5-Aza-2'-Deoxy-Cytidin, die bereits in der Zellkultur getestet wurden (Hu et al., 1996). Die Gabe beider Hemmstoffklassen kann Gene, deren Expression vorher unterdrückt war, wieder re-exprimieren (Cameron et al., 1999; Kikuchi et al., 2002).

Inzwischen sind weitere Studien bekannt, bei denen HDAC- sowie Methyltransferase-Inhibitoren eingesetzt wurden. Die Methylierung der DNA sowie eine Histon-Deacetylierung kann eine Unterdrückung der Expression des Östrogenrezeptors (ER) in humanen Brustkrebszellen hervorrufen (Keen et al., 2003). Es wurde bereits nachgewiesen, dass eine Gabe von 5-Aza-2'-Deoxycytidin (AZA) und TSA eine Re-Expression des Östrogenrezeptors auf mRNA- und Proteinebene in diesen Zellen induzieren können. Die Behandlung von drei ER-negativen Zelllinien mit dem HDAC-Inhibitor Scriptaid führt schon nach 48 h zu einer Wachstumshemmung sowie zu einer erhöhten H3- sowie H4-Acetylierung. Eine Inkubation mit Scriptaid und AZA war effektiver für die Induktion des Östrogenrezeptors als eine Monotherapie mit den jeweiligen Hemmstoffen. In einem Mausmodell wurde ein vermindertes Tumorwachstum nach Gabe von Scriptaid oder TSA beobachtet (Keen et al., 2003). Scriptaid bzw. TSA könnten auf Grund dieser Untersuchungen als viel versprechendes Heilmittel bei Brustkrebserkrankungen

gelten. Allerdings sollten noch weitere Studien erstellt werden, um einen Effekt dieser HDAC-Hemmstoffe auch *in vivo* zu zeigen. Die Kombination von Inhibitoren von HDACs sowie DNA-Methyltransferasen lässt eine gesteigerte Effizienz bei der Tumorbekämpfung vermuten.

4.3.3 Die Rolle der Phosphorylierung bei der Genexpression

Ein Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen HDAC3 und MAPK11 konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden, und der hemmende Einfluss von HDAC3 auf die Signalübertragung wurde in verschiedenen Versuchen nachgewiesen. Die Phosphorylierung von Histonen an bestimmten Threonin- und Serinresten wurde schon vor einiger Zeit bewiesen (Sauve et al., 1999; Spencer and Davie, 1999). Es wurde z.B. gezeigt, dass während der Mitose fast jedes Serin^{10} am Histon H3 phosphoryliert wird. Dies ist notwendig für eine optimale Chromatinstruktur (Cheung et al., 2000; Clayton and Mahadevan, 2003). Diese Histon-Modifizierung ist mit einer Aktivierung der Transkription von schnell induzierbaren Genen („early response genes“) verbunden. Die Phosphorylierung von H3 wird durch die Gabe von Wachstumsfaktoren oder Phorbolestern stimuliert (Mahadevan et al., 1991). Der genaue Mechanismus, wie die H3-Phosphorylierung die Genexpression beeinflusst, ist noch nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch die Anlagerung der negativen Phosphatgruppe an das Histon H3 eine elektrostatische Interaktion unterbrochen wird und es so Transkriptionsfaktoren ermöglicht wird, an DNA zu binden (Cheung et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HDAC3 einen hemmenden Einfluss auf die Signalweiterleitung der MAPK11 ausübt, da die Aktivität des Transkriptionsfaktors ATF-2 sowie eine TNF alpha-Expression durch HDAC3 verringert werden kann. Auf Grund der inhibitorischen Effekte von HDAC3 kann vermutet werden, dass nicht nur ATF-2, sondern noch viele andere Gene in ihrer Expression durch HDAC3 beeinflusst werden könnten, wie z.B. über das MAPKAP2 auch das Hitzeschockprotein hsp27 (Azuma et al., 2001; Piotrowicz et al., 1998). In der kürzlich erschienenen Arbeit (Mahlknecht, 2003) wurde außerdem beschrieben, dass der HDAC3-Promotor ebenfalls Bindungsstellen für HSF2 (Heat shock factor 2) besitzt. HSF2 überwacht die Expression von Hitzeschockproteinen. Hitzeschockproteine wurden so benannt, weil sie zu den

Proteinen gehören, die nach einem Hitzeschock vermehrt synthetisiert werden, während andere Proteine vermindert gebildet werden. Sie werden außerdem nach Nährstoffmangel oder oxidativem und anderem Stress in großen Mengen synthetisiert. Viele Hitzschockproteine bilden Komplexe, die dann als sog. „Chaperone“ fungieren, d.h. sie überwachen das Schicksal von anderen Proteinen, z.B. deren Faltung, Transport, Reparatur oder Abbau (Goetz et al., 2003). Hitzeschockproteine werden auch Stressproteine genannt, sie sind essenzielle, hoch konservierte Proteine, die für das normale Zellwachstum und die Aufrechterhaltung der Zellfunktion notwendig sind. Die Expression von Hitzschockproteinen wurde schon während der Embryogenese in vielen Organismen nachgewiesen (Calabrese et al., 2002).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass der hemmende Effekt von HDAC3 auch auf andere Signalwege ausgeübt werden könnte. Die p42/44 MAP Kinasen (ERK) und p38 MAP Kinasen können die H3-Phosphorylierung induzieren. Der ERK-Signaltransduktionsweg wurde bisher am besten beschrieben, viele involvierte Kinasen wurden schon isoliert und charakterisiert. Werden Zellen extrazellulären Wachstumsfaktoren ausgesetzt, wird über Ras und Raf eine Kinasekaskade induziert, die p42/p44 (ERK2 und 1) aktiviert. Im Allgemeinen kommt es zu einer Proliferation der Zelle. Der p38 MAP Kinase Signalweg ist bisher noch nicht komplett erforscht (Cheung et al., 2000). Die vorliegende Arbeit trägt zu einer besseren Erklärung der Signalwege bei, da ein Einfluss von HDAC3 auf die p38 MAP Kinase-Signalkaskade aufgezeigt wurde.

Die Interaktion einer p38 MAP Kinase mit einer Histon-Deacetylase war bei Beginn der Arbeit noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Inzwischen sind mehrere Studien über eine Interaktion von Histon-Deacetylasen mit verschiedenen Kinasen publiziert worden. Es wurde z.B. nachgewiesen, dass HDAC1 von der Casein Kinase 2 phosphoryliert wird und dass HDAC1 zwei potenzielle Phosphorylierungsstellen (am Serin^{421} und Serin^{423}) besitzt. Die Mutation dieser Serinreste führt zu einer Reduzierung der enzymatischen Aktivität von HDAC1 und zu einer verminderten Fähigkeit zur Komplexbildung (Pflum et al., 2001). Außerdem wurde mittels der *in vivo* labelling-Methode gezeigt, dass HDAC1 posttranslational am C-Terminus

phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung beeinflusst dabei nicht die enzymatische Aktivität von HDAC1. Es wurde *in vitro* nachgewiesen, dass die Casein Kinase 2 sowie eine cAMP-abhängige Kinase HDAC1 phosphorylieren, aber nicht die Protein Kinase C oder eine MAP Kinase (Cai et al., 2001).

In einer anderen Untersuchung wurde dagegen gezeigt, dass die HDAC1- bzw. HDAC2-Aktivität durch die Gabe eines Proteinphosphatase-Inhibitors gesteigert wird (Galasinski et al., 2002). HDAC1 und HDAC2 werden während der Mitose phosphoryliert. Die Studien wurden mit der Zelllinie K562 (humane Erythroleukämiezellen) erstellt. Hierbei zeigte sich, dass eine Phosphorylierung von HDAC2 auch stattfindet, wenn die Zellen vor der Lyse für 30 min mit Cycloheximid (einem Proteinbiosynthese-Inhibitor) behandelt worden waren, d.h. eine Proteinneusynthese der Kinasen, die HDAC2 phosphorylieren, ist nicht erforderlich. Durch die Phosphorylierung der beiden Histon-Deacetylasen wurde die Proteinkomplexbildung zwischen HDAC1 und HDAC2 sowie der Komplex zwischen den beiden HDACs und mSin3a unterbrochen (Galasinski et al., 2002).

Die Phosphorylierung von HDAC2 durch die Casein Kinase 2 *in vitro* wurde kürzlich ebenfalls nachgewiesen (Sun et al., 2002; Tsai and Seto, 2002). Die Phosphorylierungsstelle von HDAC2 liegt dabei, wie bei HDAC1, im C-terminalen Bereich der Histon-Deacetylase. Die Phosphorylierung erhöht die enzymatische Aktivität von HDAC2, hat aber keinen Einfluss auf die transkriptionelle Repression des Enzyms. Innerhalb dieser Studie wurde auch aufgezeigt, dass HDAC3 *in vitro* ebenfalls durch die Casein Kinase 2 phosphoryliert werden kann. HDAC8 ist dagegen kein Substrat der Casein Kinase 2 (Tsai and Seto, 2002). Aktuelle Studien dazu haben darauf hingewiesen, dass HDAC8 *in vitro und in vivo* von einer Protein Kinase A am Serin^{39} phosphoryliert wird. Eine Mutation von Serin^{39} zu Alanin^{39} erhöht die enzymatische Aktivität von HDAC8, während dagegen eine Mutation von Serin^{39} zu Glutamat^{39} die Enzymaktivität von HDAC8 hemmt. Eine Hyperphoshorylierung von HDAC8 und damit Inaktivierung des Enzyms führt zu einer Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 (Lee et al., 2004).

Weitere Untersuchungen, inwieweit andere Histon-Deacetylasen potenziell phosphorylierbar sind, könnten den Einfluss der Phosphorylierung von HDACs auf Signalübertragungen in der Zelle prüfen. Dabei könnte bestimmt werden, ob durch eine mögliche enzymatische Hemmung von Histon-Deacetylasen durch

(De-)Phosphorylierung auf Kinase-Signalwege Einfluss genommen werden kann.
Der Einsatz von verschiedenen HDAC-Inhibitoren sowie von MAP Kinase-Inhibitoren könnte zu einem verbesserten Verständnis der Signalwege führen. Außerdem könnte ein möglicher synergistischer Effekt dieser Hemmstoffe bei der Bekämpfung von malignen Erkrankungen näher untersucht werden. Die Inhibitoren sollten zuerst *in vitro* in der Zellkultur eingesetzt werden, um zu untersuchen, ob sich maligne Erkrankungen in ihrer Entstehung oder Progression durch die Gabe einzelner oder beider Inhibitoren hemmen lassen. Danach könnten, abhängig von den Ergebnissen, Tierversuche geplant werden, bevor Überlegungen zu klinischen Studien gestartet werden.

HDAC-Hemmstoffe werden bereits bei malignen Erkrankungen eingesetzt. Die Heilungsrate könnte durch neue Ergebnisse zu der Wirkweise und der Spezifität von HDAC-Inhibitoren noch verbessert werden (Hu et al., 2003; Marks et al., 2001b). Der Einsatz von MAP Kinase-Inhibitoren ist bisher in verschiedenen Forschungsarbeiten ebenfalls getestet worden. In Studien wurde der Einfluss von Kinase-Inhibitoren bei inflammatorischen Reaktionen gezeigt, z.B. wird die Produktion von Interleukin 1, TNF und Interleukin 6 *in vitro* sowie *in vivo* unterdrückt (Kumar et al., 2003). Anti-inflammatorische Effekte des Kinase-Inhibitors SB203580 wurde in Tiermodellen der Rheumatoiden Arthritis schon nachgewiesen (Badger et al., 2000; Kumar et al., 2003; Liverton et al., 1999). Anhand klinischer Untersuchungen mit männlichen, gesunden Studienteilnehmern, die den Kinase-Inhibitor SB242235 in einer Dosis von 1 mg bis 500 mg oral verabreicht bekamen, konnte gezeigt werden, dass diese Medikamentendosen gut toleriert wurden. Außerdem wurden die höchsten Plasmawerte zwischen 1,5 und 6 h beobachtet, und die Halbwertszeit des Inhibitors im Plasma betrug zwischen 14,7 und 18,3 Stunden (Fullerton et al., 2000).

In einer anderen Studie mit dem Kinase-Inhibitor RWJ-67657 bekamen die Teilnehmer entweder Placebos oder verschiedene Konzentrationen des Inhibitors verabreicht. Durch die Gabe von Endotoxin wurden Grippe ähnliche Symptome verursacht und damit die Serumkonzentration von Interleukin 6, Interleukin 8 und TNF erhöht. Die Behandlung mit RWJ-67657 konnte die Symptome verringern und die Menge an Zytokinen im Blut der Probanden vermindern. Dieser Inhibitor soll sich

nach dieser Studie bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn oder Rheumatoider Arthritis als effektiv erweisen (Fijen et al., 2001).

4.4 Einfluss von HDACs bei verschiedenen Krankheiten

Ein Zusammenhang zwischen HDACs und verschiedenen Krankheiten ist seit einigen Jahren bekannt. HDAC-Komplexe werden von Retinsäurerezeptoren (RARα) rekrutiert und unterdrücken damit die Expression bestimmter Gene. Sind aber die Retinsäurerezeptoren über eine chromosomale Translokation durch die Bindung an den PML-Locus (Promyelozytenleukämie; [t(15;17)(q22;q21)]) oder den PLZF-Locus (Promyeolzyten-leukämischer Zinkfinger; [t(11;17)(q23;q21)]) mutiert, resultiert daraus eine Akute Promyelozytenleukämie (APL), denn durch die Hemmung der Expression bestimmter Gene ist die normale Hämatopoese gestört. Dabei können die Patienten mit der Translokation *PML-RAR*α häufig durch eine Gabe pharmakologischer Dosen an Retinsäure geheilt werden, während bei Patienten mit der *PLZF-RAR*α–Translokation eine Chance auf Heilung nur durch die gleichzeitige Gabe von Retinsäure und HDAC-Hemmstoffen erhöht werden kann (Cress and Seto, 2000; Lin et al., 1998). Bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) kommt es bei der Translokation von [t(8;21)(q22;q22)] zu einer Unterbrechung des *AML1*-Gens (Cress and Seto, 2000; Fenrick and Hiebert, 1998). Normalerweise funktioniert *AML1* als DNA-Bindungskomponte von CBF (enhancer core binding factor). Dieser Komplex aktiviert die Gene, die für die normale myeloide Differenzierung notwendig sind (Lenny et al., 1997). Im Fall der t(8;21)-Translokation ist AML1 an den Repressor ETO gebunden. Dieser bindet über die Rekrutierung von mSin3a und N-CoR auch HDACs. Als Folge ist die korrekte myeloide Differenzierung gehemmt und es kommt zur Leukämie (Cress and Seto, 2000).

4.5 Klinischer Einsatz von HDAC-Inhibitoren

HDAC-Inhibitoren werden inzwischen vermehrt zur Behandlung von Krebserkrankungen in klinischen Studien eingesetzt. Butyrat war das erste Agens, bei dem die Fähigkeit zur Hemmung von HDACs nachgewiesen wurde (Boffa et al., 1978). Die Möglichkeit, Butyrat bei Darmkrebserkrankungen protektiv einzusetzen, wird derzeit geprüft. Ballaststoffe in der Nahrung werden durch bakterielle Fermentation im Dickdarm zu Butyrat abgebaut, ein Schutz vor Dickdarmkrebs bei ballaststoff-haltiger Ernährung wird diskutiert (Davie, 2003; Hinnebusch et al., 2002; Peters et al., 2003). Bei der Behandlung von Krebserkrankungen sind die Heilungschancen der Patienten in den letzten Jahren verbessert worden. Dabei ist die Entdeckung der HDAC-Inhibitoren eine große Hilfe. Die meisten HDAC-Inhibitoren induzieren einen Zellzyklus-Arrest sowie Differenzierung und Apoptose *in vitro*, einige dieser Chemikalien haben auch Anti-Tumor-Eigenschaften *in vivo* (Kelly et al., 2002; Marks et al., 2001a; Weidle and Grossmann, 2000). Durch die Gabe von HDAC-Inhibitoren wird allerdings nur eine geringe Zahl an Genen in ihrer Expression verändert (Mariadason et al., 2000; Van Lint et al., 1996). Nach Inkubation mit Trichostatin A (TSA) oder Trapoxin (TPX) wurde in lymphoiden Zelllinien nur eine Hemmung von Histon-Deacetylasen, aber kein Effekt auf die Histon-Acetylierung nachgewiesen. Außerdem wurde durch TSA oder TPX die Genexpression von c-myc, einem Transkriptionsfaktor, der bei der Signalweiterleitung involviert ist, reduziert (Fernandez et al., 2003; Oster et al., 2002). Die Expression von GaPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), einem Enzym der Glykolyse, das als „Haushalts-Gen“ („housekeeping gene“) exprimiert wird (von Schnakenburg et al., 2002), wurde kaum oder gar nicht beeinflusst. Anhand der „Differential Display“-Methode konnte gezeigt werden, dass 8 von 340 gemessenen Genen in ihrer Expression durch die Gabe von TSA oder TPX verändert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transkription von bestimmten Genen über den Grad der Histon-Acetylierung geregelt wird (Van Lint et al., 1996).

Einige HDAC-Hemmstoffe wurden bisher in der Klinik eingesetzt: Phenylbutyrat wurde in einem Phase I-Versuch alle 21 Tage für 120 h an Patienten verabreicht, die refraktäre, solide Tumoren (meist Prostatakrebs) hatten. Die Patienten litten an

verschiedenen Nebenwirkungen wie Müdigkeit und Verwirrung. Die Dosis, die maximal tolerierbar war, wurde auf 410 mg/kg/Tag für 5 Tage festgelegt. In dieser Studie wurde allerdings bei keinem Patienten eine komplette Remission durch die Gabe von Phenylbutyrat erreicht. Zwei Patienten hatten über eine Zeitraum von 168 Tagen einen stabilen Krankheitsverlauf (Carducci et al., 2001). In einer weiteren Studie wurde Phenylbutyrat Patienten mit soliden Tumoren verabreicht. Die Phase II-Dosis errechnete sich auf 27 g/d. Es gab keine kompletten oder partiellen Remissionen, aber sieben Patienten hatten während der Phenylbutyrat-Gabe über sechs Monate einen stabilen Krankheitsverlauf (Gilbert et al., 2001).
In anderen Untersuchungen wurden denen Phenylbutyrat bei Akuten Myeloischen Leukämien und Myelodysplasien verabreicht. Den Patienten wurden alle vier Wochen für sieben Tage kontinuierlich Phenylbutyrat infundiert, die maximal tolerierte Dosis war hier 375 mg/kg/Tag. Höhere Dosen führten zu neurologischen Störungen, die aber nach dem Absetzen von Phenylbutyrat reversibel waren. Kein Patient konnte eine komplette Remission erreichen, aber es war bei einigen Patienten eine Verbesserung des Blutbildes zu beobachten (Gore et al., 2001; Yu et al., 1999). Phenylbutyrat hemmt nicht nur HDACs, sondern erhöht in einer Konzentration von 0,25 mM die Acetylierung (Warrell et al., 1998; Yu et al., 1999).

Eine weitere Studie über Kolonkarzinome beschäftigte sich nicht mit HDAC-Inhibitoren, sondern mit Nährstoffen. Die Aufnahme und der Gehalt von Folat im Blut kann einen Einfluss auf das Kolonkarzinomentstehungsrisiko ausüben. In epidemiologischen und in klinischen Studien wurde herausgefunden, dass bei hoher Folat-Aufnahme ein 40% geringeres Risiko im Vergleich zu niedriger Folat-Aufnahme besteht, an Kolonkarzinom zu erkranken. Allerdings zeigte sich im Tiermodell, dass bei schon vorhandenen Neoplasien eine hohe Folat-Zufuhr zu einer Promotion des Tumors führt. Dies geschah in Abhängigkeit von der Zeit und der Folat-Dosis. Es wurde außerdem festgestellt, dass eine Defizienz von Folat in Zellen eher zu einer Entstehung von Neoplasien führt. Moderate Mengen an Folat-Substitution in Zellen hemmten dagegen die Tumorentstehung (Kim, 2003).
Eine andere klinische Studie am Menschen untersuchte den Einfluss einer Weizenkleie- und Kalziumgabe bei Patienten, denen Polypen im Kolon operativ entfernt worden waren. Hierbei zeigte sich nach neun Monaten bei den Patienten

eine verminderte Menge an sekundären Gallensäuren, denen (konzentrationsabhängig) eine kanzerogene Wirkung zugesprochen wird. Dabei sollen sekundäre Gallensäuren zu der Entstehung von Neoplasien im Kolon beitragen, was nach der Studie durch die Gabe von Weizenkleie und Kalzium verhindert werden kann (Alberts et al., 1996).

Der klinische Einsatz von HDAC-Inhibitoren ist seit einiger Zeit voran geschritten, allerdings sind noch viele Fragen offen. Bis vor kurzem war nicht bekannt, ob es HDAC-Inhibitoren gibt, die spezifisch ein Isoenzym der Histon-Deacetylasen hemmen können. Neuere Untersuchungen zeigen, dass TSA z.B. alle Klasse I-HDACs mit einer ähnlichen Effizienz hemmt (IC_{50} 100-300 nM). Allerdings zeigte sich, dass MS-27-275 besonders gut HDAC1 hemmt (IC_{50} 300 nM), während dagegen HDAC8 relativ insensitiv zu MS-27-275 ist (etwa 30% Hemmung bei 100 µM) (Hu et al., 2003). Neue Forschungen an diesem Gebiet könnten zu einer besseren Wirksamkeit und einer erhöhten Effizienz bei der Bekämpfung von Krebserkrankungen führen. Durch eine Bestimmung der Kristallstruktur von Histon-Deacetylasen könnte das die Generierung von HDAC-Inhbitoren noch besser an das aktive Zentrum von HDACs angepasst werden, was die Effektivität dieser Hemmstoffe verbessern könnte.

4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von HDAC3 mit verschiedenen Nicht-Histonproteinen nachgewiesen. Dabei wurden die MAP Kinase 11, Rab3a, SCG-10 und die MAP Kinase 13 als potenzielle Bindungspartner der humanen Histon-Deacetylase 3 identifiziert.

Die Interaktion zwischen der MAP Kinase 11 und HDAC3 konnte am besten charakterisiert werden. Hierbei wurde der Einfluss bzw. ein hemmender Effekt von HDAC3 auf die Signaltransduktionswege der Kinase deutlich. HDAC3 hat demnach eine wichtige Funktion bei der Unterdrückung der Genexpression. Eine gezielte Inhibition von HDAC3 bzw. anderen HDAC-Proteinen könnte möglicherweise die Ausbildung von verschiedenen Krankheiten verhindern. Allerdings ist das Gleichgewicht zwischen Histon-Deacetylasen und Histon-Acetyltransferasen so fein reguliert, dass die einseitige Hemmung einer Enzymgruppe über einen längeren Zeitraum zur Entstehung anderer Krankheiten führen könnte. Die Forschungen über den klinischen Einsatz von HDAC-Hemmstoffen sollten demzufolge noch vertieft werden. Den HDAC-Inhibitoren wird eine größere Funktion zukommen, wenn die selektive Hemmung von einzelnen HDACs zu einer verbesserten Heilungs-möglichkeit bei Krankheiten führen könnte. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht nur eine Hemmung von HDACs, sondern auch die Inhibition von Kinasen (z.B. bei der Unterdrückung einer Entzündungsreaktion) wichtig sein könnte. Die nähere Zukunft sollte neue Erkenntnisse bei der Bekämpfung von malignen Krankheiten bringen.

Die Zahl der Forschungsarbeiten über Histon-Deacetylasen ist in den letzten Jahren in starkem Maße angestiegen, was zeigt, dass den HDACs eine wichtige Funktion beim Verständnis von Genregulation und Genexpression zugeschrieben wird. Der Zusammenhang zwischen Histon-Deacetylierung, Histon-Acetylierung und Signal-kaskaden sollte in der Zukunft noch weiter untersucht werden. Auch der Einfluss der Bindung von HDACs an Nicht-Histonproteine sollte Gegenstand weiterer Studien sein. Inzwischen sind schon einige Nicht-Histone als Bindungspartner von Histon-Deacetylasen entdeckt worden. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit die Interaktion von

HDAC3 und der MAP Kinase 11 näher charakterisiert sowie die Bindung von HDAC3 an die MAPK13 bestätigt werden.

Die Bindung von MAP Kinasen an verschiedene Proteine und deren Einfluss auf die Signalkaskaden sollte weiter geprüft werden. Außerdem könnten weitere Studien zur möglichen Interaktion von Histon-Deacetylasen mit den Proteinen Rab3a bzw. SCG-10 einen Hinweis auf die Steuerung von Sekretionswegen bzw. die Regulation des Auf- und Abbaus des Zellskeletts geben. Zusätzlich sollte eine mögliche Rolle von Histon-Deacetylasen im Prozess der Alzheimer Erkrankung oder der HIV-Infektion näher untersucht werden.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren rückte die Regulation der „Genexpression“ in den Mittelpunkt vieler Forschungsarbeiten. Dabei wird untersucht, wie eine Zelle exakt bestimmen kann, welches Gen exprimiert und bei welchem Gen die Expression unterdrückt wird. Eine große Rolle bei der Aufklärung der Steuerung der Genexpression spielte die Entdeckung von Enzymen, die Einfluss auf das Acetylierungsgleichgewicht einer Zelle nehmen: Histon-Acetyltransferasen (HATs) führen zu einer Hyperacetylierung bestimmter Proteine, während Histon-Deacetylasen (HDACs) eine Hypoacetylierung hervorrufen. Diese (De-)Acetylierung findet an Lysinresten basischer Histone statt, die zusammen mit der DNA die Bausteine des Chromatins bilden. Dass Lysinreste an Histonen acetyliert werden können, wurde schon im Jahre 1964 von Allfrey und Kollegen herausgefunden. Die molekularen Hintergründe waren allerdings über Jahrzehnte unklar, denn humane Histon-Deacetylasen konnten erst vor einigen Jahren isoliert und charakterisiert werden. HDACs werden aufgrund ihrer Homologie zu Hefeproteinen in drei Klassen eingeteilt, wobei die erste Klasse von den HDACs 1, 2, 3 und 8 repräsentiert wird, welche zum Hefeprotein RPD3 (reduced potassium dependency) homolog sind. Die zweite Klasse, die aus den HDACs 4, 5, 6, 7, 9 und 10 gebildet wird, ist HDA1 (histone deacetylase 1) in der Sequenz ähnlich. Die dritte HDAC-Klasse wurde erst kürzlich entdeckt; sie ist homolog zum Hefeprotein SIR2 (silencing information regulator) und besteht aus den humanen Proteinen SIRT1-7. Der Einfluss von HDACs und HATs bei der Regulation der Genexpression ist heute unbestritten: Generell wird es Transkriptionsfaktoren und anderen regulatorischen Proteinen durch eine Hyperacetylierung ermöglicht, an die DNA zu binden und eine Genexpression zu induzieren, während eine Hypoacetylierung meist den gegenteiligen Effekt hervorruft. Die Bedeutung von HDACs in malignen Erkrankungen wurde ebenfalls in den letzten Jahren untersucht. Inzwischen sind eine Reihe von HDAC-Hemmstoffen entwickelt worden, die neben den üblichen Therapien im Kampf gegen Krebserkrankungen eingesetzt werden können. Die Forschungen hierzu sind allerdings noch am Anfang, und in der nächsten Zeit werden noch weitere Untersuchungen nötig sein.

Die weitergehende Charakterisierung des Phänotyps der humanen Histon-Deacetylase 3 war Ziel der vorliegenden Arbeit. Es wurde zunächst versucht, neue

Interaktionspartner von HDAC3 zu detektieren. Dabei wurden im Einzelnen folgende Ergebnisse erzielt: Mit der Far Western-Methode wurden verschiedene potenzielle Bindungspartner von HDAC3 identifiziert: Die MAP Kinase-Isoform p38 beta 2 (MAP Kinase 11), Rab3a, das zu der *ras*-Gen-Superfamilie gehört, das neuronale Protein SCG-10, sowie p38 delta (MAP Kinase 13), eine weitere Kinase-Isoform. Um einen möglichen Einfluss von HDAC3 auf die durch MAP Kinasen vermittelte Signaltransduktion aufzuzeigen, wurden weitere Versuche angeschlossen, wobei die Interaktion von HDAC3 mit der MAP Kinase 11 genauer untersucht wurde. In mehreren unabhängigen Experimenten wurde die Bindung der MAP Kinase 11 an HDAC3 durch Methoden wie Far Western-Analyse, Pulldown-Assay, Mammalian Two Hybrid-Analyse und Immunpräzipitationen bestätigt. Mittels Mutationsstudien konnte der Bereich der Interaktion zwischen HDAC3 und der MAP Kinase 11 auf den N-terminalen Bereich des HDAC3-Proteins eingegrenzt werden. HDAC3 vermindert außerdem *in vitro* und *in vivo* den Phosphorylierungsstatus der MAP Kinase 11. Zusätzlich wurde gezeigt, dass HDAC3 einen hemmenden Einfluss auf die Phosphorylierung und damit Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 besitzt und die Expression von TNF alpha unterdrücken kann. Die Bindung der Proteine Rab3a, SCG-10 und sowie p38 delta an HDAC3 wurde ferner mittels Pulldown-Analysen bestätigt.

Das zentrale Anliegen dieser Arbeit, den Phänotyp der humanen Histon-Deacetylase 3 weiter zu charakterisieren, konnte durch die Identifizierung neuer Interaktionspartner von HDAC3 erreicht werden. Es wurden mehrere Nicht-Histon-Proteine als Bindungspartner von HDAC3 detektiert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass HDAC3 in der Zelle eine Rolle bei der MAP Kinase 11-vermittelten Signalübertragung spielt sowie an der Genexpression proinflammatorischer Zytokine beteiligt ist. Dabei übt HDAC3 einen inhibitorischen Effekt aus, der aber durch die Gabe von spezifischen Hemmstoffen wieder aufgehoben werden kann.

6 Literatur

Alberts DS, Ritenbaugh C, Story JA, Aickin M, Rees-McGee S, Buller MK, Atwood J, Phelps J, Ramanujam PS, Bellapravalu S, Patel J, Bextinger L, and Clark L (1996) Randomized, double-blinded, placebo-controlled study of effect of wheat bran fiber and calcium on fecal bile acids in patients with resected adenomatous colon polyps. J Natl Cancer Inst *88:*81-92.

Albright CF, Giddings BW, Liu J, Vito M, and Weinberg RA (1993) Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase. Embo J *12:*339-47.

Allfrey VG, Faulkner R, and Mirsky AE (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. Proc Natl Acad Sci USA *51:*786-794.

Amann JM, Nip J, Strom DK, Lutterbach B, Harada H, Lenny N, Downing JR, Meyers S, and Hiebert SW (2001) ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. Mol Cell Biol *21:*6470-83.

Annunziato AT, Eason MB, and Perry CA (1995) Relationship between methylation and acetylation of arginine-rich histones in cycling and arrested HeLa cells. Biochemistry *34:*2916-24.

Antonsson B, Kassel DB, Di Paolo G, Lutjens R, Riederer BM, Grenningloh G, Osen-Sand A, Sobel A, Catsicas S, Kassel D, Allet B, Bernard A, and Montessuit S (1998) Identification of in vitro phosphorylation sites in the growth cone protein SCG10. Effect of phosphorylation site mutants on microtubule-destabilizing activity. J Biol Chem *273*:8439-46

Archer S, Meng S, Wu J, Johnson J, Tang R, and Hodin R (1998) Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways. Surgery *124:*248-53.

Archer SY, and Hodin RA (1999) Histone acetylation and cancer. Curr Opin Genet Dev *9:*171-4.

Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, and Moudrianakis EN (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. Proc Natl Acad Sci U S A *88:*10148-52.

Arents G, and Moudrianakis EN (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. Proc Natl Acad Sci U S A *92:*11170-4.

Azuma N, Akasaka N, Kito H, Ikeda M, Gahtan V, Sasajima T, and Sumpio BE (2001) Role of p38 MAP kinase in endothelial cell alignment induced by fluid shear stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol *280:*H189-97.

Badger AM, Griswold DE, Kapadia R, Blake S, Swift BA, Hoffman SJ, Stroup GB, Webb E, Rieman DJ, Gowen M, Boehm JC, Adams JL, and Lee JC (2000) Disease-modifying activity of SB 242235, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, in rat adjuvant-induced arthritis. Arthritis Rheum *43:*175-83.

Baneyx F (1999) In vivo folding of recombinant proteins in *Escherichia coli*. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2nd Edition, Demain, A. L. and Davies, J. E., eds., ASM Press, Washington, DC.

Barnard JA, and Warwick G (1993) Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. Cell Growth Differ *4:*495-501.

Bauerfeind R, Galli T, and De Camilli P (1996) Molecular mechanisms in synaptic vesicle recycling. J Neurocytol *25:*701-15.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, and Herman JG (2001) Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. Hum Mol Genet *10:*687-92.

Baylin SB, and Herman JG (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. Trends Genet *16:*168-74.

Belyaev ND, Wood IC, Bruce AW, Street M, Trinh JB, and Buckley NJ (2003) Distinct RE1 silencing transcription factor (REST)-containing complexes interact with different target genes. J Biol Chem *279*:556-61.

Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet *9:*2395-402.

Blaheta RA, and Cinatl J, Jr. (2002) Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. Med Res Rev *22:*492-511.

Boffa LC, Vidali G, Mann RS, and Allfrey VG (1978) Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. J Biol Chem *253:*3364-6.

Borrow J, Stanton VP, Jr., Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS, Civin CI, Disteche C, Dube I, Frischauf AM, Horsman D, Mitelman F, Volinia S, Watmore AE, and Housman DE (1996) The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein [see comments]. Nat Genet *14:*33-41.

Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, and Ogryzko V (1998) Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. Nature *396:*594-8.

Bourachot B, Yaniv M, and Muchardt C (2003) Growth inhibition by the mammalian SWI-SNF subunit Brm is regulated by acetylation. Embo J *22:*6505-15.

Brownell JE, and Allis CD (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. Curr Opin Genet Dev *6:*176-84.

Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, and Allis CD (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. Cell *84:*843-51.

Buggy JJ, Sideris ML, Mak P, Lorimer DD, McIntosh B, and Clark JM (2000) Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. Biochem J *350 Pt 1:*199-205.

Burstein ES, Linko-Stentz K, Lu ZJ, and Macara IG (1991) Regulation of the GTPase activity of the ras-like protein p25rab3A. Evidence for a rab3A-specific GAP. J Biol Chem *266:*2689-92.

Bussow K, Cahill D, Nietfeld W, Bancroft D, Scherzinger E, Lehrach H, and Walter G (1998) A method for global protein expression and antibody screening on high- density filters of an arrayed cDNA library. Nucleic Acids Res *26:*5007-8.

Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, Thaler HT, Rifkind RA, Marks PA, and Richon VM (2000) Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Res *60:*5165-70.

Cai R, Kwon P, Yan-Neale Y, Sambuccetti L, Fischer D, and Cohen D (2001) Mammalian histone deacetylase 1 protein is posttranslationally modified by phosphorylation. Biochem Biophys Res Commun *283:*445-53.

Cairns BR (2001) Emerging roles for chromatin remodeling in cancer biology. Trends Cell Biol *11:*S15-21.

Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Giuffrida Stella AM, and Butterfield DA (2002) Molecular chaperones and their roles in neural cell differentiation. Dev Neurosci *24:*1-13.

Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, and Baylin SB (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. Nat Genet *21:*103-7.

Carducci MA, Gilbert J, Bowling MK, Noe D, Eisenberger MA, Sinibaldi V, Zabelina Y, Chen TL, Grochow LB, and Donehower RC (2001) A Phase I clinical and pharmacological evaluation of sodium phenylbutyrate on an 120-h infusion schedule. Clin Cancer Res *7:*3047-55.

Chadee DN, Hendzel MJ, Tylipski CP, Allis CD, Bazett-Jones DP, Wright JA, and Davie JR (1999) Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. J Biol Chem *274:*24914-20.

Chan JK, Sun L, Yang XJ, Zhu G, and Wu Z (2003) Functional characterization of an amino-terminal region of HDAC4 that possesses MEF2 binding and transcriptional repressive activity. J Biol Chem *278:*23515-21.

Charbaut E, Curmi PA, Ozon S, Lachkar S, Redeker V, and Sobel A (2001) Stathmin family proteins display specific molecular and tubulin binding properties. J Biol Chem *276:*16146-54.

Chen L, Fischle W, Verdin E, and Greene WC (2001) Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. Science *293:*1653-7.

Cheung P, Allis CD, and Sassone-Corsi P (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. Cell *103:*263-71.

Chiurazzi P, Pomponi MG, Pietrobono R, Bakker CE, Neri G, and Oostra BA (1999) Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene. Hum Mol Genet *8:*2317-23.

Clayton AL, and Mahadevan LC (2003) MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. FEBS Lett *546:*51-8.

Coyne VE, James MD, Reid SJ, Rybicki EP (Hrsg.): PCR Primer Design and Reaction Optimisation; in Molecular Biology Techniques Manual (Third Edition), copyright, 1992, 1996, 2001.

Cress WD, and Seto E (2000) Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. J Cell Physiol *184:*1-16.

Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, Sen S, Allis CD, and Sassone-Corsi P (2002) Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. Mol Cell Biol *22:*874-85.

Cuenda A, Cohen P, Buee-Scherrer V, and Goedert M (1997) Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). Embo J *16:*295-305.

Dangond F, Hafler DA, Tong JK, Randall J, Kojima R, Utku N, and Gullans SR (1998) Differential display cloning of a novel human histone deacetylase (HDAC3) cDNA from PHA-activated immune cells. Biochem Biophys Res Commun *242:*648-52.

D'Argenio G, Cosenza V, Delle Cave M, Iovino P, Delle Valle N, Lombardi G, and Mazzacca G (1996) Butyrate enemas in experimental colitis and protection against large bowel cancer in a rat model. Gastroenterology *110:*1727-34.

Davie JR (1995) The nuclear matrix and the regulation of chromatin organization and function. Int Rev Cytol*:*191-250.

Davie JR (1997) Nuclear matrix, dynamic histone acetylation and transcriptionally active chromatin. Mol Biol Rep *24:*197-207.
Davie JR (1998) Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. Curr Opin Genet Dev *8:*173-8.
Davie JR (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. J Nutr *133:*2485S-2493S.
Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem *268:*14553-6.
Davis RJ (1994) MAPKs: new JNK expands the group. Trends Biochem Sci *19:*470-3.
Dierkes S (Hrsg.) (2000), Hexal Taschenlexikon Medizin, 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag München, Jena.
Dobosy JR, and Selker EU (2001) Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. Cell Mol Life Sci *58:*721-7.
Doetzlhofer A, Rotheneder H, Lagger G, Koranda M, Kurtev V, Brosch G, Wintersberger E, and Seiser C (1999) Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. Mol Cell Biol *19:*5504-11.
Douillard JY, Bennouna J, Vavasseur F, Deporte-Fety R, Thomare P, Giacalone F, and Meflah K (2000) Phase I trial of interleukin-2 and high-dose arginine butyrate in metastatic colorectal cancer. Cancer Immunol Immunother *49:*56-61.
Dressel U, Bailey PJ, Wang SC, Downes M, Evans RM, and Muscat GE (2001) A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. J Biol Chem *276:*17007-13.
El-Osta A, Baker EK, and Wolffe AP (2001) Profiling methyl-CpG specific determinants on transcriptionally silent chromatin. Mol Biol Rep *28:*209-15.
Emiliani S, Fischle W, Van Lint C, Al-Abed Y, and Verdin E (1998) Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. Proc Natl Acad Sci U S A *95:*2795-800.
Enslen H, Raingeaud J, and Davis RJ (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. J Biol Chem *273:*1741-8.
Fajas L, Egler V, Reiter R, Hansen J, Kristiansen K, Debril MB, Miard S, and Auwerx J (2002) The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. Dev Cell *3:*903-10.
Fajas L, Egler V, Reiter R, Miard S, Lefebvre AM, and Auwerx J (2003) PPARgamma controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner. Oncogene *22:*4186-93.
Fenrick R, and Hiebert SW (1998) Role of histone deacetylases in acute leukemia. J Cell Biochem Suppl *31:*194-202.
Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, and Amati B (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. Genes Dev *17:*1115-29.
Ferrer I, Blanco R, Carmona M, Ribera R, Goutan E, Puig B, Rey MJ, Cardozo A, Vinals F, and Ribalta T (2001) Phosphorylated map kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. Brain Pathol *11:*144-58.
Ferrer I, Puig B, Blanco R, and Marti E (2000) Prion protein deposition and abnormal synaptic protein expression in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. Neuroscience *97:*715-26.

Fijen JW, Zijlstra JG, De Boer P, Spanjersberg R, Tervaert JW, Van Der Werf TS, Ligtenberg JJ, and Tulleken JE (2001) Suppression of the clinical and cytokine response to endotoxin by RWJ-67657, a p38 mitogen-activated protein-kinase inhibitor, in healthy human volunteers. Clin Exp Immunol *124:*16-20.

Finkel T, Duc J, Fearon ER, Dang CV, and Tomaselli GF (1993) Detection and modulation in vivo of helix-loop-helix protein-protein interactions. J Biol Chem *268:*5-8.

Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, and Pavletich NP (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. Nature *401:*188-93.

Finnin MS, Donigian JR, and Pavletich NP (2001) Structure of the histone deacetylase SIRT2. Nat Struct Biol *8:*621-5.

Fischle W, Dequiedt F, Fillion M, Hendzel MJ, Voelter W, and Verdin E (2001a) Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo. J Biol Chem *276:*35826-35.

Fischle W, Emiliani S, Hendzel MJ, Nagase T, Nomura N, Voelter W, and Verdin E (1999) A new family of human histone deacetylases related to Saccharomyces cerevisiae HDA1p. J Biol Chem *274:*11713-20.

Fischle W, Kiermer V, Dequiedt F, and Verdin E (2001b) The emerging role of class II histone deacetylases. Biochem Cell Biol *79:*337-48.

Forsberg EC, and Bresnick EH (2001) Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. Bioessays *23:*820-30.

Frye RA (1999) Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. Biochem Biophys Res Commun *260:*273-9.

Frye RA (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. Biochem Biophys Res Commun *273:*793-8.

Fullerton T, *et al.* (2000) Suppression of *ex vivo* cytokine production by SB-242235, a selective inhibitor of p38 MAP kinase. 101st Ann. Meet. Am. Soc. Clin. Pharmacol. *67*, 114. Zitiert in Kumar S (2003).

Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, Tanaka A, Komatsu Y, Nishino N, Yoshida M, and Horinouchi S (2002) FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. Cancer Res *62:*4916-21.

Fykse EM, Li C, and Sudhof TC (1995) Phosphorylation of rabphilin-3A by Ca2+/calmodulin- and cAMP-dependent protein kinases in vitro. J Neurosci *15:*2385-95.

Galasinski SC, Resing KA, Goodrich JA, and Ahn NG (2002) Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. J Biol Chem *277:*19618-26.

Gasser SM, and Cockell MM (2001) The molecular biology of the SIR proteins. Gene *279:*1-16.

Gavet O, Ozon S, Manceau V, Lawler S, Curmi P, and Sobel A (1998) The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. J Cell Sci *111:*3333-46.

Gilbert J, Baker SD, Bowling MK, Grochow L, Figg WD, Zabelina Y, Donehower RC, and Carducci MA (2001) A phase I dose escalation and bioavailability study of oral sodium phenylbutyrate in patients with refractory solid tumor malignancies. Clin Cancer Res *7:*2292-300.

Glaser KB, Li J, Staver MJ, Wei RQ, Albert DH, and Davidsen SK (2003) Role of Class I and Class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA. Biochem Biophys Res Commun *310:*529-36.

Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, and Cohen P (1997) Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. Embo J *16:*3563-71.

Goetz MP, Toft DO, Ames MM, and Erlichman C (2003) The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. Ann Oncol *14:*1169-76.

Goh KC, deVeer MJ, and Williams BR (2000) The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. Embo J *19:*4292-7.

Gore SD, and Carducci MA (2000) Modifying histones to tame cancer: clinical development of sodium phenylbutyrate and other histone deacetylase inhibitors. Expert Opin Investig Drugs *9:*2923-34.

Gore SD, Weng LJ, Zhai S, Figg WD, Donehower RC, Dover GJ, Grever M, Griffin CA, Grochow LB, Rowinsky EK, Zabalena Y, Hawkins AL, Burks K, and Miller CB (2001) Impact of the putative differentiating agent sodium phenylbutyrate on myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res *7:*2330-9.

Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, and Heinzel T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. Embo J *20:*6969-78.

Gray SG, and Ekstrom TJ (2001) The human histone deacetylase family. Exp Cell Res *262:*75-83.

Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D, and Schreiber SL (2001) Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. J Biol Chem *276:*38837-43.

Grozinger CM, Hassig CA, and Schreiber SL (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. Proc Natl Acad Sci U S A *96:*4868-73.

Grozinger CM, and Schreiber SL (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. Proc Natl Acad Sci U S A *97:*7835-40.

Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. Nature *389:*349-52.

Guenther MG, Barak O, and Lazar MA (2001) The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. Mol Cell Biol *21:*6091-101.

Guenther MG, Yu J, Kao GD, Yen TJ, and Lazar MA (2002) Assembly of the SMRT-histone deacetylase 3 repression complex requires the TCP-1 ring complex. Genes Dev *16:*3130-5.

Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, and Robson CN (2004) Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. Prostate *59:*177-89.

Han J, Lee JD, Bibbs L, and Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. Science *265:*808-11.

Hassig CA, Fleischer TC, Billin AN, Schreiber SL, and Ayer DE (1997a) Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. Cell *89:*341-7.

Hassig CA, and Schreiber SL (1997) Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. Curr Opin Chem Biol *1:*300-8.

Hassig CA, Tong JK, and Schreiber SL (1997b) Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer. Chem Biol *4:*783-9.

Hatakeyama M, and Weinberg RA (1995) The role of RB in cell cycle control. Prog Cell Cycle Res *1:*9-19.

He LZ, Tolentino T, Grayson P, Zhong S, Warrell RP, Jr., Rifkind RA, Marks PA, Richon VM, and Pandolfi PP (2001) Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. J Clin Invest *108:*1321-30.

Helin K (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. Curr Opin Genet Dev *8:*28-35.

Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, and Hodin RA (2002) The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. J Nutr *132:*1012-7.

Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, and Prydz H (2002) Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. Nucleic Acids Res *30:*1757-66.

Hoogeveen AT, Rossetti S, Stoyanova V, Schonkeren J, Fenaroli A, Schiaffonati L, van Unen L, and Sacchi N (2002) The transcriptional corepressor MTG16a contains a novel nucleolar targeting sequence deranged in t (16; 21)-positive myeloid malignancies. Oncogene *21:*6703-12.

Hromas R, Shopnick R, Jumean HG, Bowers C, Varella-Garcia M, and Richkind K (2000) A novel syndrome of radiation-associated acute myeloid leukemia involving AML1 gene translocations. Blood *95:*4011-3.

Hu E, Chen Z, Fredrickson T, Zhu Y, Kirkpatrick R, Zhang GF, Johanson K, Sung CM, Liu R, and Winkler J (2000) Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. J Biol Chem *275:*15254-64.

Hu E, Dul E, Sung CM, Chen Z, Kirkpatrick R, Zhang GF, Johanson K, Liu R, Lago A, Hofmann G, Macarron R, De Los Frailes M, Perez P, Krawiec J, Winkler J, and Jaye M (2003) Identification of Novel Isoform-Selective Inhibitors within Class I Histone Deacetylases. J Pharmacol Exp Ther *307:*720-728.

Hu JF, Vu TH, and Hoffman AR (1996) Promoter-specific modulation of insulin-like growth factor II genomic imprinting by inhibitors of DNA methylation. J Biol Chem *271:*18253-62.

Huber LA, Ullrich O, Takai Y, Lutcke A, Dupree P, Olkkonen V, Virta H, de Hoop MJ, Alexandrov K, Peter M, and et al. (1994) Mapping of Ras-related GTP-binding proteins by GTP overlay following two-dimensional gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci U S A *91:*7874-8.

Ida K, Kitabayashi I, Taki T, Taniwaki M, Noro K, Yamamoto M, Ohki M, and Hayashi Y (1997) Adenoviral E1A-associated protein p300 is involved in acute myeloid leukemia with t(11;22)(q23;q13). Blood *90:*4699-704.

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

Ishizuka T, and Lazar MA (2003) The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor. Mol Cell Biol *23:*5122-31.

Izumi T, Gomi H, Kasai K, Mizutani S, and Torii S (2003) The roles of Rab27 and its effectors in the regulated secretory pathways. Cell Struct Funct *28:*465-74.

Jahn R, and Sudhof TC (1994) Synaptic vesicles and exocytosis. Annu Rev Neurosci *17:*219-46.

Jenuwein T, and Allis CD (2001) Translating the histone code. Science *293:*1074-80.

Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, and Han J (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). J Biol Chem *271:*17920-6.

Johnson CA, White DA, Lavender JS, O'Neill LP, and Turner BM (2002) Human class I histone deacetylase complexes show enhanced catalytic activity in the presence of ATP and co-immunoprecipitate with the ATP-dependent chaperone protein Hsp70. J Biol Chem *277:*9590-7.

Johnstone RW (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. Nat Rev Drug Discov *1:*287-99.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, and Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet *19:*187-91.

Joshi MB, Lin DT, Chiang PH, Goldman ND, Fujioka H, Aikawa M, and Syin C (1999) Molecular cloning and nuclear localization of a histone deacetylase homologue in Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol *99:*11-9.

Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, and Wu CW (2000) Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. J Biol Chem *275:*20436-43.

Jung M (2001) Inhibitors of histone deacetylase as new anticancer agents. Curr Med Chem *8:*1505-11.

Kao HY, Lee CH, Komarov A, Han CC, and Evans RM (2002) Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. J Biol Chem *277:*187-93.

Kawabe H, Sakisaka T, Yasumi M, Shingai T, Izumi G, Nagano F, Deguchi-Tawarada M, Takeuchi M, Nakanishi H, and Takai Y (2003) A novel rabconnectin-3-binding protein that directly binds a GDP/GTP exchange protein for Rab3A small G protein implicated in Ca(2+)-dependent exocytosis of neurotransmitter. Genes Cells *8:*537-46.

Kawasaki H, Schiltz L, Chiu R, Itakura K, Taira K, Nakatani Y, and Yokoyama KK (2000) ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. Nature *405:*195-200.

Keen JC, Yan L, Mack KM, Pettit C, Smith D, Sharma D, and Davidson NE (2003) A novel histone deacetylase inhibitor, scriptaid, enhances expression of functional estrogen receptor alpha (ER) in ER negative human breast cancer cells in combination with 5-aza 2'-deoxycytidine. Breast Cancer Res Treat *81:*177-86.

Kelly WK, O'Connor OA, and Marks PA (2002) Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. Expert Opin Investig Drugs *11:*1695-713.

Kiernan R, Bres V, Ng RW, Coudart MP, El Messaoudi S, Sardet C, Jin DY, Emiliani S, and Benkirane M (2003) Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. J Biol Chem *278:*2758-66.

Kikuchi T, Itoh F, Toyota M, Suzuki H, Yamamoto H, Fujita M, Hosokawa M, and Imai K (2002) Aberrant methylation and histone deacetylation of cyclooxygenase 2 in gastric cancer. Int J Cancer *97:*272-7.

Kim AR, Choi WH, Lee SR, Kim JS, Jeon CY, Kim JI, Kim J, Lee JY, Kim EG, and Park JB (2002) Phosphorylation of 46-kDa protein of synaptic vesicle membranes is stimulated by GTP and Ca2+/calmodulin. Exp Mol Med *34:*434-43.

Kim DH, Kim M, and Kwon HJ (2003) Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancer agents. J Biochem Mol Biol *36:*110-9.
Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, and Kim KW (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. Nat Med *7:*437-43.
Kim YI (2003) Role of folate in colon cancer development and progression. J Nutr *133:*3731S-3739S.
Kishida S, Shirataki H, Sasaki T, Kato M, Kaibuchi K, and Takai Y (1993) Rab3A GTPase-activating protein-inhibiting activity of Rabphilin-3A, a putative Rab3A target protein. J Biol Chem *268:*22259-61.
Khochbin S, Yoshida M, and Horinouchi S (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. Proc Natl Acad Sci U S A *98:*87-92.
Koch A, Giembycz M, Ito K, Lim S, Jazrawi E, Barnes PJ, Adcock I, Erdmann E, and Chung KF (2003) MAP-kinase modulation of NF-{kappa}B-induced GM-CSF release from human alveolar macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol.
Korber P, and Horz W (2004) SWRred not shaken; mixing the histones. Cell *117:*5-7.
Kornberg RD (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. Science *184:*868-71.
Kornberg RD, and Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. Cell *98:*285-94.
Kouraklis G, and Theocharis S (2002) Histone deacetylase inhibitors and anticancer therapy. Curr Med Chem Anti-Canc Agents *2:*477-84.
Kouzarides T (1999) Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. Curr Opin Genet Dev *9:*40-8.
Kouzarides T (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? Embo J *19:*1176-9.
Kraker AJ, Mizzen CA, Hartl BG, Miin J, Allis CD, and Merriman RL (2003) Modulation of histone acetylation by [4-(acetylamino)-N-(2-amino-phenyl) benzamide] in HCT-8 colon carcinoma. Mol Cancer Ther *2:*401-8.
Kramer OH, Gottlicher M, and Heinzel T (2001) Histone deacetylase as a therapeutic target. Trends Endocrinol Metab *12:*294-300.
Kroef MJ, Bolk MJ, Muus P, Wessels JW, Beverstock GC, Willemze R, and Landegent JE (1997) Mosaicism of the 5q deletion as assessed by interphase FISH is a common phenomenon in MDS and restricted to myeloid cells. Leukemia *11:*519-23.
Kumar S, Boehm J, and Lee JC (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. Nat Rev Drug Discov *2:*717-26.
Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, and Young PR (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. Biochem Biophys Res Commun *235:*533-8.
Kuo MH, and Allis CD (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. Bioessays *20:*615-26.
Kwon HJ, Owa T, Hassig CA, Shimada J, and Schreiber SL (1998) Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. Proc Natl Acad Sci U S A *95:*3356-61.

Kyriakis JM, and Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev *81:*807-69.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227:*680-5.

Lechner T, Lusser A, Brosch G, Eberharter A, Goralik-Schramel M, and Loidl P (1996) A comparative study of histone deacetylases of plant, fungal and vertebrate cells. Biochim Biophys Acta *1296:*181-8.

Lee H, Rezai-Zadeh N, and Seto E (2004) Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A. Mol Cell Biol *24:*765-73.

Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, and et al. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. Nature *372:*739-46.

Lee JD, Ulevitch RJ, and Han J (1995) Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. Biochem Biophys Res Commun *213:*715-24.

Lee SK, Kim JH, Lee YC, Cheong J, and Lee JW (2000) Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor. J Biol Chem *275:*12470-4.

Lenny N, Meyers S, and Hiebert SW (1995) Functional domains of the t(8;21) fusion protein, AML-1/ETO. Oncogene *11:*1761-9.

Lenny N, Westendorf JJ, and Hiebert SW (1997) Transcriptional regulation during myelopoiesis. Mol Biol Rep *24:*157-68.

Li J, Wang J, Nawaz Z, Liu JM, Qin J, and Wong J (2000) Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. Embo J *19:*4342-50.

Li LH, McCarthy P, and Hui SW (2001) High-efficiency electrotransfection of human primary hematopoietic stem cells. Faseb J *15:*586-8.

Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, and Han J (1996) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. Biochem Biophys Res Commun *228:*334-40.

Liedtke W, Leman EE, Fyffe RE, Raine CS, and Schubart UK (2002) Stathmin-deficient mice develop an age-dependent axonopathy of the central and peripheral nervous systems. Am J Pathol *160:*469-80.

Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH, Jr., and Evans RM (1998) Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. Nature *391:*811-4.

Liu XF, and Bagchi MK (2004) Recruitment of distinct chromatin modifying complexes by tamoxifen-complexed estrogen receptor at natural target gene promoters in vivo. J Biol Chem *279:*15050-8.

Liverton NJ, Butcher JW, Claiborne CF, Claremon DA, Libby BE, Nguyen KT, Pitzenberger SM, Selnick HG, Smith GR, Tebben A, Vacca JP, Varga SL, Agarwal L, Dancheck K, Forsyth AJ, Fletcher DS, Frantz B, Hanlon WA, Harper CF, Hofsess SJ, Kostura M, Lin J, Luell S, O'Neill EA, O'Keefe SJ, and et al. (1999) Design and synthesis of potent, selective, and orally bioavailable tetrasubstituted imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase. J Med Chem *42:*2180-90.

Loscher W (1999) Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. Prog Neurobiol *58:*31-59.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, and Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution [see comments]. Nature *389:*251-60.

Luo RX, and Dean DC (1999) Chromatin remodeling and transcriptional regulation [In Process Citation]. J Natl Cancer Inst *91:*1288-94.

Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Patten A, Moniwa M, Davie JR, Huynh KD, Bardwell VJ, Lavinsky RM, Rosenfeld MG, Glass C, Seto E, and Hiebert SW (1998) ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. Mol Cell Biol *18:*7176-84.

Mahadevan LC, Willis AC, and Barratt MJ (1991) Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. Cell *65:*775-83.

Mahlknecht U, Emiliani S, Najfeld V, Young S, and Verdin E (1999a) Genomic organization and chromosomal localization of the human histone deacetylase 3 gene. Genomics *56:*197-202.

Mahlknecht U, Hoelzer D, Bucala R, and Verdin E (1999b) Cloning and characterization of the murine histone deacetylase (HDAC3). Biochem Biophys Res Commun *263:*482-90.

Mahlknecht U, Ottmann OG, and Hoelzer D (2000) When the band begins to play: Histone acetylation caught in the crossfire of gene control. Molecular Carcinogenesis *27:*268-271.

Mahlknecht U, Ottmann OG, and Hoelzer D (2001) Far-Western based protein-protein interaction screening of high-density protein filter arrays. J Biotechnol *88:*89-94.

Mahlknecht U (2003) Charakterisierung, Funktion und pathogenetische Bedeutung von Histon-Deacetylasen. [Habilitationsschrift] Frankfurt, Deutschland, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt.

Mariadason JM, Corner GA, and Augenlicht LH (2000) Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. Cancer Res *60:*4561-72.

Marks PA, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, and Kelly WK (2001a) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. Nat Rev Cancer *1:*194-202.

Marks PA, Richon VM, Breslow R, and Rifkind RA (2001b) Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. Curr Opin Oncol *13:*477-83.

Marks PA, Richon VM, and Rifkind RA (2000) Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. J Natl Cancer Inst *92:*1210-6.

McBain JA, Eastman A, Nobel CS, and Mueller GC (1997) Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors. Biochem Pharmacol *53:*1357-68.

McIntosh GH, Royle PJ, and Pointing G (2001) Wheat aleurone flour increases cecal beta-glucuronidase activity and butyrate concentration and reduces colon adenoma burden in azoxymethane-treated rats. J Nutr *131:*127-31.

Medina V, Edmonds B, Young GP, James R, Appleton S, and Zalewski PD (1997) Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c- dependent pathway. Cancer Res *57:*3697-707.

Menasche G, Feldmann J, Houdusse A, Desaymard C, Fischer A, Goud B, and de Saint Basile G (2003) Biochemical and functional characterization of Rab27a mutations occurring in Griscelli syndrome patients. Blood *101:*2736-42.

Miesfeld R (2001): Lecture 16 - Yeast Models and Protein Expression (AMG text pp. 191-195); Internetadresse: www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture16/Lecture16-text.pdf.

Miller RW, and Rubinstein JH (1995) Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. Am J Med Genet *56:*112-5.

Minucci S, Nervi C, Lo Coco F, and Pelicci PG (2001) Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? Oncogene *20:*3110-5.

Miska EA, Karlsson C, Langley E, Nielsen SJ, Pines J, and Kouzarides T (1999) HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor [In Process Citation]. Embo J *18:*5099-107.

Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T, and DePinho RA (1994) p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. Nature *371:*72-4.

Muraoka M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Shitara N, Chong JM, Iwama T, and Miyaki M (1996) p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. Oncogene *12:*1565-9.

Murnion ME, Adams RR, Callister DM, Allis CD, Earnshaw WC, and Swedlow JR (2001) Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. J Biol Chem *276:*26656-65.

Nakajima H, Kim YB, Terano H, Yoshida M, and Horinouchi S (1998) FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. Exp Cell Res *241:*126-33.

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, and Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex [see comments]. Nature *393:*386-9.

Naruse Y, Aoki T, Kojima T, and Mori N (1999) Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. Proc Natl Acad Sci U S A *96:*13691-13696.

Neidhart S, Antonsson B, Gillieron C, Vilbois F, Grenningloh G, and Arkinstall S (2001) c-Jun N-terminal kinase-3 (JNK3)/stress-activated protein kinase-beta (SAPKbeta) binds and phosphorylates the neuronal microtubule regulator SCG10. FEBS Lett *508:*259-64.

Newmark HL, Lupton JR, and Young CW (1994) Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status. Cancer Lett *78:*1-5.

Ng HH, and Bird A (1999) DNA methylation and chromatin modification. Curr Opin Genet Dev *9:*158-63.

Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, and Bird A (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex [see comments]. Nat Genet *23:*58-61.

Okazaki T, Wang H, Masliah E, Cao M, Johnson SA, Sundsmo M, Saitoh T, and Mori N (1995) SCG10, a neuron-specific growth-associated protein in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging *16:*883-94.

Okazaki T, Yoshida BN, Avraham KB, Wang H, Wuenschell CW, Jenkins NA, Copeland NG, Anderson DJ, and Mori N (1993) Molecular diversity of the SCG10/stathmin gene family in the mouse. Genomics *18:*360-73.

Olofsson B, Chardin P, Touchot N, Zahraoui A, and Tavitian A (1988) Expression of the ras-related ralA, rho12 and rab genes in adult mouse tissues. Oncogene *3:*231-4.

Ordentlich P, Downes M, and Evans RM (2001) Corepressors and nuclear hormone receptor function. Curr Top Microbiol Immunol *254:*101-16.

Oster SK, Ho CS, Soucie EL, and Penn LZ (2002) The myc oncogene: MarvelouslY Complex. Adv Cancer Res *84:*81-154.

Ouwens DM, de Ruiter ND, van der Zon GC, Carter AP, Schouten J, van der Burgt C, Kooistra K, Bos JL, Maassen JA, and van Dam H (2002) Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. Embo J *21:*3782-93.

Ozawa Y, Towatari M, Tsuzuki S, Hayakawa F, Maeda T, Miyata Y, Tanimoto M, and Saito H (2001) Histone deacetylase 3 associates with and represses the transcription factor GATA-2. Blood *98:*2116-23.

Paas Y, and Fishelson Z (1995) Shedding of tyrosine and serine/threonine ecto-protein kinases from human leukemic cells. Arch Biochem Biophys *316:*780-8.

Palaparti A, Baratz A, and Stifani S (1997) The Groucho/transducin-like enhancer of split transcriptional repressors interact with the genetically defined amino-terminal silencing domain of histone H3. J Biol Chem *272:*26604-10.

Pan H, and Griep AE (1995) Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. Genes Dev *9:*2157-69.

Park JB, Kim JS, Lee JY, Kim J, Seo JY, and Kim AR (2002) GTP binds to Rab3A in a complex with Ca2+/calmodulin. Biochem J *362:*651-7.

Patra SK, Patra A, and Dahiya R (2001) Histone deacetylase and DNA methyltransferase in human prostate cancer. Biochem Biophys Res Commun *287:*705-13.

Pereira-Leal JB, Hume AN, and Seabra MC (2001) Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease. FEBS Lett *498:*197-200.

Pereira-Leal JB, Strom M, Godfrey RF, and Seabra MC (2003) Structural determinants of Rab and Rab Escort Protein interaction: Rab family motifs define a conserved binding surface. Biochem Biophys Res Commun *301:*92-7.

Perkins ND, Felzien LK, Betts JC, Leung K, Beach DH, and Nabel GJ (1997) Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. Science *275:*523-7.

Peters U, Sinha R, Chatterjee N, Subar AF, Ziegler RG, Kulldorff M, Bresalier R, Weissfeld JL, Flood A, Schatzkin A, and Hayes RB (2003) Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. Lancet *361:*1491-5.

Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ, and et al. (1995) Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co- activator CBP [see comments]. Nature *376:*348-51.

Pflum MK, Tong JK, Lane WS, and Schreiber SL (2001) Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. J Biol Chem *276:*47733-41.

Piekarz RL, Robey R, Sandor V, Bakke S, Wilson WH, Dahmoush L, Kingma DM, Turner ML, Altemus R, and Bates SE (2001) Inhibitor of histone deacetylation,

depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report. Blood *98:*2865-8.

Pili R, Kruszewski MP, Hager BW, Lantz J, and Carducci MA (2001) Combination of phenylbutyrate and 13-cis retinoic acid inhibits prostate tumor growth and angiogenesis. Cancer Res *61:*1477-85.

Pinckard RN, Hawkins D, and Farr RS (1968) In vitro acetylation of plasma proteins, enzymes and DNA by aspirin. Nature *219:*68-9.

Piotrowicz RS, Hickey E, and Levin EG (1998) Heat shock protein 27 kDa expression and phosphorylation regulates endothelial cell migration. Faseb J *12:*1481-90.

Pollard KJ, and Peterson CL (1998) Chromatin remodeling: a marriage between two families? Bioessays *20:*771-80.

Prakash S, Foster BJ, Meyer M, Wozniak A, Heilbrun LK, Flaherty L, Zalupski M, Radulovic L, Valdivieso M, and LoRusso PM (2001) Chronic oral administration of CI-994: a phase 1 study. Invest New Drugs *19:*1-11.

Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, and Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. J Biol Chem *270:*7420-6.

Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, and Davis RJ (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. Mol Cell Biol *16:*1247-55.

Randhawa GS, Bell DW, Testa JR, and Feinberg AP (1998) Identification and mapping of human histone acetylation modifier gene homologues. Genomics *51:*262-9.

Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, Li M, Pesaresi M, Poczewski H, Langer B, Kerjaschki D, Henger A, Blattner SM, Kretzler M, Wanke R, and D'Amico G (2003) Glomerular podocytes possess the synaptic vesicle molecule Rab3A and its specific effector rabphilin-3a. Am J Pathol *163:*889-99.

Reddy BS, Hirose Y, Cohen LA, Simi B, Cooma I, and Rao CV (2000) Preventive potential of wheat bran fractions against experimental colon carcinogenesis: implications for human colon cancer prevention. Cancer Res *60:*4792-7.

Redner RL, Wang J, and Liu JM (1999) Chromatin remodeling and leukemia: new therapeutic paradigms. Blood *94:*417-28.

Regazzi R, Ravazzola M, Iezzi M, Lang J, Zahraoui A, Andereggen E, Morel P, Takai Y, and Wollheim CB (1996) Expression, localization and functional role of small GTPases of the Rab3 family in insulin-secreting cells. J Cell Sci *109:*2265-73.

Rettie AE, Rettenmeier AW, Howald WN, and Baillie TA (1987) Cytochrome P-450--catalyzed formation of delta 4-VPA, a toxic metabolite of valproic acid. Science *235:*890-3.

Richards-Smith B, Novak EK, Jang EK, He P, Haslam RJ, Castle D, Whiteheart SW, and Swank RT (1999) Analyses of proteins involved in vesicular trafficking in platelets of mouse models of Hermansky Pudlak syndrome. Mol Genet Metab *68:*14-23.

Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, and Marks PA (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. Proc Natl Acad Sci U S A *95:*3003-7.

Richter S, Vandezande K, Chen N, Zhang K, Sutherland J, Anderson J, Han L, Panton R, Branco P, and Gallie B (2003) Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. Am J Hum Genet *72:*253-69.

Riederer BM, Pellier V, Antonsson B, Di Paolo G, Stimpson SA, Lutjens R, Catsicas S, and Grenningloh G (1997) Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG10. Proc Natl Acad Sci U S A *94:*741-5.

Roth SY, and Allis CD (1996) Histone acetylation and chromatin assembly: a single escort, multiple dances? Cell *87:*5-8.

Rousseau-Merck MF, Zahraoui A, Bernheim A, Touchot N, Miglierina R, Tavitian A, and Berger R (1989) Chromosome mapping of the human ras-related rab3A gene to 19p13.2. Genomics *5:*694-8.

Rowley JD (1998) The critical role of chromosome translocations in human leukemias. Annu Rev Genet *32:*495-519.

Saccani S, Pantano S, and Natoli G (2002) p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. Nat Immunol *3:*69-75.

Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, and Nakanishi O (1999) A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. Proc Natl Acad Sci U S A *96:*4592-7.

Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbot Laboratory Press.

Sano M, and Kitajima S (1996) Inhibition of the nerve growth factor-induced outgrowth of neurites by trichostatin A requires protein synthesis de novo in PC12D cells. Brain Res *742:*195-202.

Sasaki T, Wada T, Kishimoto H, Irie-Sasaki J, Matsumoto G, Goto T, Yao Z, Wakeham A, Mak TW, Suzuki A, Cho SK, Zuniga-Pflucker JC, Oliveira-dos-Santos AJ, Katada T, Nishina H, and Penninger JM (2001) The stress kinase mitogen-activated protein kinase kinase (MKK)7 is a negative regulator of antigen receptor and growth factor receptor-induced proliferation in hematopoietic cells. J Exp Med *194:*757-68.

Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A, and Allis CD (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. Science *285:*886-91.

Sauve DM, Anderson HJ, Ray JM, James WM, and Roberge M (1999) Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH2-terminal domain during mitotic chromosome condensation. J Cell Biol *145:*225-35.

Schmidt A, Caron E, and Hall A (2001) Lipopolysaccharide-induced activation of beta2-integrin function in macrophages requires Irak kinase activity, p38 mitogen- activated protein kinase, and the Rap1 GTPase. Mol Cell Biol *21:*438-48.

Seabra MC, Mules EH, and Hume AN (2002) Rab GTPases, intracellular traffic and disease. Trends Mol Med *8:*23-30.

Seger R, and Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. Faseb J *9:*726-35.

Shin HJ, Baek KH, Jeon AH, Kim SJ, Jang KL, Sung YC, Kim CM, and Lee CW (2003) Inhibition of histone deacetylase activity increases chromosomal instability by the aberrant regulation of mitotic checkpoint activation. Oncogene *22:*3853-8.

Shirataki H, Kaibuchi K, Sakoda T, Kishida S, Yamaguchi T, Wada K, Miyazaki M, and Takai Y (1993) Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. Mol Cell Biol *13:*2061-8.

Sif S, Saurin AJ, Imbalzano AN, and Kingston RE (2001) Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. Genes Dev *15:*603-18.

Sng JC, Taniura H, and Yoneda Y (2004) A tale of early response genes. Biol Pharm Bull *27:*606-12.

Sobel A, Boutterin MC, Beretta L, Chneiweiss H, Doye V, and Peyro-Saint-Paul H (1989) Intracellular substrates for extracellular signaling. Characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein (stathmin). J Biol Chem *264:*3765-72.

Sparrow DB, Miska EA, Langley E, Reynaud-Deonauth S, Kotecha S, Towers N, Spohr G, Kouzarides T, and Mohun TJ (1999) MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR. Embo J *18:*5085-98.

Spencer VA, and Davie JR (1999) Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. Gene *240:*1-12.

Stein R, Mori N, Matthews K, Lo LC, and Anderson DJ (1988) The NGF-inducible SCG10 mRNA encodes a novel membrane-bound protein present in growth cones and abundant in developing neurons. Neuron *1:*463-76.

Su GH, Sohn TA, Ryu B, and Kern SE (2000) A novel histone deacetylase inhibitor identified by high-throughput transcriptional screening of a compound library. Cancer Res *60:*3137-42.

Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, and Forrester WC (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A *99:*5515-20.

Sun JM, Chen HY, Moniwa M, Litchfield DW, Seto E, and Davie JR (2002) The transcriptional repressor Sp3 is associated with CK2-phosphorylated histone deacetylase 2. J Biol Chem *277:*35783-6.

Suzuki T, Kimura A, Nagai R, and Horikoshi M (2000) Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. Genes Cells *5:*29-41.

Takai Y, Sasaki T, and Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. Physiol Rev *81:*153-208.

Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M, and Inoue M (1999) Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. Cancer Res *59:*551-7.

Takakura M, Kyo S, Sowa Y, Wang Z, Yatabe N, Maida Y, Tanaka M, and Inoue M (2001) Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells. Nucleic Acids Res *29:*3006-11.

Taki T, Sako M, Tsuchida M, and Hayashi Y (1997) The t(11;16)(q23;p13) translocation in myelodysplastic syndrome fuses the MLL gene to the CBP gene. Blood *89:*3945-50.

Taplick J, Kurtev V, Kroboth K, Posch M, Lechner T, and Seiser C (2001) Homo-oligomerisation and nuclear localisation of mouse histone deacetylase 1. J Mol Biol *308:*27-38.

Taunton J, Hassig CA, and Schreiber SL (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p [see comments]. Science *272:*408-11.

Thiel G, Lietz M, and Cramer M (1998) Biological activity and modular structure of RE-1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes. J Biol Chem *273:*26891-9.

Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ, and Mahadevan LC (1999a) The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. Embo J *18:*4779-93.

Thomson S, Mahadevan LC, and Clayton AL (1999b) MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction [see comments]. Semin Cell Dev Biol *10:*205-14.

Tong JK, Hassig CA, Schnitzler GR, Kingston RE, and Schreiber SL (1998) Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. Nature *395:*917-21.

Tong X, Yin L, Giardina C, Ito K, Hanazawa T, Tomita K, Barnes PJ, Adcock IM, Miao F, Gonzalo IG, Lanting L, Natarajan R, Chung YL, Lee MY, Wang AJ, Yao LF, Iwata K, Sano H, Fujii Y, Yamasaki A, Shimizu E, Rahman I, Gilmour PS, Jimenez LA, MacNee W, Caramori G, Lim S, Oates T, Chung KF, Yu Z, Zhang W, Kone BC, and Cosio B (2004) Butyrate suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition. Biochem Biophys Res Commun *317:*463-71.

Trask B, Fertitta A, Christensen M, Youngblom J, Bergmann A, Copeland A, de Jong P, Mohrenweiser H, Olsen A, Carrano A, and et al. (1993) Fluorescence in situ hybridization mapping of human chromosome 19: cytogenetic band location of 540 cosmids and 70 genes or DNA markers. Genomics *15:*133-45.

Tsai SC, and Seto E (2002) Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2. J Biol Chem *277:*31826-33.

Tsukiyama T, and Wu C (1997) Chromatin remodeling and transcription. Curr Opin Genet Dev *7:*182-91.

Turner BM (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. Bioessays *22:*836-45.

Tuschl T (2001) RNA interference and small interfering RNAs. Chembiochem *2:*239-45.

Tyler JK, and Kadonaga JT (1999) The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. Cell *99:*443-6.

Udalova IA, Knight JC, Vidal V, Nedospasov SA, and Kwiatkowski D (1998) Complex NF-kappaB interactions at the distal tumor necrosis factor promoter region in human monocytes. J Biol Chem *273:*21178-86.

Vanden Berghe W, De Bosscher K, Boone E, Plaisance S, and Haegeman G (1999) The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter [In Process Citation]. J Biol Chem *274:*32091-8.

Van Lint C, Emiliani S, and Verdin E (1996) The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. Gene Expr *5:*245-53.

Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, and Weinberg RA (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. Cell *107:*149-59.

von Schnakenburg C, Strehlau J, Ehrich JH, and Melk A (2002) Quantitative gene expression of TGF-beta1, IL-10, TNF-alpha and Fas Ligand in renal cortex and medulla. Nephrol Dial Transplant *17:*573-9.

Wade PA, Jones PL, Vermaak D, and Wolffe AP (1998) A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from Xenopus laevis cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. Curr Biol *8:*843-6.

Wang AH, Bertos NR, Vezmar M, Pelletier N, Crosato M, Heng HH, Th'ng J, Han J, and Yang X-J (1999) HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. Mol Cell Biol *19:*7816-27.

Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, and Liu JM (1998) ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. Proc Natl Acad Sci U S A *95:*10860-5.

Wang Q, Li N, Wang X, Kim MM, and Evers BM (2002) Augmentation of sodium butyrate-induced apoptosis by phosphatidylinositol 3'-kinase inhibition in the KM20 human colon cancer cell line. Clin Cancer Res *8:*1940-7.

Wang XS, Diener K, Manthey CL, Wang S, Rosenzweig B, Bray J, Delaney J, Cole CN, Chan-Hui PY, Mantlo N, Lichenstein HS, Zukowski M, and Yao Z (1997) Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem *272:*23668-74.

Warrell RP, Jr., He LZ, Richon V, Calleja E, and Pandolfi PP (1998) Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase [see comments]. J Natl Cancer Inst *90:*1621-5.

Waskiewicz AJ, and Cooper JA (1995) Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. Curr Opin Cell Biol *7:*798-805.

Wei LN, Hu X, Chandra D, Seto E, and Farooqui M (2000) Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. J Biol Chem *275:*40782-7.

Weidle UH, and Grossmann A (2000) Inhibition of histone deacetylases: a new strategy to target epigenetic modifications for anticancer treatment. Anticancer Res *20:*1471-85.

Winston F, and Allis CD (1999) The bromodomain: a chromatin-targeting module? [news]. Nat Struct Biol *6:*601-4.

Wlodarska I, De Wolf-Peeters C, Michaux L, Mecucci C, Verhoef G, Cassiman JJ, and Van den Berghe H (1995) A new t(2;5) translocation in a null cell type CD30 positive anaplastic large cell lymphoma case. Leukemia *9:*1685-8.

Wolffe AP, and Hayes JJ (1999) Chromatin disruption and modification. Nucleic Acids Res *27:*711-20.

Wolffe AP, Jones PL, and Wade PA (1999) DNA demethylation. Proc Natl Acad Sci U S A *96:*5894-6.

Xu L, Glass CK, and Rosenfeld MG (1999) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. Curr Opin Genet Dev *9:*140-7.

Xue Y, Wong J, Moreno GT, Young MK, Cote J, and Wang W (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. Mol Cell *2:*851-61.

Yaekura K, Julyan R, Wicksteed BL, Hays LB, Alarcon C, Sommers S, Poitout V, Baskin DG, Wang Y, Philipson LH, and Rhodes CJ (2003) Insulin secretory deficiency and glucose intolerance in Rab3A null mice. J Biol Chem *278:*9715-21.

Yang WM, Inouye C, Zeng Y, Bearss D, and Seto E (1996a) Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. Proc Natl Acad Sci U S A *93:*12845-50.

Yang WM, Tsai SC, Wen YD, Fejer G, and Seto E (2002) Functional domains of histone deacetylase-3. J Biol Chem *277:*9447-54.

Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, and Nakatani Y (1996b) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. Nature *382:*319-24.

Yang YW, and Yang JC (1997) Studies of DEAE-dextran-mediated gene transfer. Biotechnol Appl Biochem *25 (Pt 1):*47-51.

Yarden RI, and Brody LC (1999) BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. Proc Natl Acad Sci U S A *96:*4983-8.

Yoon HG, Chan DW, Huang ZQ, Li J, Fondell JD, Qin J, and Wong J (2003) Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. Embo J *22:*1336-46.

Yoshida M, and Beppu T (1988) Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A. Exp Cell Res *177:*122-31.

Yoshida M, Furumai R, Nishiyama M, Komatsu Y, Nishino N, and Horinouchi S (2001) Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. Cancer Chemother Pharmacol *48:*S20-6.

Yoshida M, Horinouchi S, and Beppu T (1995) Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. Bioessays *17:*423-30.

Yoshida M, Kijima M, Akita M, and Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. J Biol Chem *265:*17174-9.

Yu BD, Hanson RD, Hess JL, Horning SE, and Korsmeyer SJ (1998) MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A *95:*10632-6.

Yu J, Li Y, Ishizuka T, Guenther MG, and Lazar MA (2003) A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. Embo J *22:*3403-10.

Yu KH, Weng LJ, Fu S, Piantadosi S, and Gore SD (1999) Augmentation of phenylbutyrate-induced differentiation of myeloid leukemia cells using all-trans retinoic acid. Leukemia *13:*1258-65.

Zahraoui A, Touchot N, Chardin P, and Tavitian A (1989) The human Rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to yeast YPT1 and SEC4 products involved in secretion. J Biol Chem *264:*12394-401.

Zamir I, Harding HP, Atkins GB, Horlein A, Glass CK, Rosenfeld MG, and Lazar MA (1996) A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. Mol Cell Biol *16:*5458-65.

Zerial M, and McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. Nat Rev Mol Cell Biol *2:*107-17.

Zhang J, Kalkum M, Chait BT, and Roeder RG (2002) The N-CoR-HDAC3 Nuclear Receptor Corepressor Complex Inhibits the JNK Pathway through the Integral Subunit GPS2. Mol Cell *9:*611-23.

Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, and Matthias P (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. Embo J *22:*1168-79.

Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, and Reinberg D (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. Genes Dev *13:*1924-35.

Zhang Y, Sun ZW, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hampsey M, and Reinberg D (1998) SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. Mol Cell *1:*1021-31.

Zhang Y, Turkson J, Carter-Su C, Smithgall T, Levitzki A, Kraker A, Krolewski JJ, Medveczky P, and Jove R (2000) Activation of Stat3 in v-Src-transformed fibroblasts requires cooperation of Jak1 kinase activity. J Biol Chem *275:*24935-44.

Zhou X, Marks PA, Rifkind RA, and Richon VM (2001) Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. Proc Natl Acad Sci U S A *98:*10572-7.

Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, and Smith MA (2002) The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. Neurosignals *11:*270-81.

Zhu XX, Kozarsky K, Strahler JR, Eckerskorn C, Lottspeich F, Melhem R, Lowe J, Fox DA, Hanash SM, and Atweh GF (1989) Molecular cloning of a novel human leukemia-associated gene. Evidence of conservation in animal species. J Biol Chem *264:*14556-60.

7 Anhang

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Primer wurden für die Real-Time-PCR für sowie die Sequenzierung und den Einbau von Mutationen in Plasmiden verwendet.

Bezeichnung	Sequenz
Oligonukleotide für die Real-Time-PCR:	
GaPDH Primer vorwärts	5’-gaaggtgaaggtcggagtc-3’
GaPDH Primer rückwärts	5’-gaagatggtgatgggatttc-3’
GaPDH Sonde	5’-caagcttcccgttctcagcc-3’
Il1β Primer vorwärts	5’-gcctgaagcccttgctgtag-3’
Il1β Primer rückwärts	5’-ccagtacccccaggagaagat-3’
Il1β Sonde	5’-catccagctacgaatctccgaccacc-3’
TNF alpha Primer vorwärts	5’-aatcggcccgactatctcg-3’
TNF alpha Primer rückwärts	5’-tcctcacagggcaatgatcc-3’
TNF alpha Sonde	5’-ctttgccgagtctgggcaggtctacttt-3’
Oligonukleotide für die Sequenzierung der Plasmide:	
SP6 (pcDNA3.1)	5'-gaatttaggtgacactatagaag-3'
T7 (pcDNA3.1)	5'-taatacgactcactataggg-3'
Oligonukleotide für die Mutationen (Serin zu Alanin) bzw. Trunkationen (Einbau von Stopcodons) im Insert HDAC3 des Plasmids pGEX-4T3-HDAC3:	
Stop bei AS 3 vorwärts	5’-cggccgcatggcctagaccgtggcctatttc-3’
Stop bei AS 3 rückwärts	5’-gaaataggccacggtctaggccatgcggccg-3’
Stop bei AS 31 vorwärts	5’-catcgcctggcatagacccatagcctggtcc-3’
Stop bei AS 31 rückwärts	5’-ggaccaggctatgggtctatgccaggcgatg-3’

Stop bei AS 49 vorwärts	5’-gatgatcgtcttctagccataccaggcctcc-3’
Stop bei AS 49 rückwärts	5’-ggaggcctggtatggctagaagacgatcatc-3’
Stop bei AS 66 vorwärts	5’-ccactccgaggactagattgacttcctgc-3’
Stop bei AS 66 rückwärts	5’-gcaggaagtcaatctagtcctcggagtgg-3’
Stop bei AS 137 vorwärts	5’-ggtctgcaccatgcctagaagtttgagg-3’
Stop bei AS 137 rückwärts	5’-cctcaaacttctaggcatggtgcagacc-3’
Stop bei AS 198 vorwärts	5’-cacaaatacggaaattagttcttccctggcacagg-3’
Stop bei AS 198 rückwärts	5’-cctgtgccagggaagaactaatttccgtatttgtg-3’
Stop bei AS 266 vorwärts	5’-gctgtgatcgatagggctgctttaacctcagc-3’
Stop bei AS 266 rückwärts	5’-gctgaggttaaagcagccctatcgatcacagc-3’
Stop bei AS 331 vorwärts	5’-ccctatagtgaatacttcgagtagtttgccccagac-3’
Stop bei AS 331 rückwärts	5’-gtctggggcaaactactcgaagtattcactataggg-3’
Serin zu Alanin Pos. 54 vorwärts	5’-gccataccaggccgcccagcatgacatgtgc-3’
Serin zu Alanin Pos. 54 rückwärts	5’-gcacatgtcatgctgggcggcctggtatggc-3’
Serin zu Alanin Pos. 63 vorwärts	5’-gtgccgcttccacgccgaggactacattg-3’
Serin zu Alanin Pos. 63 rückwärts	5’-caatgtagtcctcggcgtggaagcggcac-3’

Tabelle 7: Adressen der Pharmafirmen

Amersham Biosciences	Amersham Biosciences Europe GmbH Munzinger Str. 9 79111 Freiburg
Apotheke des Klinikums der JWG-Universität	Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt Theodor-Stern-Kai 7 60590 Frankfurt
AppliChem	AppliChem GmbH Ottoweg 4 64291 Darmstadt
Applied Biosystems	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH Frankfurter Strasse 129b 64293 Darmstadt
B. Braun	B. Braun Melsungen AG Carl-Braun-Strasse 1 34212 Melsungen
Barnstead/Thermolyne	Barnstead International 2555 Kerper Boulevard Dubuque, Iowa USA 52001-1478
Beckman Instruments	Beckman Instruments Inc. PO Box 3100 2500 Harbor Boulevard Fullerton CA, 92634-3100 USA
Berthold Technologies GmbH + CoKG	Berthold Technologies GmbH & Co. KG Calmbacher Str. 22 75323 Bad Wildbad
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories GmbH Heidemannstr. 164 80939 München
Calbiochem Merck Biosciences	Merck Biosciences Ober der Roeth 4 65824 Schwalbach a. Ts.
Chemicon International	Chemicon International Ltd. Fischbacher Weg 3A 65719 Hofheim/Ts.
Corning	Corning GmbH Carl-Billand-Strasse 1 67661 Kaiserslautern
Dianova	Dianova GmbH Mittelweg 176 20148 Hamburg
DSMZ	DSMZ GmbH Mascheroder Weg 1B 38124 Braunschweig
Eppendorf	EppendorfAG Barkhausenweg1 22339Hamburg
Falcon über Greiner bio-one	Greiner Bio-One GmbH Maybachstrasse 2 72636 Frickenhausen

Fisher Scientific	Fisher Scientific GmbH Im Heiligen Feld 17 58239 Schwerte
Fluka – Riedel de Hàen	Fluka Industriestrasse 25 9471 Buchs SG Schweiz
H+P Labortechnik AG	H+P Labortechnik AG Bruckmannring 15-19 85764 Oberschleißheim
Heraeus	Heraeus Holding GmbH Heraeusstrasse 12-14 63450 Hanau
Hettich	Hettich Zentrifugen GmbH & Co. KG Gartenstrasse 100 78532 Tuttlingen
HyClone	HyClone 925 West 1800 South, Logan, UT 84321 USA
ICN Biomedicals	ICN Biomedicals 1263 S. Chillicothe Rd. Aurora, OH 44202-8064 USA
Imgenex über Biocarta	BioCarta Europe GmbH Borsteler Chausee 53 22453 Hamburg
Invitrogen	Invitrogen GmbH Technologiepark Karlsruhe Emmy-Noether Strasse 10 76131 Karlsruhe
Kendro Laboratory Products GmbH	Kendro Laboratory Products GmbH Robert-Bosch-Straße 1 63505 Langenselbold
Kodak	Kodak GmbH Hedelfinger Strasse 60 70327 Stuttgart
Macherey und Nagel	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG Valenciennerstr. 11 52355 Düren
Merck KGaA	Merck KgaA Frankfurter Str. 250 64293 Darmstadt
Millipore	Millipore 290 Concord Rd. Billerica, MA 01821 USA
MWG-Biotech	MWG Biotech AG Anzinger Strasse 7a 85560 Ebersberg bei München
Nalge Nunc International	Nalge Europe Ltd Ridderstraat 26 B-3040 Neerijse, Belgium
New England Biolabs	New England Biolabs GmbH Brüningstr. 50 65926 Frankfurt

Novagen	Novagen Inc 601 Science Drive Madison, WI 53711 USA
Perkin Elmer Life Sciences	Perkin Elmer Instruments GmbH Ferdinand-Porsche-Ring 17 63110 Rodgau-Jügesheim
Polaroid GmbH	Polaroid GmbH Sprendlinger Landstrasse 109 63069 Offenbach
Promega	Promega GmbH Schildkrötstr. 15 68199 Mannheim
Qiagen	Qiagen GmbH Max-Volmer-Strasse 4 40724 Hilden
Referenz-Zentrum des Deutschen Humangenomprojekts	Deutsches Humangenomprojekt Heubnerweg 6 14059 Berlin
Roche	Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Straße 116 68305 Mannheim
Roth	Carl Roth GmbH & Co. KG Schoemperlenstr. 1-5 76185 Karlsruhe
Santa Cruz	Santa Cruz Biotechnology Inc. Bergheimer Str. 89-2 69115 Heidelberg
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5 82024 Taufkirchen bei München
Stratagene	Stratagene Corporate Office 11011 N. Torrey Pines Road La Jolla, CA 92037
Technelysium	Technelysium Pty. Ltd PO Box 743 Tewantin Qld 4565 Australia
Thermo Electron	Thermo Electron GmbH Sedanstrasse 18 89077 Ulm
Upstate Biotechnology, über Biomol	Biomol GmbH Waldmannstr. 35 22769 Hamburg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

meinem Betreuer Herrn PD Dr. Ulrich Mahlknecht für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die engagierte Betreuung und konstruktive Diskussionen

Herrn Prof. Dr. Dieter Hoelzer für die Übernahme des ersten Gutachtens

Herrn Prof. Dr. Edgar Weigand für die Übernahme des Koreferates

allen Mitarbeitern der Universität Frankfurt, Abteilung Hämatologie/Onkologie, vor allem Heike, Birgit, Thea und Gianni

Herrn Dr. Frank Landgraf für technische und methodische Unterstützung

Herrn Prof. Dr. Georges Herbein für konstruktive Diskussionen

Frau Audrey Varin für die Unterstützung bei der Durchführung des TNF-Promotor-Luciferase Assays

meinen Eltern Christel und Günther Will sowie meinem Bruder Holger Will, die immer für mich da sind

Heidi Post für die kritische Durchsicht des Manuskripts und ihren immer währenden Humor

Oliver Heun für seine stetige Unterstützung und Motivation

Diese Arbeit wurde innerhalb der Emmy-Noether-Nachwuchsgruppe von PD Dr. Ulrich Mahlknecht aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ma2057/2-3) sowie aus Stiftungsmitteln der J.W. Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main unterstützt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Jutta Will
Geburtsdatum:	21.03.1974
Geburtsort:	Limburg/Lahn
Eltern:	Günther Will, Bahnbeamter a.D.
	Christel Will, Hausfrau

Schulbildung

1980 – 1984	Johann-Wolfgang von Goethe Grundschule Limburg/Lahn
1984 – 1993	Gymnasium Tilemannschule Limburg/Lahn
	Abiturprüfung mit der Abschlussnote 1,9

Universitäre Ausbildung

1993 – 1999	Studium der Ernährungswissenschaft an der Justus-Liebig-Universität Gießen
	Erlangung des Grades Dipl. oec. troph. mit der Abschlussnote 1,4
1997 – 1998	Diplomarbeit im Institut für Ernährungswissenschaft bei Frau Prof. Dr. Hannelore Daniel mit dem Thema “Identifizierung minimaler Strukturelemente in Substraten für epitheliale Peptidtransporter“. Note: 1,3

Berufstätigkeit

1999 – 2000	Wissenschaftliche Angestellte in der AG Prof. Dr.
	Wolfgang Dippold, Universitätsklinikum Mainz
2000 – 2003	Wissenschaftliche Angestellte in der Medizinischen Klinik III, Abteilung Hämatologie/Onkologie, Universität Frankfurt am Main in der AG PD Dr. Ulrich Mahlknecht

Publikationen

Originalarbeiten

Döring, F; Walter, J; **Will, J**; Föcking, M; Boll, M; Amasheh, S; Clauss, W; Daniel, H. (1998): Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. J. Clin. Invest. 101: 2761-2767.

Döring, F; **Will, J**; Amasheh, S; Clauss, W; Ahlbrecht, H; Daniel, H. (1998): Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. J. Biol. Chem. 273: 23211-23218.

Mahlknecht, U; Schnittger, S; **Will, J**; Cicek, N; Hoelzer, D. (2002): Chromosomal organization and localisation of the human histone deacetylase 9 gene (*HDAC9*). Biochemical and Biophysical Research Communications 293: 182-191.

Mahlknecht, U; **Will, J**; Varin, A; Hoelzer, D; Herbein, G. (2004): HDAC3, a class I histone deacetylase, suppresses MAPK11-mediated ATF-2 activation and represses TNF gene expression. J. Immunol. 173(6):3979-90.

Abstracts und Poster

Döring, F; Ahlbrecht, H; Amasheh, S; **Will, J**; Daniel, H.:
Welche Strukturelemente in Substraten erkennt der intestinale Peptidtransporter PepT1?
Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Kiel 1998

Will, J; Hoelzer, D; Malhknecht, U.:
Histone deacetylase inhibitors and their therapeutic efficiency.
Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), München 2002

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen eingereichte Inauguraldissertation mit dem Titel:

Charakterisierung der Interaktion der humanen Histon-Deacetylase 3 mit der MAP Kinase 11

in der Medizinischen Klinik III, Abteilung Hämatologie und Onkologie (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. Dieter Hoelzer) unter Leitung von Herrn PD Dr. Ulrich Mahlknecht ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher weder an einer in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt, den

Jutta Will